



Universidade de Brasília  
Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Caracterização do Papel do Metabolismo Lipídico de Granulócitos  
na Infecção por *Cryptococcus neoformans* Selvagem e Seu  
Mutante Acapsular**

**Tháís Amanda de Pinho Silva**

BRASÍLIA  
Agosto, 2014



Universidade de Brasília  
Pós-Graduação em Patologia Molecular

**THAÍS AMANDA DE PINHO SILVA**

**Caracterização do Papel do Metabolismo Lipídico de Granulócitos  
na Infecção por *Cryptococcus neoformans* Selvagem e Seu  
Mutante Acapsular**

Dissertação apresentada à  
Universidade de Brasília, como parte  
dos requisitos necessários para a  
obtenção do Título de Mestre em  
Patologia Molecular. Área de  
Concentração: Imunologia.

**Orientadores: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães  
Prof. Dr. José Raimundo Corrêa**

BRASÍLIA  
Agosto, 2014

*Ao meu pai José Maria dos Santos Silva, sempre  
incentivador e paciente, pois sem ele meu sonho jamais se concretizaria.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo suporte emocional e físico e por estar presente em todos os momentos mais difíceis. Sem Ele eu nada seria e nada alcançaria!

À Dra. Kelly Grace Magalhães, minha querida e amada orientadora, por todos os ensinamentos, todos os momentos de descontração e por toda a paciência que me foi cedida. Sem ela esse trabalho não seria concluído com tanta perfeição. Obrigada por todos os momentos, desde o primeiro dia do mestrado até o último. Obrigada por sempre acreditar em mim. Sem você nada disso seria possível!

Ao Dr. José Raimundo Corrêa, pela paciência e pela disponibilidade sempre que precisei, auxiliando de forma indispensável no meu crescimento profissional.

Aos colaboradores Raquel das Neves Almeida e Rafael Côrrea. Amigos que Deus introduziu na minha vida quando eu menos esperava. Obrigada por todos os dias e noites de experimentos. Obrigada por todo o apoio moral, psicológico, sentimental e financeiro. Sem vocês nada disso teria acontecido e meu sonho não seria possível. Obrigada por também sempre acreditarem em mim!

Aos meus doadores, que disponibilizaram seu tempo e muitas vezes pararam de fazer o que estavam fazendo para me ajudar.

Ao Raphael Severino Bonadio, que desde a graduação sempre esteve ao meu lado, me dando suporte e apoio, sem nunca hesitar. Sem você essa dissertação não sairia. Obrigada por tudo!

À Francilene Lopes, Gabriela Jaccoud, Marcela Sá, Márcio Jerônimo, Raffael Castro, Juan Costa, Amanda Souza, Nestor Leyton, Lucas Bou e Chiquinho pela ajuda imensurável e indescritível na realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunologia e Inflamação: Azadeh, Beatriz, Cecília, Érika, Larissa, Lívia e Luís pelo carinho e paciência. Em especial

meu muito obrigada à Dalila Ribeiro, que me auxiliou de forma incomensurável durante o último ano da dissertação.

À minha família; Meu papai José Maria, minha mãe Maria Augusta, meus queridos irmãos Pablo e Luciane, Alexandre e Ritinha, Diogo, Jéssica, Mayra e Jaqueline pelo apoio durante os dois anos de mestrado.

Às minhas amigas que tanto me auxiliaram durante todo o processo do mestrado, oferecendo o ombro e sorriso nos momentos mais difíceis. Obrigada pela amizade sincera, risadas, companheirismo e apoio: Nathália Roberta, Marianna Brandão, Fabiana Resende e Lorena Queiroz.

Ao Dr. Célio Freire de Lima pela purificação dos componentes da cápsula de *C. neoformans*.

À Dra. Geórgia Atella pela purificação bioquímica dos lipídeos.

À Dra. Christiane Bandeira-Melo e sua equipe pela receptividade e oportunidade de aprendizado em seu laboratório.

À Dra. Patrícia Bozza pelo auxílio e colaboração nos experimentos de análise de corpúsculos lipídicos.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

À agência de fomento CNPq pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>9</b>
<b>1) Introdução</b> .....	<b>10</b>
1.1 - Resposta Imune Inata .....	10
1.2 - Funções e características de granulócitos .....	11
1.3 - <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	13
1.4 - Cápsula e mecanismos de evasão .....	15
1.5 – Resposta imunológica na infecção por <i>C. neoformans</i> .....	16
1.6 - Corpúsculos lipídicos .....	18
1.7 - Mediadores lipídicos .....	20
1.8 - Via dos leucotrienos.....	21
1.9 - Via das Prostaglandinas .....	23
1.9.1 – Prostaglandina D <sub>2</sub> .....	25
<b>2) Justificativa</b> .....	<b>28</b>
<b>3) Objetivos</b> .....	<b>29</b>
<b>4) Materiais e Métodos</b> .....	<b>30</b>
<b>5) Resultados</b> .....	<b>36</b>
<b>6) Discussão</b> .....	<b>67</b>
<b>7) Conclusões</b> .....	<b>74</b>
Modelo Proposto .....	75
<b>8) Referências</b> .....	<b>76</b>

## RESUMO

**THAIS AMANDA DE PINHO SILVA. Caracterização do papel do Metabolismo lipídico de granulócitos na infecção por *Cryptococcus neoformans* selvagem e seu mutante acapsular. Universidade de Brasília, 2014.**

Granulócitos contribuem de forma significativa na resposta imunológica contra infecções. Dentre eles, os mais presentes na circulação sanguínea são os neutrófilos e eosinófilos. *Cryptococcus neoformans* é uma levedura patogênica adquirida pela inalação e pode causar desde pneumonia até meningoencefalite em indivíduos imunocomprometidos. Alguns fatores de virulência do fungo tornam possível a infecção, dentre eles o principal é a presença de uma cápsula polissacarídica. Durante a infecção, ocorre um recrutamento de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos entre outras células. Esses fagócitos podem matar ou inibir o crescimento do fungo ao ativarem uma resposta inflamatória. Um dos marcadores de ativação celular durante a resposta inflamatória são os corpúsculos lipídicos (CLs). Estas organelas multifuncionais, são locais de síntese de importantes mediadores inflamatórios. Durante a resposta inflamatória, ocorre uma importante produção de eicosanóides, como os leucotrienos e as prostaglandinas. Dentre as prostaglandinas, a prostaglandina D<sub>2</sub> é um dos principais mediadores lipídicos que medeia a resposta inflamatória de granulócitos. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar os mecanismos inflamatórios envolvidos na ativação do metabolismo lipídico de granulócitos por *C. neoformans*, analisando o papel da cápsula nesse processo. Demonstramos que *C. neoformans* acapsular Cap67 induz o aumento do tamanho e granulosidade celular em granulócitos. Essa modificação não foi causada pelos componentes da cápsula ou lipídeos totais do fungo. A infecção por Cap67 também induziu o aumento de CLs, porém os lipídeos do fungo contribuíram para este processo. Esse aumento de CLs foi dependente da enzima COX (mediadora de prostaglandinas) e independente de 5-LO e 15-LO (mediadoras de leucotrienos). A infecção pelo sorotipo D B3501 induziu um aumento da expressão de PGD<sub>2</sub> em granulócitos o qual foi revertido pelo mutante acapsular Cap67. A expressão do receptor nuclear PPAR $\gamma$  foi aumentada e o fator de transcrição NF $\kappa$ B não foi translocado durante a infecção por Cap67. Os receptores de PGD<sub>2</sub>, DP1 e CRTH2, não interferem na biogênese de CLs, mas modulam a capacidade fagocítica e de eliminação dos fungos pelos granulócitos. Todos esses resultados mostram a importância da via das PG na biogênese de CL, na fagocitose e na eliminação de *C. neoformans* por granulócitos. Nesse trabalho foi proposta uma nova via de escape do patógeno *C. neoformans*.

Palavras-chave: Granulócitos, *Cryptococcus neoformans*, Corpúsculos Lipídicos, Prostaglandina D<sub>2</sub>

## ABSTRACT

**THAIS AMANDA DE PINHO SILVA. Characterization of the role of granulocyte lipid metabolism in the infection by *Cryptococcus neoformans* wild type and its acapsular mutant. University of Brasília, 2014.**

Granulocytes significantly contribute to immune responses against infections. Among granulocytes, the most common cell type in bloodstream is neutrophil and eosinophil. *Cryptococcus neoformans* is a pathogenic yeast acquired by inhalation and may cause pneumonia and even meningoencephalitis in immunocompromised individuals. Some fungal virulence factors, such as presence of polysaccharide capsule, make infection more feasible to occur. During infection, occurs a recruitment of neutrophils, eosinophils, and macrophages, among other cells. These phagocytes may kill or inhibit the fungal growth, activating an inflammatory response. One of the markers of cellular activation during the inflammatory response is an organelle called lipid body (LB). These multifunctional organelles are sites of important inflammatory mediators synthesis. During an inflammatory response, there is substantial production of eicosanoids such as leukotrienes and prostaglandins. Among the prostaglandins, Prostaglandin D<sub>2</sub> is the key lipid mediator that mediates inflammatory response of granulocytes. Thus, the aim of this study was to investigate the inflammatory mechanisms involved in activation of lipid metabolism of granulocytes caused by *C. neoformans* infection, analyzing the role of the fungal capsule in this process. Here we demonstrate that *C. neoformans* acapsular Cap67 induced the increase of the cell size and granularity in granulocytes. The fungal lipid extract or capsule components did not cause this modification. The infection by Cap67 also induced the increase of LBs, however the fungal total lipids may contribute to this process. This increase of LBs was dependent on COX (prostaglandin mediator) and independent on 5-LO and 15-LO (leukotriene mediator). The infection with serotype D B3501 induced an increased expression of PGD<sub>2</sub> in granulocytes, which was reversed by the acapsular mutante Cap67. The expression of the nuclear receptor PPARγ increased and the transcription factor NFκB did not translocated during the infection by Cap67. The PGD<sub>2</sub> receptors, DP1 and CRTH2, did not interfere in the biogenesis of LBs, but modulated the phagocytic capacity and killing of fungi by granulocytes. All these results show the importance of the PG signaling pathway in the biogenesis of LBs, the phagocytosis and the killing of *C. neoformans* by granulocytes. In this work we have proposed a new escape pathway for the pathogen *C. neoformans*.

Keywords: Granulocytes, *Cryptococcus neoformans*, Lipid bodies, Prostaglandin D<sub>2</sub>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
BLT	Receptor de Leucotrieno B4
CL	Corpúsculo Lipídico
COX	Ciclooxigenase
CRTH2	Molécula homóloga ao receptor quimioatraente expresso em Th2
Cys-LT	Cisteinil Leucotrienos
DP	Receptor prostanóide tipo D
EX	Eoxinas
GalXM	Galactoxilomanana
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GXM	Glucoronoxilomanana
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
h-PGDS	Sintase de Prostaglandina D Hematopoiética
IL	Interleucinas
KDa	Kilo Dawton
LO	Lipoxigenases
LT	Leucotrienos
LX	Lipoxinas
MOI	Multiplicidade de Infecção
NET	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NFkB	Fator nuclear kB
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno
PG	Prostaglandinas
PL	Fosfolipase
PMN	Células Polimorfonucleares
PPARg	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gamma
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
Th	Linfócitos T helper
TX	Tromboxanos

# 1-Introdução

## 1.1 - Resposta Imune Inata

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos e é mediada por fagócitos, como macrófagos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e células dendríticas (Akira *et al.*, 2006). O primeiro passo para a indução de uma resposta imune inata contra patógenos, depende do reconhecimento de estruturas conservadas nesses organismos por células imunológicas. Essas estruturas conservadas são conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e podem ser secretados ou estar presentes na superfície do mesmo (Seider *et al.*, 2010). Os PAMPs são estruturas extremamente conservadas em microorganismos, pois são essenciais para sua sobrevivência (Akira *et al.*, 2006).

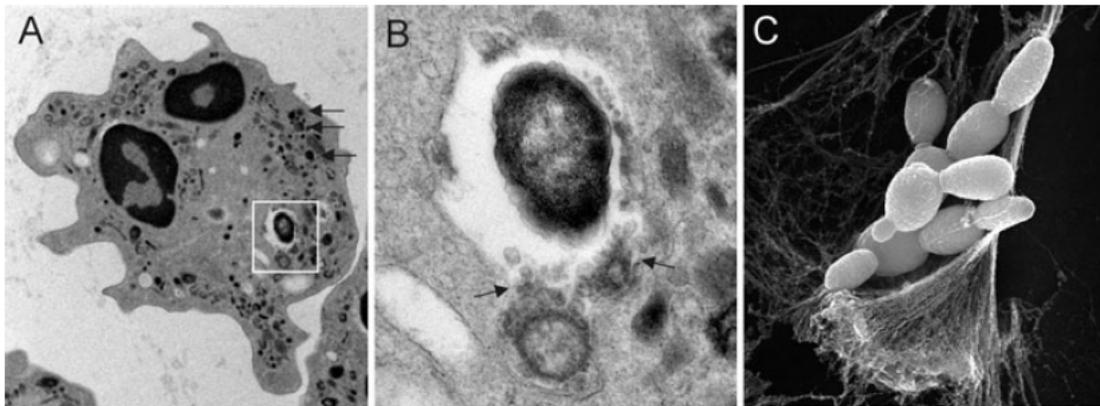
O sistema imune inato reconhece microorganismos através de um limitado número de receptores de reconhecimento padrão (PRR), pelos quais os PAMPs e DAMPs (padrões moleculares associados a perigo) são reconhecidos. Diferentes PRRs interagem com PAMPs e ativam vias de sinalização específicas levando a respostas distintas, dependendo do patógeno e do tipo de célula efetora (Akira *et al.*, 2006; Seider *et al.*, 2010). O reconhecimento de PAMPs pode resultar na fagocitose, secreção de compostos microbicidas e produção de mediadores pro-inflamatórios (Valdez *et al.*, 2012).

Uma das maiores vias de entrada para diversos patógenos é o trato respiratório, por estar constantemente exposto ao ambiente externo. Diante disso, há a presença de diversos tipos celulares, como células epiteliais, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos B e T, contribuindo para a resposta imunológica no pulmão (Chen & Kolls, 2013).

## 1.2- Funções e Características de Granulócitos

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) ou granulócitos, incluindo neutrófilos, basófilos e eosinófilos, são conhecidos por contribuir na resposta imune inata contra infecções por bactérias, fungos e helmintos. Em pacientes com a doença granulomatosa crônica, na qual há uma diminuição na eficácia dessas células, as infecções fúngicas são mais severas e rotineiras, demonstrando a importância dessas células na resposta contra fungos patogênicos (Cohen *et al.*, 1981). Tais células possuem proeminente resposta contra fungos oportunistas em sua forma de hifa, como nas espécies do gênero *Candida* (Roilides *et al.*, 1995)

Os granulócitos possuem numerosos mecanismos de ação, como fagocitose, liberação de proteínas microbicidas tóxicas presentes nos grânulos, a liberação de armadilhas extracelulares e a produção de citocina e mediadores lipídicos. Após a fagocitose os grânulos se fundem na membrana do fagossoma e liberam seus conteúdos diretamente no microorganismo a fim de eliminá-lo (Mambula *et al.*, 2000; Urban *et al.*, 2006). As armadilhas extracelulares têm como função principal a inibição da disseminação do patógeno (Mantovani *et al.*, 2011).



**Figura 1.1: Mecanismos de ação presentes em neutrófilos.** Fagocitose (A e B) e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (C). Em A e B as setas indicam grânulos citoplasmáticos e quadrado branco indica uma bactéria dentro do fagossoma. Em C são visualizadas as armadilhas em volta de *C. albicans*. Fonte: Urban, C.F. *et al.* 2006. *How do microbes evade neutrophil killing?*

Dentre os granulócitos, os mais abundantes na circulação sanguínea são os neutrófilos, com uma porcentagem de 40-75%, e eosinófilos, com uma porcentagem de 2-4%.

Neutrófilos são células efetoras essenciais para o sistema imune inato e estão envolvidos na resolução de infecções por patógenos (Urban *et al.*, 2006). Essas células são as primeiras a serem recrutadas para o local de inflamação durante a infecção por fungos e bactérias (Thomas *et al.*, 2013). Os patógenos são mortos através da combinação de diversos mecanismos de morte, envolvendo processos não-oxidativos e oxidativos através da produção de ROS (Mantovani *et al.*, 2011). Os grânulos são liberados após o estímulo e liberam enzimas essenciais para o estresse oxidativo, além de lisozimas e serinoproteases como a elastase (Amulic *et al.*, 2012). Esse subtipo celular é capaz de sintetizar mediadores lipídicos, com função autócrina, como leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (Peters-Golden *et al.*, 2007) e PGE<sub>2</sub> (Wright *et al.*, 2010).

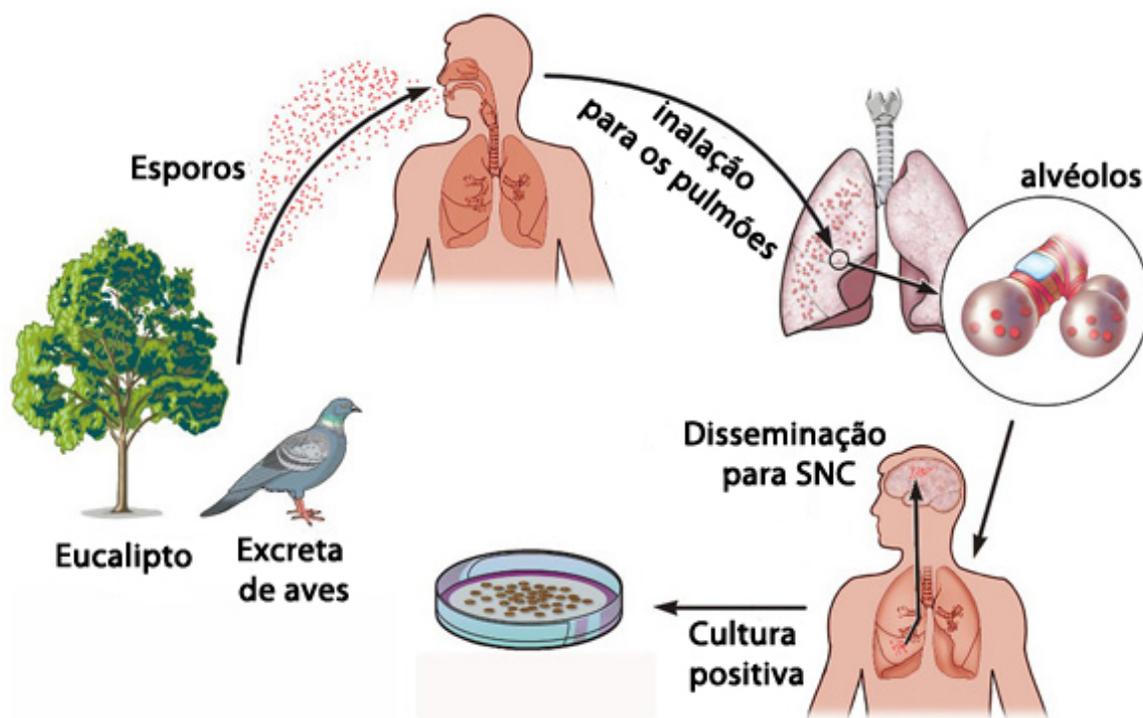
Eosinófilos são células multifuncionais imuno-moduladoras que participam de ambas as respostas imune inata e adaptativa através da expressão de vários receptores e da secreção de uma variedade de mediadores lipídicos. Após ativação, eosinófilos podem apresentar secreção dos conteúdos pré-formados dos seus grânulos, incluindo proteínas tóxicas, enzimas, citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos bioativos derivados do ácido araquidônico (AA). Eosinófilos podem sintetizar Lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>), Eoxina C<sub>4</sub> (EXC<sub>4</sub>), Tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), bem como prostaglandina E<sub>2</sub> e D<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>, respectivamente) (Luna-Gomes *et al.*, 2003). Assim como outras células com perfil Th2, eosinófilos produzem e liberam citocinas anti-inflamatórias como as citocinas imunorregulatórias IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Schuligoi, R. *et al.* 2010).

### 1.3- *Cryptococcus neoformans*

*Cryptococcus neoformans* é um patógeno intracelular facultativo que é adquirido por meio da inalação de esporos e/ou de leveduras dessecadas e pode causar desde pneumonia até infecção no SNC e morte em indivíduos imunocomprometidos, majoritariamente em pacientes infectados por HIV. Aproximadamente 1 milhão de pacientes com HIV são infectados por *C. neoformans* por ano (McTaggart *et al.*, 2011) e é estimado que cerca de 600,000 pacientes morram todo ano pela meningoencefalite (Piehler *et al.*, 2011; Holmer *et al.*, 2013; McTaggart *et al.*, 2011).

Apesar da maioria dos casos serem em indivíduos imunocomprometidos, essa levedura encapsulada também é capaz de infectar hospedeiros saudáveis, mantendo-se latente e assintomática por longos períodos de tempo até que o hospedeiro se torne imunocomprometido e suscetível, o que torna a infecção ativa, podendo então o fungo disseminar-se para o SNC, resultando em morte do hospedeiro em cerca de 70% dos casos de acordo com o tratamento (Garro *et al.*, 2010; Holmer *et al.*, 2013; Srikanta *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2012; McTaggart *et al.*, 2011).

A classificação atual define duas espécies: *C. neoformans var. grubii* (Sorotipo A) e *var. neoformans* (Sorotipo D); e *C. gattii* (Sorotipo B e C). *C. neoformans* é encontrado em todo mundo associado a excreta de aves, principalmente pombos, e causa a maioria das infecções em humanos. *C. gattii*, por sua vez, é relacionado a várias espécies de árvores e raramente causa doenças em humanos. O sorotipo A (*C. neoformans var. grubii*) é mais ubíquo, mais encontrado nas infecções de pacientes HIV-positivos (Srikanta *et al.*, 2014) e as linhagens geralmente possuem um alto poder imunomodulatório (Qiu *et al.*, 2012), enquanto o sorotipo D (*C. neoformans var. neoformans*) está mais presente em algumas áreas geográficas, como na Europa, e é mais relacionado com pacientes idosos e com pacientes usando corticoesteróides (Franzot *et al.*, 1999).



**Figura 1.2: Representação do ciclo de infecção por *Cryptococcus neoformans*.** Alguns animais são fontes de dispersão, como os pombos, sendo o fungo capaz de sobreviver nas excretas desses animais e em árvores ou galhos do meio ambiente. Esse fungo estabelece uma infecção pulmonar através da inalação de esporos presentes no ambiente e dependendo da condição imunológica do indivíduo a infecção pode ser latente ou disseminar para o SNC, resultando na meningite criptocócica. Adaptado de: Hull & Heitman. 2002. *Genetics of Cryptococcus neoformans*.

*C. neoformans* demonstra um tropismo pelo SNC, frequentemente causando meningite fatal. A entrada no SNC é um passo chave na patogênese de *C. neoformans*, sendo o fungo capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (Srikanta *et al.*, 2014). Este fungo é a causa líder de micose fatal ligada a disseminação para SNC (Qiu *et al.*, 2012).

Para ser capaz de infectar hospedeiros humanos e invadir o SNC, *C. neoformans* precisa de fatores de virulência que alterem a habilidade do hospedeiro de eliminar a infecção inicial e prevenir a disseminação sistêmica

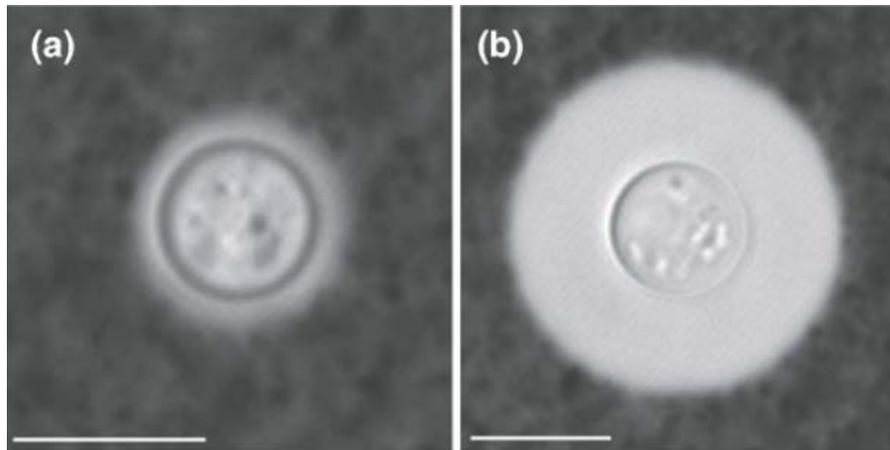
(Osterholzer *et al.*, 2009), além de fatores que permitam o crescimento das leveduras em ambiente não favorável. *C. neoformans* é capaz de proliferar dentro dos fagossomas das células hospedeiras e crescer a 37°C, o que provavelmente confere vantagens na disseminação e evasão imunológica (Srikanta *et al.*, 2014).

#### 1.4- Cápsula e Mecanismos de Evasão

*C. neoformans* possui diversos fatores de virulência que auxiliam no crescimento da levedura e escape da resposta imunológica. Dentre estes fatores, destacam-se: a capacidade de crescer e sobreviver a 37°C, a produção de melanina através da lacase, a produção de manitol, a secreção de proteases e fosfolipases e a presença de cápsula (Srikanta *et al.*, 2014).

Dentre todos os fungos patogênicos, *C. neoformans* é o único que possui uma cápsula polissacarídica. Essa cápsula é composta primariamente de dois polissacarídeos, glucoronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), e é o fator de virulência mais estudado (Srikanta *et al.*, 2014). GXM interfere na migração de granulócitos da circulação sanguínea para o tecido, evitando o rolamento das células e adesão ao endotélio, bloqueando assim a ação das quimiocinas (Ellerbroek *et al.*, 2004). A função de GalXM permanece desconhecida (McFadden *et al.*, 2006), mas pode estar associada a montagem da cápsula e indução de morte de linfócitos T (De Jesus *et al.*, 2009).

A cápsula polissacarídica pode crescer várias vezes o tamanho da célula em espessura. Estudos indicam que as leveduras que não possuem essa estrutura são avirulentas e que a cápsula inibe fagocitose e outras respostas imunológicas (Srikanta *et al.*, 2014). Essa inibição ocorre devido ao fato da cápsula evitar o reconhecimento de PAMPs, como  $\beta$ -glucana, quitina e manoproteínas (Seider *et al.*, 2010).



**Figura 1.3: Micrografias evidenciando a presença de cápsula de diferentes tamanhos em *C. neoformans*.** Leveduras com cápsula pequena (A) e grande (B).  
Fonte: McFadden et al. 2006. *The capsular dynamics of Cryptococcus neoformans*.

### 1.5- Resposta Imunológica na Infecção por *C. neoformans*

Devido ao fato de *C. neoformans* ser adquirido pelas vias respiratórias, as células e proteínas do pulmão são as primeiras linhas de defesa contra o patógeno (Holmer *et al.*, 2013). Na iniciação da resposta inflamatória contra *C. neoformans*, as células recrutadas incluem neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófago, células dendríticas, linfócitos e células natural *killer* (Garro *et al.*, 2010). Esses fagócitos profissionais como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos ativados podem matar ou inibir o crescimento de *C. neoformans in vitro* (Price & Perfect, 2011).

A eliminação de *C. neoformans* do pulmão e a prevenção da disseminação é dependente do desenvolvimento de uma resposta adaptativa Th1 e/ou Th17 contra a levedura. O desenvolvimento de uma resposta Th2 nos pulmões não é protetora e é associada com a persistência e proliferação de *C. neoformans* (Osterholzer *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2012; Huffnagle *et al.*, 1997; Price & Perfect, 2011; Holmer *et al.*, 2013). A resposta Th2 representa a via imunopatológica que promove a doença através da permissão das leveduras se

proliferarem e disseminarem para o SNC, resultando na meningite criptocócica (Piehler *et al.*, 2011). Em resumo, a eliminação da infecção por *C. neoformans* requer o desenvolvimento de uma resposta celular protetora, e em infecções crônicas ou disseminadas o balanço Th1-Th2 é deslocado para resposta Th2 (Noverr *et al.*, 2003).

A linhagem mais virulenta H99 inibe a indução de IL-17 e IFN- $\alpha$  e aumenta a resposta Th2 nos pulmões. Entretanto, mesmo em camundongos mutantes para IL-4 e IL-13, H99 consegue alcançar o SNC. A disseminação da linhagem mais virulenta, portanto, é através de outros mecanismos além de não promover a resposta Th2 nos pulmões (Qiu *et al.*, 2012).

Na Criptococose humana, os eosinófilos não são usualmente descritos como componentes principais da resposta inflamatória, embora eles tenham sido achados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite e em abscessos durante a infecção por *C. neoformans* (Feldmesser *et al.*, 1997).

Eosinófilos são recrutados para os locais inflamatórios em várias infecções. Embora eles sejam predominantes em infecções por helmintos, eles também estão presentes exercendo importante resposta imunológica em infecções contra fungos e bactérias. Eosinófilos são recrutados na infecção por ambos os sorotipos A e D de *C. neoformans* e liberam o conteúdo dos seus grânulos quando em contato direto com as leveduras, levando-as à morte de uma forma dependente do contato (Feldmesser *et al.*, 1997). Eosinófilos atuam como células apresentadoras de antígenos fúngicos e podem estar envolvidos na inicialização de uma resposta adaptativa na infecção por *C. neoformans* (Garro *et al.*, 2010).

A eosinofilia tem sido associada com uma resposta imunológica não efetiva contra *C. neoformans*, pois eosinófilos são importantes produtores de IL-4, contribuindo desta forma para a formação de uma resposta imunológica do tipo Th2 (Piehler *et al.*, 2011). Apesar disso, os eosinófilos são capazes de fagocitar e apresentar antígenos de *C. neoformans* aos linfócitos T (Holmer *et al.*, 2013).

O background genético do hospedeiro é o maior determinante da resposta imunológica em modelos murinos de infecção. BALB/C progressivamente

elimina o patógeno enquanto CL57/BL gera uma infecção pulmonar não eficaz. A inabilidade de C57BL/6, linhagem suscetível, de eliminar *C. neoformans* dos pulmões é associado ao desenvolvimento de um infiltrado de eosinófilos (Huffnagle *et al.*, 1997) e macrófagos M2 (Piehler *et al.*, 2011).

Entretanto, segundo Garro e colaboradores (2010) eosinófilos induzem o desenvolvimento de uma resposta Th1 específica contra *C. neoformans*. Leveduras opsonizadas ativam eosinófilos induzindo a expressão de MHC de classe I, de classe II e moléculas co-estimulatórias. Esses eosinófilos podem estimular linfócitos TCD4+ e TCD8+ a produzirem uma resposta específica, através da criação de um ambiente Th1, dessa forma eosinófilos estariam envolvidos em uma resposta imune adaptativa contra *C. neoformans*. Os neutrófilos podem matar *C. neoformans* através de mecanismos oxidativos e não oxidativos. Os mecanismos oxidativos envolvem a liberação de mieloperoxidase dos grânulos. Foi descrito por Aratani e colaboradores (2006) que camundongos MPO<sup>-/-</sup> infectados por *C. neoformans* apresentaram carga maior de fungos no pulmão e no baço, e sobrevida menor que em camundongos selvagens. Além disso, granulócitos são capazes de matar *C. neoformans* independente da opsonização por anticorpos e de forma mais eficaz que monócitos (Miller *et al.*, 1991).

A evasão da resposta imunológica e inflamatória de células hospedeiras pelo fungo consiste um importante mecanismo de estabelecimento e disseminação da infecção fúngica. Entretanto, não há muitos trabalhos na literatura relatando a interação entre *C. neoformans* e granulócitos e a resposta inflamatória gerada por esses tipos celulares. Dentre os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória, destacam-se organelas como os corpúsculos lipídicos e mediadores inflamatórios lipídicos como as prostaglandinas e leucotrienos.

## 1.6- Corpúsculos Lipídicos

Corpúsculos lipídicos (CL) são organelas distribuídas no citoplasma da maioria das células eucarióticas e possuem uma variedade de funções no metabolismo lipídico, sinalização celular e inflamação. CLs possuem uma região central composta de lipídeos neutros e é envolto por uma monocamada de fosfolipídios associados a proteínas, o que o difere das demais organelas celulares convencionais. O modelo clássico para formação de corpúsculos lipídicos é através do acúmulo de lipídeos neutros e brotamento do retículo endoplasmático (Melo *et al.*, 2011).

Em leucócitos em estado de repouso existe apenas um número basal de corpúsculos lipídicos. Estas organelas se tornam abundantes quando as células se tornam ativadas e envolvidas em processos inflamatórios (Bozza *et al.*, 2009). A biogênese dos CLs ocorre em decorrência a um estímulo inflamatório e está relacionada a diversas patologias (Melo *et al.*, 2011). Dessa forma, os corpúsculos lipídicos atuam como importantes marcadores de ativação celular uma vez que sua biogênese é desencadeada imediatamente após a ativação de leucócitos. Entretanto a função de CLs em infecções fúngicas ainda não foi reportada.

Inicialmente se achava que a função de CLs era somente o armazenamento e transporte de lipídeos neutros, entretanto atualmente é sabido que CLs são organelas com sistema de regulação complexo, dinâmico e são funcionalmente ativos em diferentes condições patológicas (Bozza *et al.*, 2009).

CLs são sítios ativos do metabolismo do ácido araquidônico e possuem enzimas chave envolvidas no metabolismo de colesterol e para síntese de ácidos graxos, indicando que ambos os passos anabólicos e catabólicos do metabolismo lipídico estão presentes nessa organela.

Todas as enzimas necessárias para síntese de eicosanoides, como fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA), ciclooxigenases (COX), prostaglandina E<sub>2</sub> e D<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>) sintase, 5- e 15-lipoxigenases (5-LO e 15-LO) e leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) sintase, foram localizadas dentro de CLs em células ativadas (Melo *et al.*, 2011;

Haeggstrom & Funk, 2011). CLs são portanto organelas multifuncionais e sítios de eventos regulatórios, além de serem potenciais fontes de produção de mediadores inflamatórios como eicosanoides (Bozza *et al.*, 2009; Haeggstrom & Funk, 2011). Dessa forma, essas organelas atuam na inflamação como marcadores da ativação de leucócitos, constituindo assim um possível novo alvo anti-inflamatório (Bozza *et al.*, 2009).

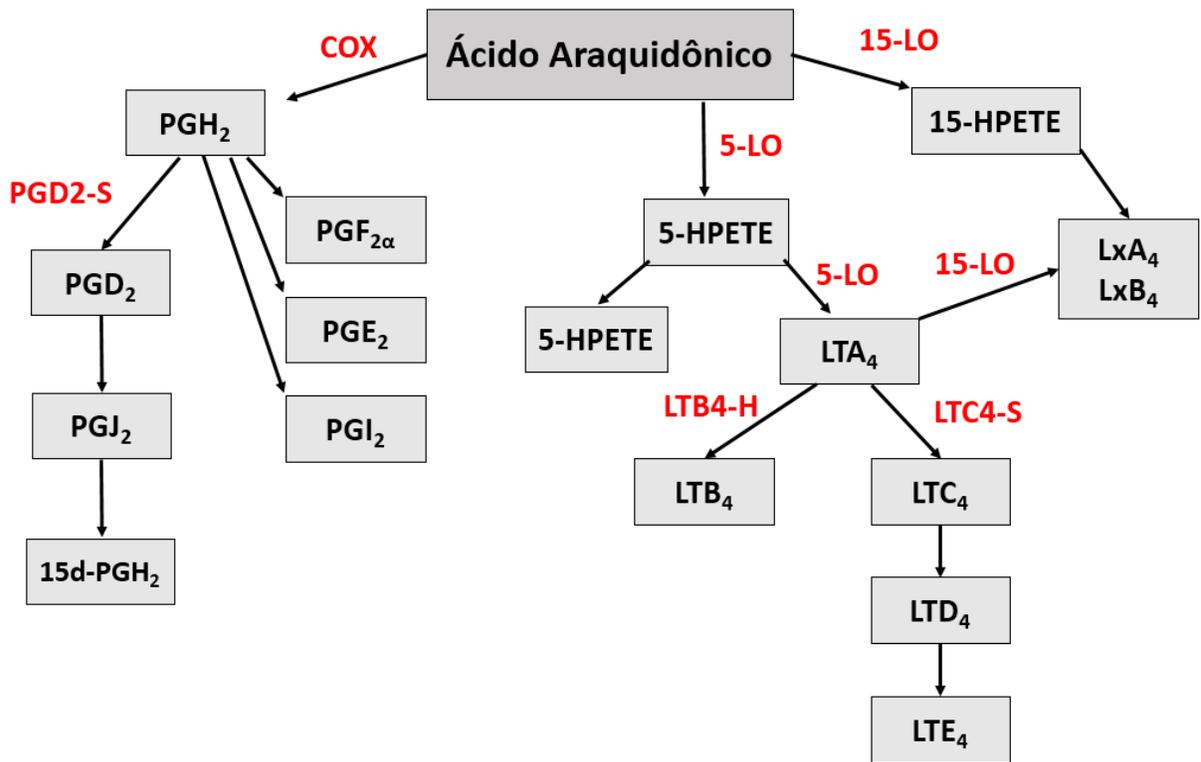
Os CLs constituem o principal sítio de localização intracelular da formação e ativação de LTC<sub>4</sub> em eosinófilos (Vieira-de-Abreu *et al.*, 2005), de LTB<sub>4</sub> em neutrófilos e macrófagos (Pacheco *et al.*, 2007) e PGE<sub>2</sub> em macrófagos e células epiteliais (Plotkowski *et al.* 2008). Considerando sua função na geração de eicosanoides, os corpúsculos lipídicos possuem importantes funções na resposta inflamatória.

### **1.7- Mediadores Lipídicos**

Os eicosanóides, os quais incluem prostaglandinas e leucotrienos, são lipídeos biologicamente ativos que têm sido relacionados a vários processos patológicos, como inflamação e câncer (Noverr *et al.*, 2003; Wang & DuBois, 2010). Os eicosanoides são uma grande família de mediadores lipídicos derivados da metabolização do ácido araquidônico (AA) e são encontrados em grandes quantidades em locais de inflamação. Essas moléculas são mediadores chave na patogênese de diversas doenças inflamatórias e possuem tanto funções pró- como anti-inflamatórias (Luna-Gomes *et al.*, 2003) e controlam diversos processos celulares, como a proliferação, apoptose, metabolismo, migração e manutenção da homeostasia (Bozza *et al.*, 2009). Quando eles são formados em excesso eles podem resultar em dor, febre, inflamação e doenças crônicas (Haeggstrom & Funk, 2011).

Em geral, nas células produtoras de eicosanoides, a PLA mobiliza o AA das membranas e a oxidação do mesmo é mediada por enzimas diferentes, que resultam em mediadores lipídicos bioativos específicos (Luna-Gomes *et al.*, 2003). O metabolismo de AA ocorre através de duas vias metabólicas principais, as vias

da Ciclooxygenase (COX) e da Lipoxigenase (LO). A COX está envolvida na biossíntese das prostaglandinas, enquanto a LO está envolvida na biossíntese de leucotrienos e lipoxinas (Haeggstrom & Funk, 2011).



**Figura 1.4: Esquema geral da metabolização do ácido araquidônico em eicosanoides.** Em vermelho as enzimas responsáveis pela síntese do eicosanoide.

### 1.8 - Via dos Leucotrienos

Os leucotrienos compreendem uma família de produtos da via da 5-LO no metabolismo do ácido araquidônico (Peters-Golden *et al.*, 2007) que possuem diversos efeitos inflamatórios. Para que ocorra a síntese de leucotrienos a proteína FLAP auxilia a ligação entre a enzima 5-LO e o ácido araquidônico, resultando na produção de 5-HPETE e em seguida LTA<sub>4</sub>. LTA<sub>4</sub> é hidrolisado em LTB<sub>4</sub>, através

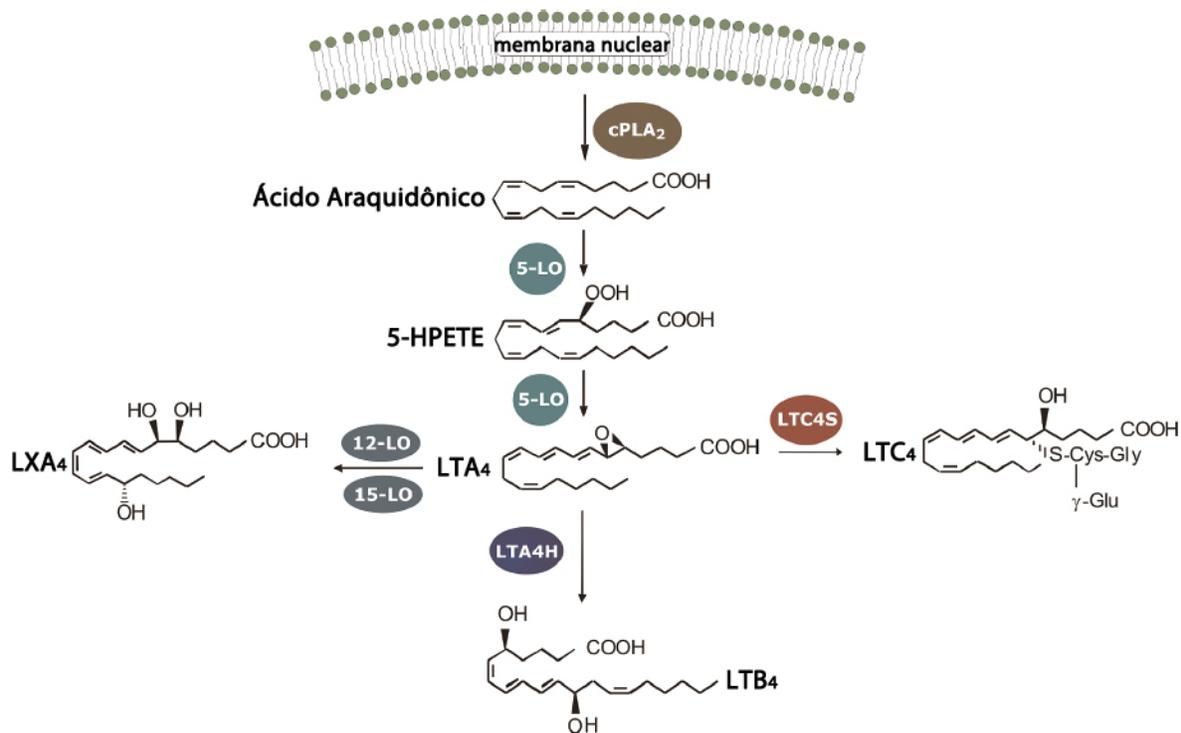
da LTA<sub>4</sub> hidrolase, ou para cys-LT através da LTC<sub>4</sub> sintase (Haeggstrom & Funk, 2011).

Em paralelo, os leucotrienos também podem ser gerados através da biossíntese transcelular através da cooperação entre diferentes tipos celulares (Wang & DuBois, 2010). A biossíntese transcelular se torna necessária quando a célula receptora, geralmente não leucocitária, não possui a 5-LO, mas possui algumas outras enzimas da via, como a LTA<sub>4</sub> hidrolase e LTC<sub>4</sub> sintetase (Haeggstrom & Funk, 2011). O LTA<sub>4</sub> derivado de células que possuem 5-LO e FLAP é adquirido pelas células receptoras através de exossomos e é metabolizado para produção de outros tipos de leucotrienos (Peters-Golden *et al.*, 2007).

A expressão da 5-LO é essencialmente restrita a células derivadas da medula óssea como granulócitos, monócitos/macrófagos e linfócitos B (Haeggstrom & Funk, 2011). Essa enzima está presente no citoplasma em células em repouso e quando a célula se torna ativada, a 5-LO pode se direcionar para a membrana nuclear (Peters-Golden *et al.*, 2007) ou para os corpúsculos lipídicos (Bozza *et al.*, 2009).

Esses mediadores lipídicos têm funções biológicas particulares e de significância fisiopatológica, principalmente como mediadores da inflamação, e são sintetizados primariamente em leucócitos como granulócitos, macrófagos, mastócitos e células dendríticas. Existem duas classes de LT, LTB<sub>4</sub> e Cisteinil LT (Cys-LT; LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) de acordo com a presença de cisteína. LTB<sub>4</sub> é uma das mais importantes moléculas quimioatrativas de neutrófilos já descritas (Haeggstrom & Funk, 2011).

Receptores acoplados à proteína G são responsáveis pela sinalização dos leucotrienos. O LTB<sub>4</sub> é reconhecido pelos receptores BLT<sub>1</sub> e BLT<sub>2</sub>, os quais possuem diferentes afinidades por LTB<sub>4</sub> e locais de expressão. Os cys-LT, por sua vez, são reconhecidos pelos CysLT<sub>1</sub> e CysLT<sub>2</sub> (Haeggstrom & Funk, 2011).



**Figura 1.5: Esquema da metabolização do AA em LT através da fosfolipase A<sub>2</sub>, 5-LO e 15-LO.** Adaptado de: Haeggstrom & Funk. 2011. *Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease*.

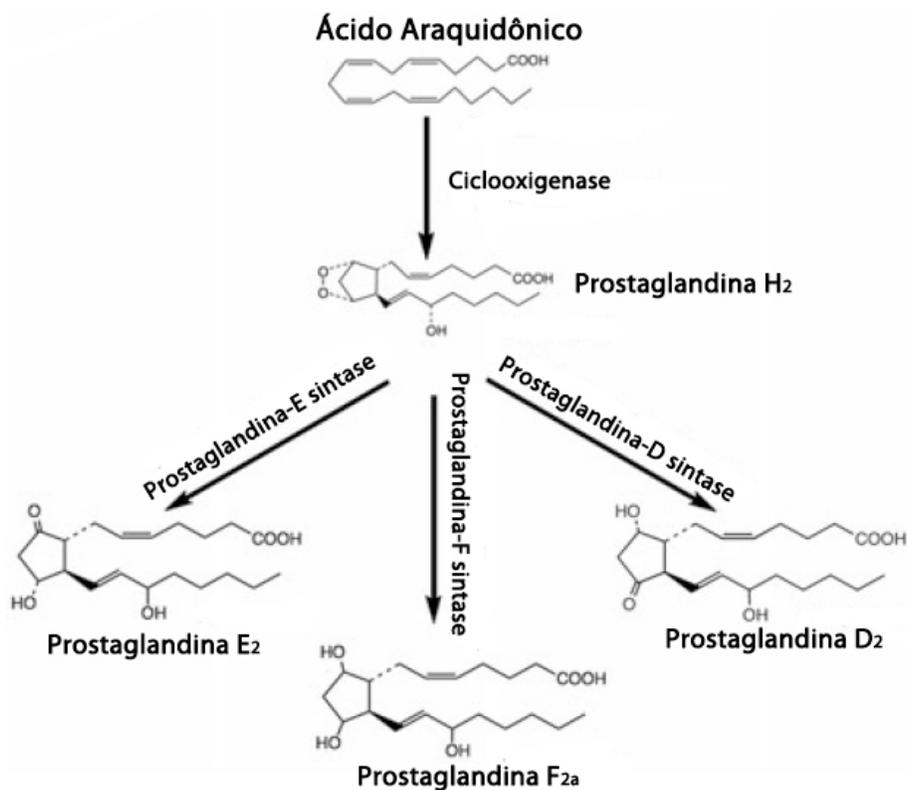
### 1.9 - Via das Prostaglandinas

A biossíntese de prostanóides, incluindo prostaglandinas (PG) e troboxanos (TXA), é catalisada pela ciclooxigenase através da conversão do ácido araquidônico. As PGs exercem seus efeitos biológicos se ligando a receptores acoplados a proteínas G (GPCR), chamados de DP e em alguns casos as PGs podem se ligar ao receptor nuclear PPAR (Stebbins *et al.*, 2010).

A produção de PG começa após a liberação e metabolização pela COX de AA em PGH<sub>2</sub>, precursores de diversas outras PG. A COX-1 é expressa constitutivamente enquanto a COX-2 é induzida durante a inflamação. A PGD<sub>2</sub> é sintetizada pela ação de PGD sintase, PGD sintase lipocalina (L-PGDS) em

alguns tipos celulares ou PGD sintase hematopoiética (H-PGDS) expressas em leucócitos. (Arima & Fukuda, 2011; Pettipher, 2008).

As PGE<sub>2</sub>, são potentes mediadores da comunicação intercelular (com ação autócrina e parácrina) podendo regular negativamente a resposta inflamatória, controlando a ativação leucocitária e promovendo a resolução da inflamação (Scott *et al.*, 1982; Yamada *et al.*, 2002). A PGE<sub>2</sub> produzida durante a infecção por *Angiostrongylus costaricensis*, está relacionada com resolução do edema pleural alérgico e indução de eosinofilia (Bandeira-Melo *et al.*, 2000). Já foram observados em vários estudos que alguns parasitos podem produzir PGD<sub>2</sub>. Sanding e colaboradores (2007) demonstraram que *Schistosoma mansoni* é capaz de produzir PGD<sub>2</sub> e que *C. neoformans* e *C. albicans* podem produzir PGE<sub>2</sub> (Erb-Downward & Huffnagle, 2007; Qiu *et al.*, 2012; Valdez *et al.*, 2012), e que estes mediadores lipídicos produzidos por parasitos têm o papel de limitar a resposta imunológica inibindo a migração de células apresentadoras de antígenos para os nódulos linfáticos (Sanding *et al.*, 2007), bem como modulando a resposta imunológica para uma resposta Th2 anti-inflamatória (Qiu *et al.*, 2012; Valdez *et al.*, 2012). *C. neoformans* sintetiza PGE<sub>2</sub>, para induzir uma modulação supressora da inflamação, de forma independente de COX e dependente de Lacase (Valdez *et al.*, 2012; Erb-Downward *et al.*, 2008), mostrando mais uma vez a íntima relação entre dos mecanismos de virulência fúngica e a inflamação. Estudos têm indicado que as prostaglandinas podem inibir a produção de citocinas de perfil Th1 como IFN- $\alpha$  e IL-12, favorecendo a produção de citocinas Th2 como IL-4 e IL-5 em linfócitos humanos (Snijdwint *et al.* 1993).



**Figura 1.6:** Esquema da metabolização do ácido araquidônico em prostaglandinas através da fosfolipase A2, ciclooxigenase-2 e PG sintase. Adaptado de: Erb-Downward *et al.* 2008. *The role of laccase in prostaglandin production by Cryptococcus neoformans.*

### 1.9.1 - Prostaglandinas D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>)

A PGD<sub>2</sub> faz parte da família de lipídeos biologicamente ativos derivados do ácido araquidônico através das enzimas COX-1 e COX-2 e PGD<sub>2</sub> sintase. Mastócitos são as células que mais produzem PGD<sub>2</sub>, embora células apresentadoras de antígenos e outras células Th2 também a produzam. PGD<sub>2</sub> e seus metabólitos se ligam primariamente a dois receptores associados a proteínas G (GPCR), DP1 (receptor prostanóide do tipo D) e CRTH2 (Molécula homóloga ao receptor quimioatraente expresso em Th2) (Stebbins *et al.*, 2010; Schuligoj *et al.*,

2010; Arima & Fukuda, 2011). Esses dois receptores são expressos em uma grande variedade de leucócitos e medeiam a função biológica de PGD<sub>2</sub>.

PGD<sub>2</sub> é uma prostaglandina que possui efeitos de modulação da resposta inflamatórias, sendo capaz de inibir produção de IL-12 e IL-10 por células dendríticas humanas (Gosset *et al.*, 2003). A PGD<sub>2</sub> pode agir através do receptor DP1, o qual é acoplado a proteínas G<sub>αs</sub>, ou pelo receptor CRTH2 (molécula homóloga ao receptor quimioatraente), acoplado à proteína G<sub>αi</sub>. Além disso, PGD<sub>2</sub> é um potente quimioatraente de eosinófilos e é capaz de induzir a biogênese de CLs em alguns tipos celulares (Bozza *et al.*, 2009).

O receptor DP1 foi o primeiro a ser descoberto e é expresso em diversos tipos celulares tanto do tipo Th1 quanto Th2, como granulócitos, linfócitos T e células dendríticas. Esse receptor está normalmente envolvido em respostas pró-inflamatórias e o seu bloqueio inibe a inflamação. Por outro lado, DP1 também pode desencadear respostas anti-inflamatórias (Sanding *et al.*, 2007; Luna-Gomes *et al.*, 2003; Arima & Fukuda, 2011). A ativação do receptor DP1 aumenta cAMP intracelular através do receptor acoplado à proteína G<sub>αs</sub> (Luna-Gomes *et al.*, 2003; Sanding *et al.*, 2007). O aumento de cAMP é geralmente associado com a inibição da função efetora de células imunológicas (Arima & Fukuda, 2011).

O receptor DP2 ou CRTH2 está predominantemente presente em eosinófilos e em tipos celulares com perfil Th2 e não está presente em neutrófilos (Monneret *et al.*, 2001; Sanding *et al.*, 2007) Esse receptor é acoplado a uma proteína G<sub>αi</sub>. A ativação deste receptor está normalmente associada a uma resposta pró-inflamatória e induz estresse oxidativo em eosinófilos, além da indução da migração de células Th2 (Sanding *et al.*, 2007; Schuligoi *et al.*, 2010; Arima & Fukuda, 2011). A ativação do receptor CRTH2, de forma oposta ao DP1, inibe cAMP intracelular (Luna-Gomes *et al.*, 2003; Sanding *et al.*, 2007). CRTH2 medeia a mudança conformacional de eosinófilos, degranulação, produção de citocinas Th2 e quimiotaxia de basófilos, eosinófilos e linfócitos Th2 (Stebbins *et al.*, 2010).

Os dois receptores, por estimularem diferentes sinalizações no interior das células, podem exercer efeitos antagonistas. A ativação de DP1 está

geralmente associada com a inibição da função celular, enquanto CRTH2 resulta na ativação celular (Arima & Fukuda, 2011). Já foi descrito que a sinalização induzida por DP1 inibe algumas funções mediadas pelo CRTH2, como a migração de basófilos e células dendríticas (Sanding *et al.*, 2007). Ambos os receptores têm afinidade similar por PGD<sub>2</sub>, embora possuam pouca semelhanças estruturais (Schuligoi *et al.*, 2010; Arima & Fukuda, 2011).

A PGD<sub>2</sub> participa de processos relacionados à migração, como aumento da expressão de CD11b e selectina, mobilização de cálcio, polimerização de actina, produção de quimiocinas e mudanças na morfologia celular (Luna-Gomes *et al.*, 2003). Portanto, ela induz a quimiotaxia de células Th2, basófilos e eosinófilos, estimula secreção de citocinas e aumenta a sobrevivência dessas células (Schuligoi *et al.*, 2010). Além disso, PGD<sub>2</sub> pode estar envolvida na iniciação e perpetuação da inflamação alérgica. Por outro lado, PGD<sub>2</sub> também pode ter funções benéficas na resolução da inflamação através do controle da resposta Th1 (Schuligoi *et al.*, 2010). Assim, PGD<sub>2</sub> e seus metabólitos podem ter papéis pró- ou anti-inflamatórios dependendo da sua concentração e do alvo celular. Quando em concentrações menores ela tem uma função pró-inflamatória com recrutamento e ativação de leucócitos, enquanto uma maior concentração de PGD<sub>2</sub> inibe a ativação e induz apoptose (Sanding *et al.*, 2007).

## 2- Justificativa

O papel de granulócitos em infecções fúngicas é pouco conhecido, e os trabalhos que abordam a interação desse tipo celular com *C. neoformans* são raros, sendo a maioria dos estudos acerca deste fungo concentrados na microbiologia e nos fatores de virulência. Os mecanismos envolvidos no processo de ativação de granulócitos induzidos pelos componentes lipídicos e componentes de cápsula de *C. neoformans* são escassos, e não existem dados na literatura que demonstrem o papel da PGD<sub>2</sub> na infecção por esse fungo.

Estudos que tratam da interação de *C. neoformans* com granulócitos podem levar a um melhor entendimento do papel dessas células na resposta imune contra infecções ocasionadas por essa levedura, levando em consideração que *C. neoformans* é um patógeno pulmonar e entra em contato rapidamente com neutrófilos e eosinófilos. Sendo assim, este projeto propõe a investigação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ativação de granulócitos por *C. neoformans*, analisando a influência da cápsula nesse processo. Espera-se que seja possível um maior entendimento acerca da resposta imune e inflamatória desencadeada pela infecção por *C. neoformans*, elucidando os mecanismos pelos quais ocorrem a ativação de granulócitos infectados por este fungo.

## 3-Objetivos

### 3.1- Objetivo geral

Investigar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ativação de granulócitos por *C. neoformans*, analisando o papel da cápsula do fungo e do metabolismo lipídico celular nesse processo.

### 3.2- Objetivos específicos

- a) Verificar se *C. neoformans* é capaz de ativar granulócitos, analisando a mudança conformacional e biogênese de corpúsculos lipídicos;
- b) Caracterizar os lipídeos das três linhagens de *C. neoformans*;
- c) Analisar se componentes da cápsula e lipídeos de *C. neoformans* participam da mudança conformacional e biogênese de corpúsculos lipídicos em granulócitos;
- d) Verificar o papel das enzimas COX, 5-LO e 15-LO na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por *C. neoformans*;
- e) Investigar se a infecção por *C. neoformans* modula expressão do PPARgamma e do fator de transcrição NFkB em granulócitos;
- f) Investigar se *C. neoformans* é capaz de modular a expressão de PGD<sub>2</sub> em granulócitos;
- g) Analisar o papel dos receptores de PGD<sub>2</sub> (DP1 e CRTH2) bem como da sua enzima de síntese (h-PGDS) na biogênese de corpúsculos lipídicos;
- h) Verificar a capacidade fagocítica e citotóxica de granulócitos na infecção por *C. neoformans* e elucidar o papel dos receptores DP1 e CRTH2 e da enzima h-PGDs nessa atividade.

## **4-Material e Métodos**

### **4.1- Isolamento das células polimorfonucleares PMN**

As células polimorfonucleares (PMN) ou granulócitos foram isoladas de doadores saudáveis, seguindo todas as normas do comitê de ética humanos da Universidade de Brasília. Aproximadamente 70ml de sangue foram coletados de cada doador em tubos de vácuo com 3,2% de citrato de sódio (Vacuette). Após a coleta dos tubos, os componentes do sangue foram separados através de um gradiente de densidades diferentes. Os granulócitos foram separados dos Eritrócitos e das células mononucleares de sangue periférico (PBMC) com Histopaque 1119 e Histopaque 1077 (Sigma Aldrich) através de centrifugação a 1000rpm durante 15 minutos. O soro foi coletado para posterior utilização, enquanto os PBMC foram descartados. Os granulócitos foram então isolados e, após a lise hiposmótica das hemácias restantes, eles foram ressuspensos em solução balanceada de Hank's (HBSS) com Cálcio e Magnésio (HBSS<sup>+/+</sup>, Sigma-Aldrich) na concentração de  $3 \times 10^6$  células por ml para posterior utilização.

### **4.2- Fungos**

Foram utilizados os fungos patogênicos *C. neoformans var neoformans* B3501 (Sorotipo D) e o seu mutante acapsular Cap67, bem como o *C. neoformans var grubii* H99 (Sorotipo A). Todos os fungos utilizados neste trabalho como modelo de infecção foram gentilmente cedidos pelo Dr. Célio Freire de Lima (Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ). As leveduras foram mantidas em placas de petri com Sabouraud Dextrose Agar na geladeira, com repique mensal dos isolados até o uso. Antes da sua utilização, as leveduras foram inoculadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose a 30°C sob agitação constante de 200 rpm durante 48 horas.

#### **4.3- Purificação dos polissacarídeos da cápsula de *C. neoformans***

Os componentes da cápsula de *C. neoformans*, GXM e GalXM foram purificados e cedidos pelo Dr. Célio Freire de Lima (Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ). Os polissacarídeos capsulares do *C. neoformans* foram extraídos do sobrenadante de cultura das cepas B3501 (para extração da GXM) e Cap67 (para extração da GalXM) crescidas em meio CDCB2550 (22 mM de D-Glicose, 21 mM de Uréia, 6 mM de glutamato de sódio, 8,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1,2 mM de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 6 mM de Tiamina HCl e 3 mM de biotina- Merck, DEU) por 5 dias a 37°C sob agitação (100rpm). O isolamento da GalXM foi realizado de acordo Vaishnav e colaboradores (1998). A presença única de GalXM nessas frações foi avaliada de acordo com a descrição previamente publicada por Villena e colaboradores (2008). Para a obtenção da GXM foi utilizada a técnica descrita por Cherniak e colaboradores (1991), chamada de precipitação diferencial por CTAB. A qualidade da purificação foi avaliada de acordo com a descrição prévia publicada Villena e colaboradores (2008).

Após o isolamento as amostras foram liofilizadas e ressuspendidas em PBS pH 7,2 livre de LPS (Gibco, USA) em uma concentração estoque de 1 mg/mL. As moléculas foram utilizadas em diferentes experimentos nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/mL.

#### **4.4- Purificação dos componentes lipídicos de *C. neoformans***

O extrato total de lipídeos isolados e provenientes das diferentes cepas de *C. neoformans* foi obtido de acordo com o método descrito por Bligh & Dyer (1959). Para isso, lipídeos totais foram extraídos durante 2h com uma solução contendo 5 ml de clorofórmio-metanol-água (2:1:0.8, v/v), com agitação intermitente. Após centrifugação de 5 min a 13000 rpm, o sobrenadante foi coletado e o sedimento submetido a uma segunda extração lipídica durante 1h. A quantidade de lipídeos totais foi determinada gravitacionalmente. Os lipídeos

extraídos foram analisados por cromatografia de camada fina (TLC) para caracterização e quantificação da sua composição.

#### **4.5- Infecções e tratamentos farmacológicos**

Nos ensaios de infecção, as leveduras foram lavadas e ressuspensas na concentração de  $5 \times 10^8$  ou  $1 \times 10^8$  por ml de HBSS sem cálcio e magnésio (HBSS <sup>-/-</sup>, Sigma-Aldrich) com 20% de soro humano do próprio doador por 1 hora a 37°C para opsonização das mesmas.

Para a infecção de granulócitos, estas células (na concentração de  $3 \times 10^6$  por ml) foram incubadas com os fungos, com Multiplicidade de Infecção (MOI) de 1 granulócito para 5 fungos (MOI 5) ou 1 granulócito para 1 fungo (MOI 1) por 2h em estufa a 37°C. A escolha do MOI foi feita com base na literatura e em resultados previamente obtidos por nosso grupo.

Em alguns ensaios, foram utilizados inibidores farmacológicos. Neste caso, os granulócitos foram incubados por 30 minutos (imediatamente antes da infecção com os fungos) com o antagonista do receptor DP1 (BWA 868c, Cayman Chemicals, 200nM), o antagonista do receptor CRTH2 (Cay10471, Cayman Chemicals, 200nM), o inibidor de prostaglandina sintase hematopoiética (HQL-79, Cayman Chemicals, 10uM), o inibidor de COX (Aspirina, Sigma-Aldrich, 10µg/ml), o inibidor de 15-Lipoxigenase-1 (Inibidor de 15-Lipoxigenase-1, Cayman Chemicals, 5uM) e o inibidor de 5-Lipoxigenase (Zileuton, Cayman Chemicals, 1uM). Como controle, as células foram estimuladas com PGD<sub>2</sub> (25nM, Cayman Chemicals).

#### **4.6- Quantificação da alteração morfológica dos granulócitos (Shape Change)**

Para quantificação das mudanças morfológicas, os granulócitos foram estimulados com os componentes lipídicos derivados dos fungos, os componentes de polissacarídeos da cápsula e os fungos. Para a infecção com os fungos, foram

utilizadas leveduras com MOI 1 e MOI 5. Os granulócitos foram incubadas ou com os fungos, ou com os lipídeos, ou com os polissacarídeos e após 5 minutos a análise das células foi feita imediatamente pelo Citômetro de Fluxo (FACSVerse, BD Biosciences). Foi considerado mudança morfológica o aumento da granulosidade (*Side Scatter* – SSC) juntamente com o aumento do tamanho (*Forward scatter* – FSC) das células estimuladas em comparação com o controle.

#### **4.7- Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos**

Para quantificação de corpúsculos lipídicos dentro dos granulócitos, após as infecções ou estimulações, as células foram lavadas e marcadas com a sonda BODIPY (Life technologies) na diluição de 1/300 por 30 minutos a 1 hora e analisadas em citômetro de fluxo ou por microscopia de fluorescência confocal. Para citometria as células foram ressuspendidas em PBS na concentração de  $1 \times 10^6$  por ml e analisadas no FACSVerse (BD Biosciences). Os histogramas e médias de intensidade de fluorescência foram feitos no software FlowJo (Tree Star Inc). Para microscopia confocal, as lâminas foram montadas em meio *anti-fading* Prolong (Life technologies) e as imagens foram obtidas no Microscópio Leica com aumento de 63x e zoom 9.

#### **4.8- Análise da expressão de PPARgamma**

Cerca de 20 µg da suspensão protéica de cada amostra analisada foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE (em gel gradiente de acrilamida 4-12%) e transferida para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (100mL de 25mM Tris, 192mM glicina pH aproximadamente 8 quando dissolvidos em 80mL de H<sub>2</sub>O MiliQ e 20mL de metanol). A transferência foi feita a 15 Volts por 45 minutos em sistema semi-seco (Trans-Blot Semi Dry). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com solução bloqueadora de leite 5% em TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20). Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST, e incubada por aproximadamente 16 h com o

anticorpo primário anti-PPAR $\gamma$  (Santa Cruz Tech) diluição 1:500, como controle de carregamento, foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-GAPDH (Sigma-Aldrich) concentração de 1:20.000. Após este tempo, as membranas foram lavadas com TBST, e as proteínas de interesse foram então identificadas pela incubação da membrana com anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo (GE Life Sciences), conjugado a peroxidase (HRP) diluídos na hora do uso na concentração de 1:5.000. Todos os anticorpos primários foram diluídos em solução de bloqueio, enquanto os secundários em TBST. A detecção foi feita através da utilização do kit *ECL Prime Detection Reagent* (GE Life Sciences) e a membrana revelada no ImageQuant LAS 4000 (GE Life Sciences). A quantificação das bandas foi feita utilizando o software ImageJ.

#### **4.9- Análise da expressão de NF $\kappa$ B**

Para a análise da expressão de NF $\kappa$ B, as células foram permeabilizadas com Triton X100 (Sigma-Aldrich) 0,2% por 20 minutos, bloqueadas com HBSS<sup>-/-</sup> 2% BSA por 30min, incubadas com anticorpo primário na concentração 1/300 durante aproximadamente 16h e posteriormente com o anticorpo secundário anti-rabbit Alexa 546 (Life Technologies) por 1h. O núcleo foi visualizado através da marcação com DAPI (Life Technologies) na concentração de 1/5000. As lâminas foram montadas em meio *anti-fading* Prolong (Life technologies) e as imagens foram obtidas no Microscópio Leica com aumento de 63x e zoom 9.

#### **4.10- Quantificação das unidades formadoras de colônias**

Para quantificação da atividade antifúngica dos granulócitos, a formação de colônias pelas leveduras após interação com as células foi analisada. Para isso, os granulócitos foram plaqueados em placa de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^6$  células por ml e as infecções e tratamentos farmacológicos

foram realizados. Após a infecção e lise dos granulócitos, foram feitas diluições seriadas das leveduras resultando em uma diluição final de 1/20000 em água destilada. As leveduras diluídas foram então plaqueadas em placas de petri com Sabouraud Dextrose Agar com auxílio de pérolas de vidro estéreis. Após 5 dias as colônias foram enumeradas. Como controle os fungos receberam o mesmo tratamento que as células e os inibidores não interferiram na formação de colônias (dados não mostrados).

#### **4.11- Ensaio de Fagocitose**

Para quantificação da capacidade fagocítica dos granulócitos, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços na concentração de  $3 \times 10^6$  células por ml em lamínulas circulares (Kasvi) e as infecções e tratamentos farmacológicos foram realizados. Após a infecção, as lâminas foram fixadas e coradas pela metodologia de panótico rápido, evidenciando o citoplasma e núcleo celular.

Para contagem de fagocitose foram consideradas as leveduras aderidas à membrana plasmática e no interior dos granulócitos. O índice de fagocitose foi feito através da fórmula  $IF = (\text{Porcentagem de células fagocitando}) \times (\text{Média de leveduras no interior das células})$ .

#### **4.12- Análises Estatísticas**

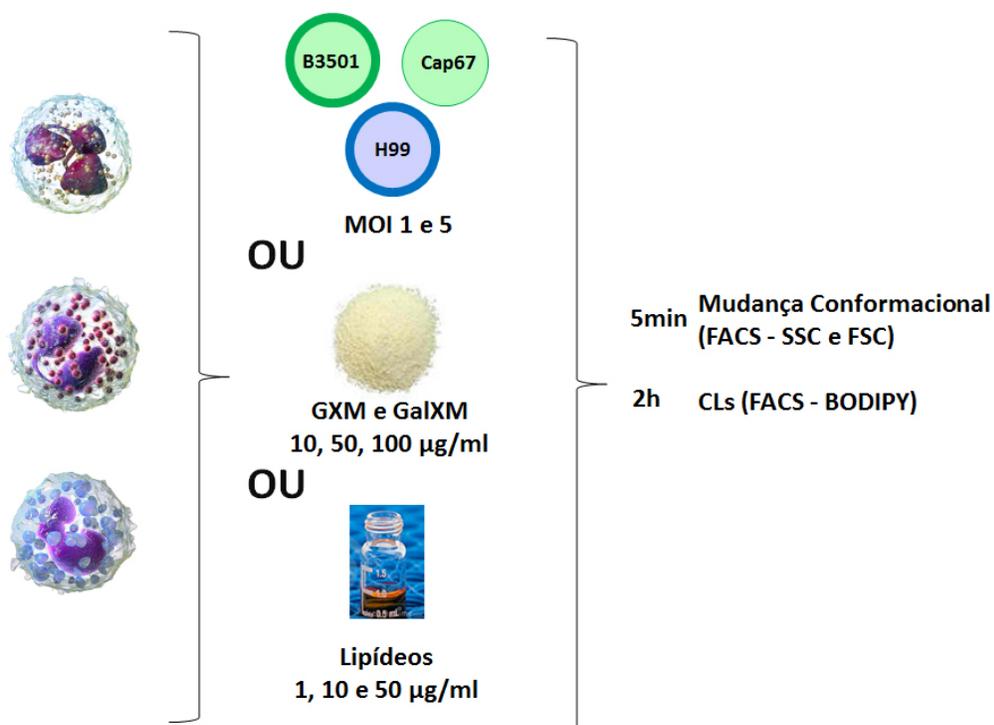
As análises estatísticas foram feitas através do Software Graphpad Prism 5.0 utilizando a comparação *one-way* anova e pós-teste de Tukey, e alternativamente, *test t de student*.

A normalização dos dados de citometria foi feita considerando o controle não estimulado de cada doador como 100% e a partir disso cada estímulo foi contabilizado, tornando possível assim a comparação entre cada doador. Foram considerados os valores de modificações do tamanho, da granulosidade e de t

#### 4.13- Esquema geral das metodologias usadas

##### 4.13.1 – Análise da ativação celular durante a infecção por *C. neoformans* e estímulo por componentes da cápsula e lipídeos totais extraídos das leveduras

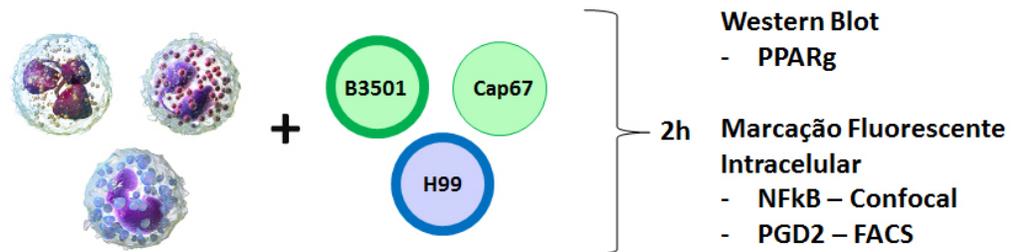
Os granulócitos foram infectados com diferentes MOI das linhagens de *C. neoformans* ou estimulados com diferentes concentrações dos componentes da cápsula ou dos lipídeos totais. Após 5 minutos foram analisados para tamanho (FSC – *Forward Scatter*) e granulosidade (SSC – *Side Scatter*) através de citometria de fluxo ou após 2 horas foram marcados com a sonda BODIPY e a intensidade de fluorescência foi analisada por meio de citometria de fluxo e microscopia confocal.



**Esquema 1:** Resumo da metodologia utilizada para análise da ativação celular de granulócitos durante a infecção por *C. neoformans* e estímulo com componentes da cápsula e lipídeos totais extraídos da levedura.

#### 4.13.2 – Análise da expressão de PGD<sub>2</sub>, NFkB e PPARgamma durante a infecção por *C. neoformans*

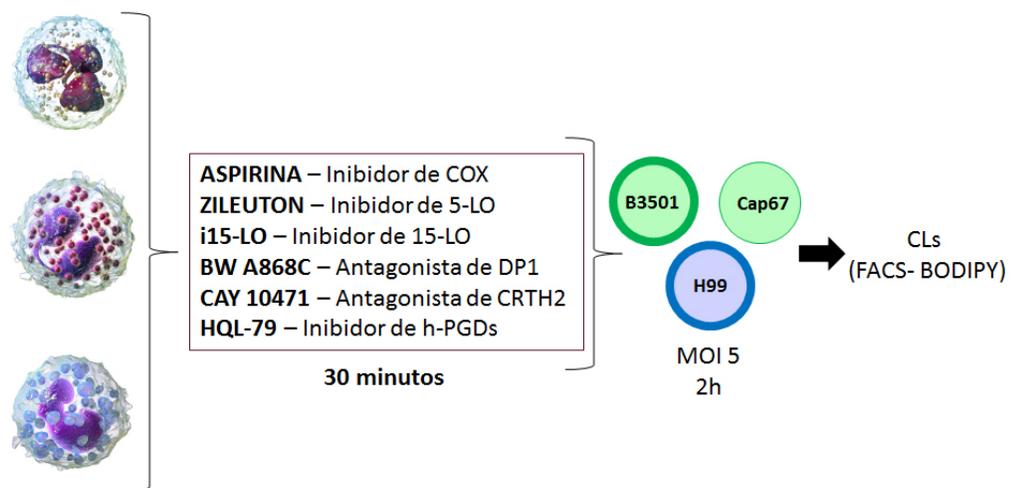
Os granulócitos foram infectados com diferentes MOI das linhagens de *C. neoformans* e após 2 horas a expressão de PPARgamma foi quantificada por Western Blot, a de NFkB foi analisada por Microscopia Confocal e a de PGD<sub>2</sub> foi quantificada por meio de citometria de fluxo.



**Esquema 2:** Resumo da metodologia utilizada para análise da expressão de PPARgamma, NFkB e PGD<sub>2</sub> no interior de granulócitos.

#### 4.13.3 – Análise da via de sinalização envolvida na biogênese de corpúsculos lipídicos durante a infecção por *C. neoformans*

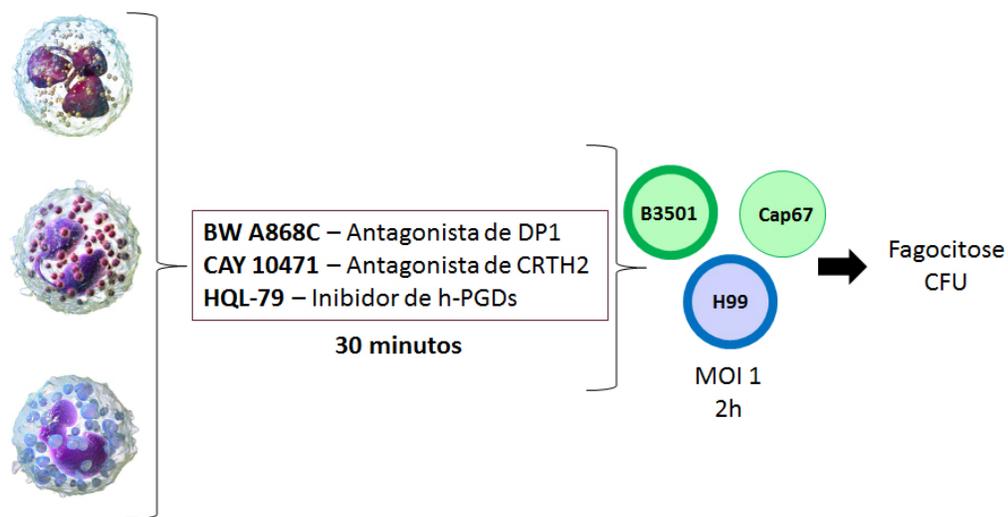
Os granulócitos foram pré-tratados com inibidores de COX, 15-LO, 5-LO, DP1, CRTH2 e h-PGDs e após 30 minutos foram infectados com as diferentes linhagens de *C. neoformans* por 2 horas e a biogênese de corpúsculos lipídicos foi quantificada por citometria de fluxo.



**Esquema 3:** Resumo da metodologia utilizada para análise da via envolvida na biogênese de corpúsculos lipídicos durante a infecção por *C. neoformans*.

#### 4.13.4 – Análise da capacidade fagocítica e citotóxica de granulócitos durante a infecção por *C. neoformans*

Os granulócitos foram pré-tratados com inibidores de DP1, CRTH2 e h-PGDs e após 30 minutos foram infectados com as diferentes linhagens de *C. neoformans* por 2 horas. Após a infecção foi feito ensaio de fagocitose e a enumeração de unidades formadoras de colônias.

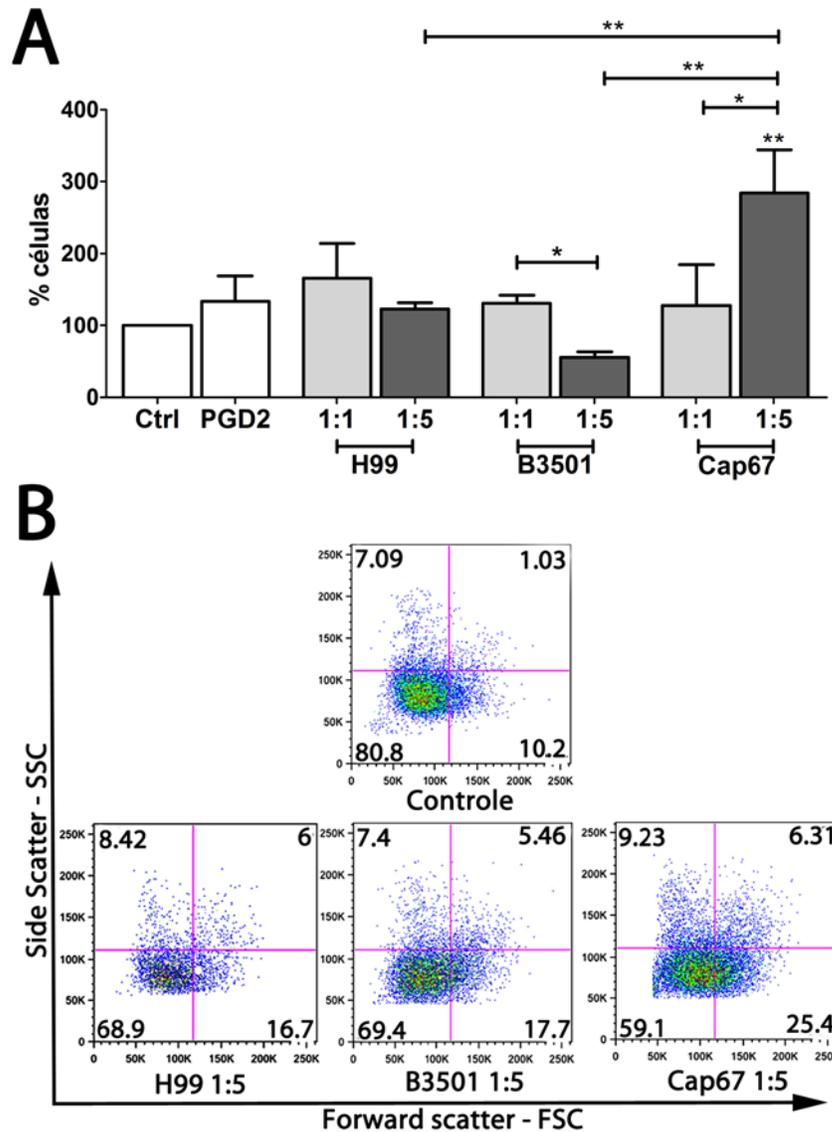


**Esquema 4:** Resumo da metodologia utilizada para análise da capacidade fagocítica e citotóxica de granulócitos durante a infecção por *C. neoformans*

## 5- Resultados

### 5.1 - A cepa mutante para cápsula Cap67 induziu modificação na conformação celular de granulócitos

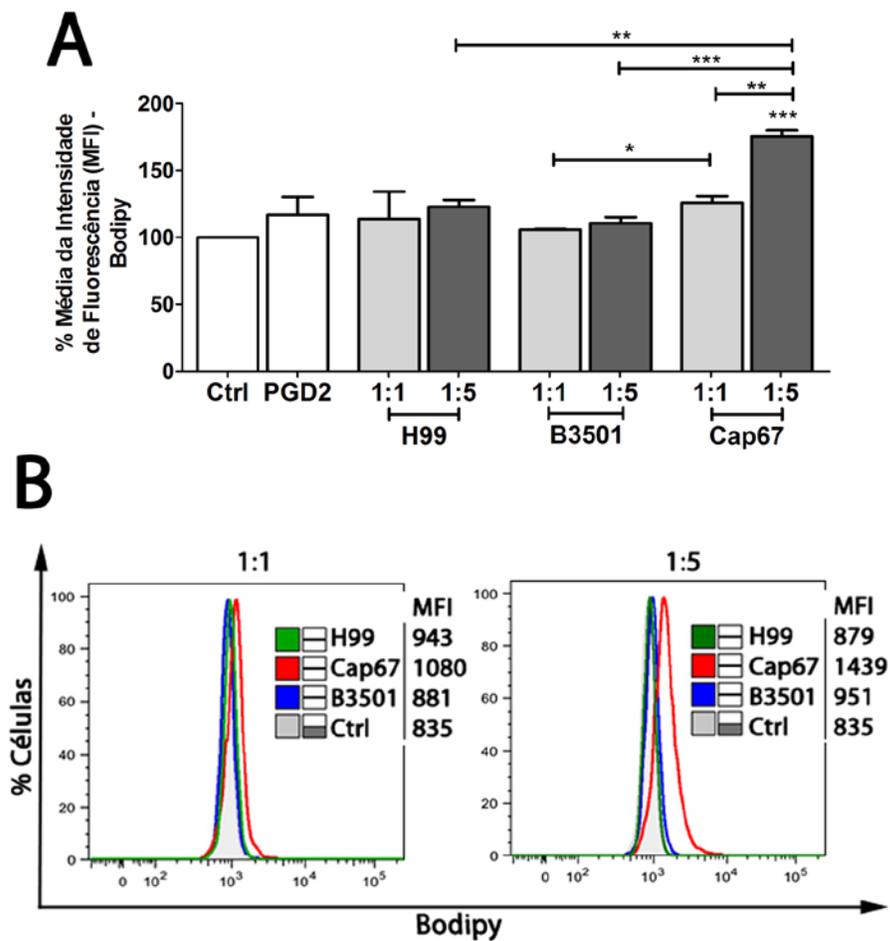
Sabe-se que o aumento do tamanho e da granulosidade de granulócitos caracteriza um processo de ativação celular destas células. Para quantificação da alteração morfológica induzida pela levedura patogênica *C. neoformans*, os granulócitos foram estimulados por 5 minutos com multiplicidade de infecção (MOI) diferentes. A análise foi realizada por citometria de fluxo através da dispersão de luz ocasionada pelo tamanho (*Forward Scatter* – FSC) e granulosidade (*Side Scatter* – SSC) das células. A infecção por *C. neoformans* H99 sorotipo A e B3501 sorotipo D, não induziu um aumento significativo no tamanho e granulosidade das células com relação ao controle não infectado (Fig. 5.1). Entretanto, a utilização de MOI 1 para a infecção com os dois sorotipos B3501 e H99, induziu um perfil maior de ativação celular quando comparado a infecção com MOI 5. De forma bastante significativa, a levedura acapsular Cap67 (MOI 5) induziu alteração na morfologia celular em uma maior porcentagem de células quando comparado ao controle não infectado (Fig. 5.1A). O aumento na granulosidade e tamanho das células induzido por Cap67 (MOI 5) foi significativo também em relação ao Cap67 (MOI 1) e em relação às leveduras capsuladas (MOI 5) H99 e ao seu *background* B3501 (Fig. 5.1A e B).

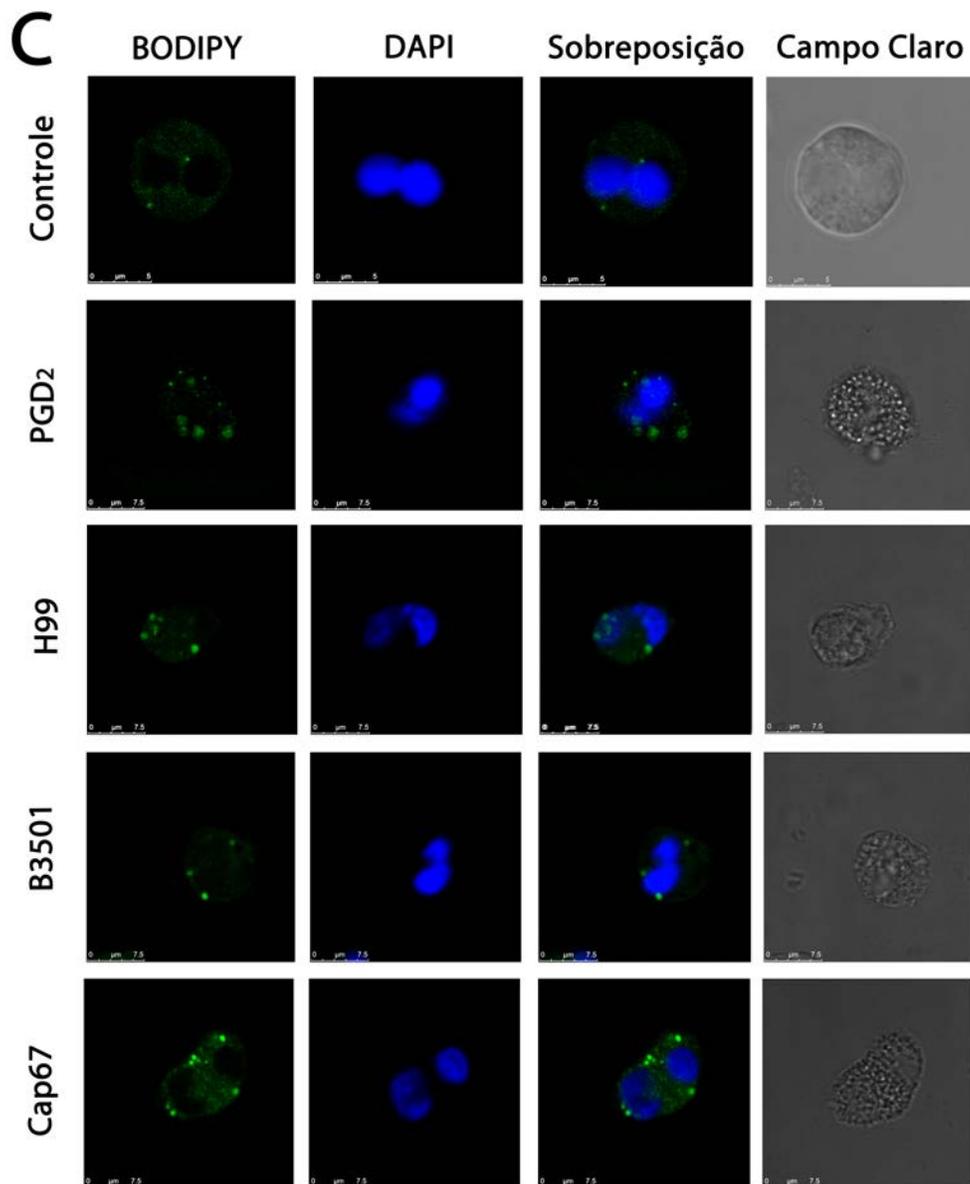


**Figura 5.1:** A cepa mutante de *C. neoformans* Cap67 induz o aumento da granulocidade e tamanho de granulócitos. Granulócitos foram incubados a 37°C com as diferentes cepas de *C. neoformans* e após 5 minutos foram analisados no citômetro de fluxo com os parâmetros de tamanho (*Forward Scatter* – FSC) e a granulocidade (*Side Scatter* – SSC). (A) Normalização da porcentagem de células com aumento da granulocidade e tamanho. (B) Representação por *dotplots* do aumento de tamanho e granulocidade induzida por Cap67. Análise estatística foi feita com resultados de 4 doadores através dos testes *one way* anova e *teste t de student*, \* $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

## 5.2- A cepa acapsular de *C. neoformans* induz o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos em granulócitos

Para entender qual o papel do metabolismo lipídico na infecção por *C. neoformans*, foi realizada uma análise quantitativa, por citometria de fluxo, e qualitativa, por microscopia de fluorescência, da presença de corpúsculos lipídicos em granulócitos. Os granulócitos foram infectados com as cepas H99 e B3501 e seu mutante acapsular Cap67 com diferentes MOI (1 e 5) durante 2 horas. Não houve diferença significativa entre o controle não estimulado e os fungos selvagens H99 e B3501 (MOI 1 e 5) (Fig. 5.2A). Porém, a levedura acapsular Cap67 (MOI 5) induziu um aumento significativo de corpúsculos lipídicos quando comparados às células controle não infectadas, ao seu *background* selvagem B3501 e ao sorotipo H99 (Fig. 5.2 A,B e C).

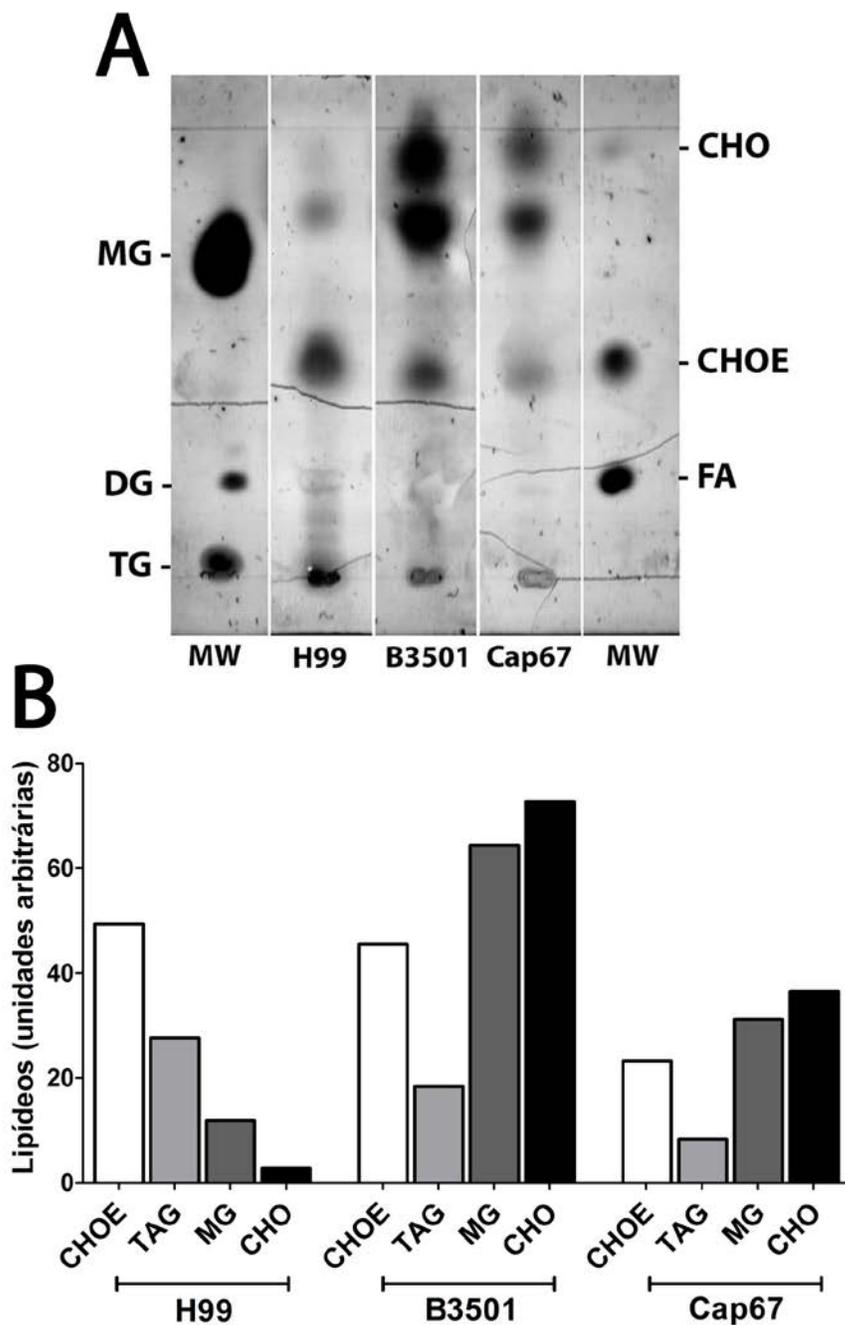




**Figura 5.2: A cepa acapsular de *C. neoformans* Cap67 induziu aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos em granulócitos.** Granulócitos foram incubados a 37°C com as diferentes cepas de *C. neoformans* (MOI 1 e 5) e após 2 horas foram analisados. (A) Normalização do MFI para a sonda BODIPY (FL1-H). (B) Histogramas representativos do aumento da biogênese de corpúsculos. (C) Prancha com imagens de microscopia confocal de fluorescência. Lente objetiva 63x. Aumento 9x. MOI 1. As análises estatísticas foram realizadas com resultados de 3 doadores através do teste *one way anova* e *teste t de student*, \* $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

### **5.3 - As diferentes cepas de *C. neoformans* apresentaram diferenças em sua composição lipídica.**

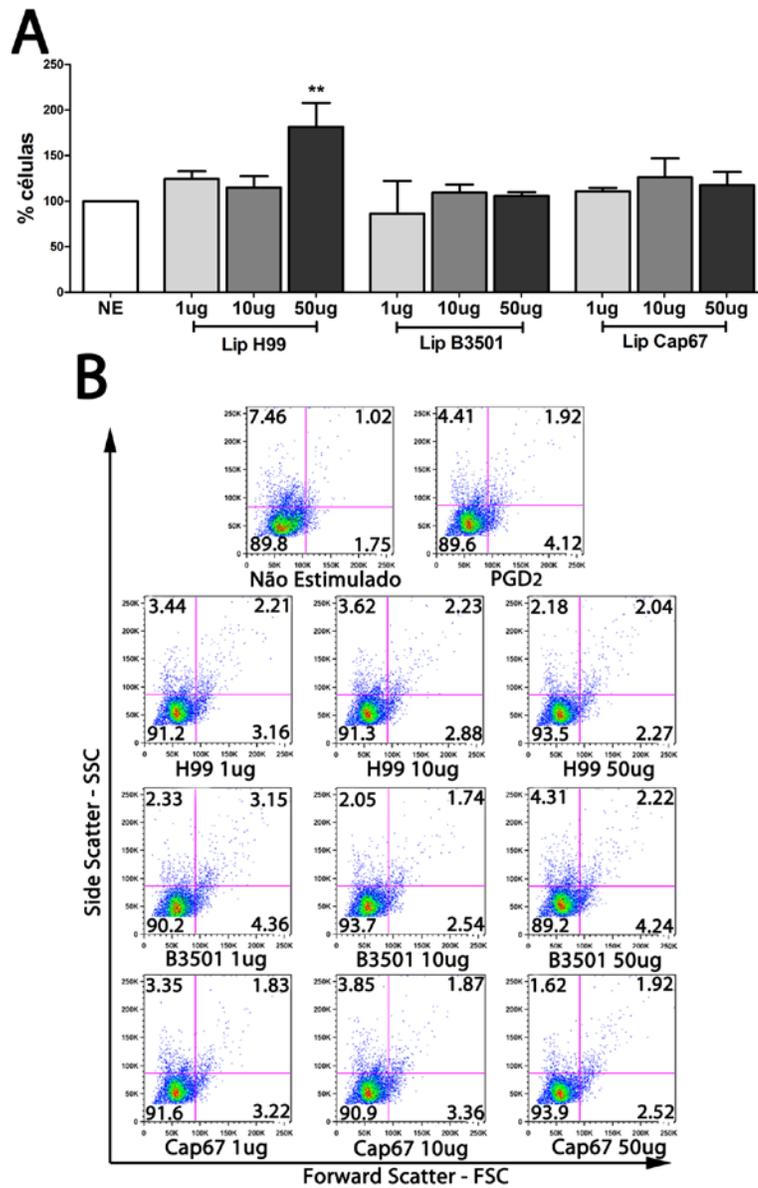
Para análise dos lipídeos totais extraídos das leveduras selvagens (H99 e B3501) e o mutante (Cap67) foi realizada uma análise através da cromatografia de camada líquida (TLC). O sorotipo H99 apresentou níveis significativamente menores de colesterol (CHO) e de monoacilglicerol (MG), e níveis maiores de colesterol éster (CHOE) e triacilglicerol (TG) quando comparado ao sorotipo B3501 (Fig. 5.3). De maneira geral, as cepas B3501 e Cap67 se assemelham muito em composição lipídica, e se diferem apenas em quantidade, uma vez que o mutante acapsular Cap67 apresentou níveis consideravelmente menores dos lipídeos analisados quando comparados com a cepa B3501 (Fig. 5.3). Não foi detectado o lipídeo diacilglicerol (DG) em nenhum dos isolados de *C. neoformans* analisados (Fig. 5.3).



**Figura 5.3: Os lipídeos totais de *C. neoformans* apresentam componentes diferentes entre os sorotipos.** Os lipídeos totais de cada cepa foram extraídos através do protocolo estabelecido por Bligh & Dyer (1959) e caracterizados através da TLC (A) que evidenciou as bandas referentes a cada classe de lipídicos. A bandas da TLC foram quantificadas através da densitometria das bandas (B).

#### **5.4 - Os lipídeos derivados das cepas de *C. neoformans* não modificaram a conformação celular de granulócitos**

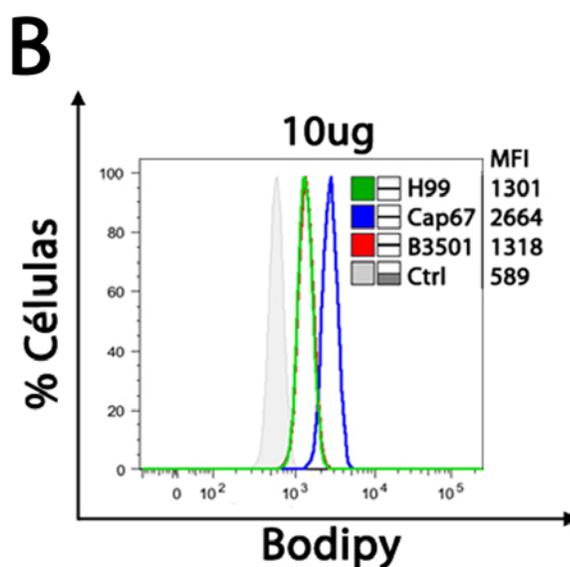
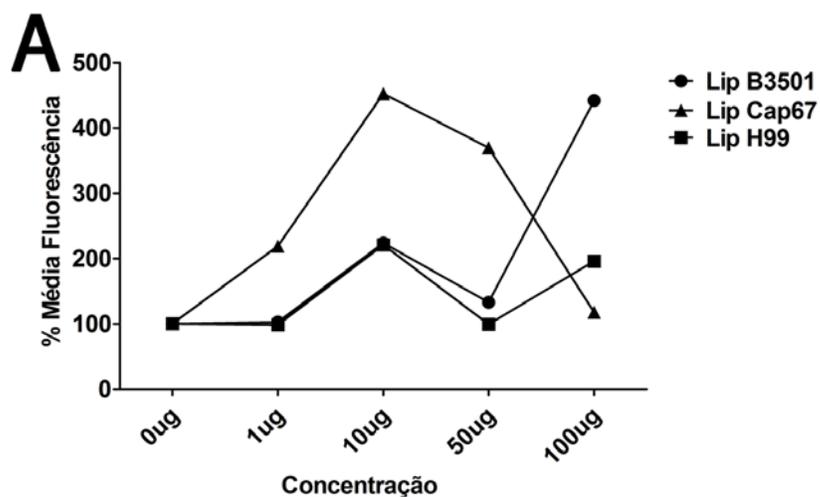
Para saber se a alteração morfológica induzida por Cap67 está relacionada aos lipídeos totais presentes nas leveduras, os granulócitos foram estimulados por 5 minutos com diferentes concentrações dos lipídeos extraídos das diferentes cepas de *C. neoformans*. A análise foi realizada por citometria de fluxo através da dispersão de luz ocasionada pelo tamanho (*Forward Scatter* – FSC) e granulosidade (*Side Scatter* – SSC). Os lipídeos derivados do sorotipo A H99 induziram uma diferença significativa no tamanho e granulosidade dos granulócitos somente na concentração de 50µg por ml quando comparado ao controle, enquanto as células estimuladas com lipídeos derivados do sorotipo D B3501 e com lipídeos derivados das leveduras acapsulares Cap67 não apresentaram diferenças morfológicas significativas quando comparados com o controle não estimulado (Fig. 5. 4A e B).



**Figura 5.4: Os lipídeos totais derivados de *C. neoformans* não modificam a granulocidade e tamanho de Granulócitos.** Granulócitos foram estimulados com 1µg, 10µg ou 50µg por ml de lipídeos e após 5 minutos as células foram analisadas para tamanho (*Forward Scatter* – FSC) e granulocidade (*Side Scatter* – SSC). (A) Porcentagem de células com modificação na granulocidade e tamanho celular. (B) Representação por *dotplots* do tamanho e granulocidade dos granulócitos. A análise estatística foi feita com base nos resultados de 3 doadores através dos testes *one way anova* e *teste t de student*. \*\* p<0,01.

### **5.5 - Os lipídeos derivados das cepas de *C. neoformans* induziram a biogênese de corpúsculos lipídicos em granulócitos**

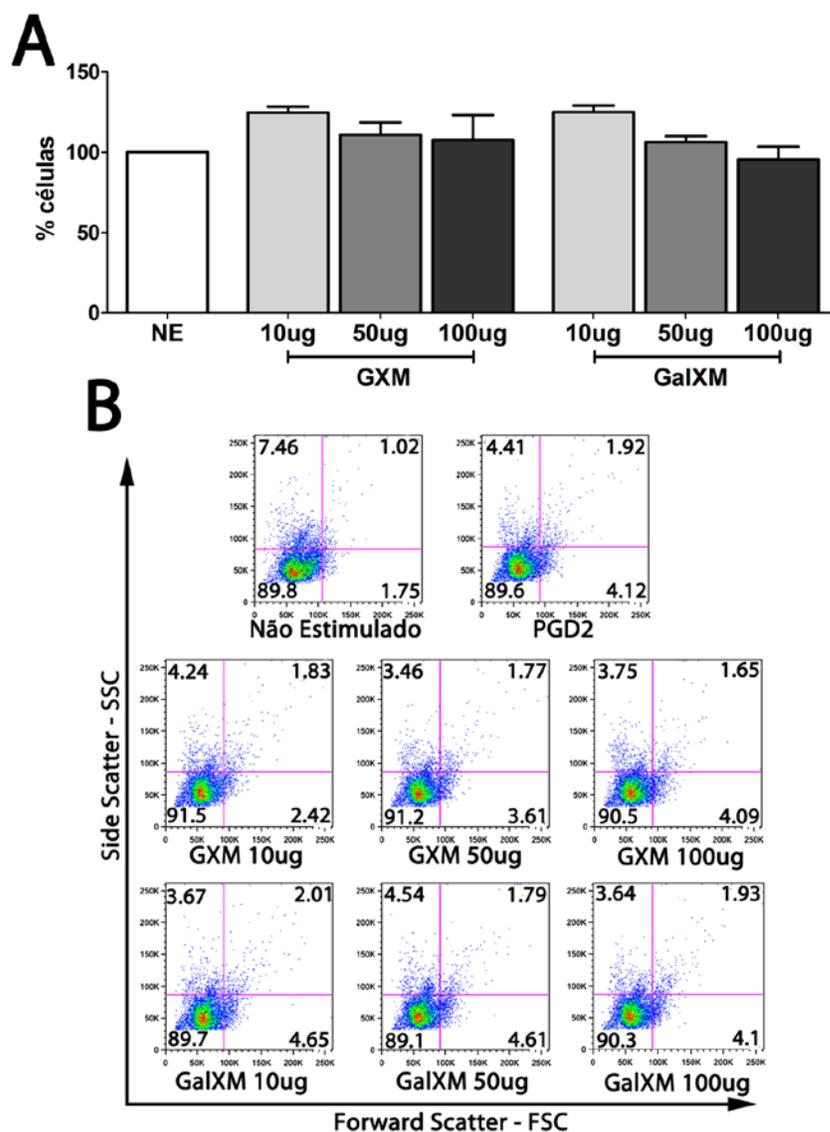
Para saber se o aumento de corpúsculos lipídicos induzido por Cap67 pode ser influenciado pelos lipídeos totais presentes na levedura, os granulócitos foram estimulados por 2 horas com diferentes concentrações de lipídeos e analisados quantitativamente através de citometria de fluxo. Os lipídeos de *C. neoformans* sorotipo A H99 e sorotipo D B3501 induziram o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos em granulócitos quando comparados com as células não estimuladas (Fig 5.5), porém não houve diferença entre estes dois sorotipos. Por outro lado, os lipídeos de Cap67 aumentaram significativamente a biogênese de corpúsculos lipídicos, atingindo o pico máximo em 10µg por ml, em comparação ao seu *background* selvagem B3501 (Fig. 5.5A).



**Figura 5.5:** Os lipídeos totais derivados de *C. neoformans* induzem a **biogênese de corpúsculos lipídicos em granulócitos**. Granulócitos foram estimulados a 37°C com 0µg (controle), 1µg, 10µg ou 50µg por ml de lipídeos derivados das leveduras e após 2 horas foram analisados. (A) Normalização, com relação ao controle 0µg, da média da intensidade de fluorescência (MFI) para a sonda BODIPY (FL1-H). (B) Histogramas evidenciando a diferença no MFI de BODIPY. Experimento realizado com 1 doador.

## **5.6 - Os componentes da cápsula derivados das cepas de *C. neoformans* não modificaram a conformação celular de granulócitos**

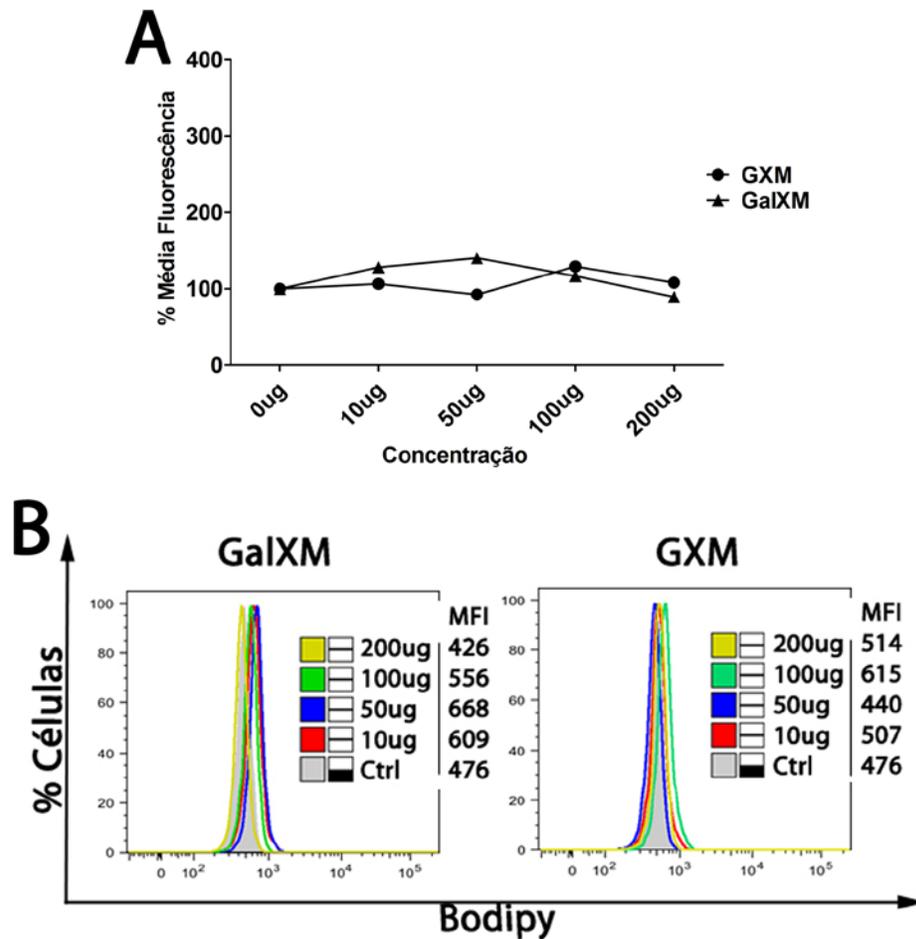
A fim de saber se os principais componentes da cápsula polissacarídica (GXM e GalXM) de *C. neoformans* podem estar envolvidos na alteração morfológica induzida por B3501 MOI 5 (Fig. 5.5A), granulócitos foram estimulados por 5 minutos com diferentes concentrações de GXM e GalXM. A análise foi feita por citometria de fluxo através da dispersão de luz ocasionada pelo tamanho (*Forward Scatter* – FSC) e granulosidade (*Side Scatter* – SSC). Não houve diferença significativa entre as células que foram estimuladas com os componentes da cápsula e as células não estimuladas (Fig. 5.6A e B).



**Figura 5.6: Os componentes da cápsula derivados de *C. neoformans* não modificaram a granulosidade e tamanho de granulócitos.** Granulócitos foram estimulados com 10 $\mu$ g, 50 $\mu$ g e 100 $\mu$ g por ml dos componentes majoritários da cápsula derivada das leveduras e após 5 minutos as células foram analisadas no citômetro para tamanho (*Forward Scatter* – FSC) e granulosidade (*Side Scatter* – SSC). (A) Porcentagem de células com granulosidade e tamanho altos. (B) Representação por *dotplots* do tamanho e granulosidade dos granulócitos. A análise estatística foi realizada com resultados de 2 doadores utilizando o teste *one-way anova* e *teste t de student*.

**5.7- Os componentes da cápsula derivados das cepas de *C. neoformans* não modificaram a biogênese de corpúsculos lipídicos em granulócitos.**

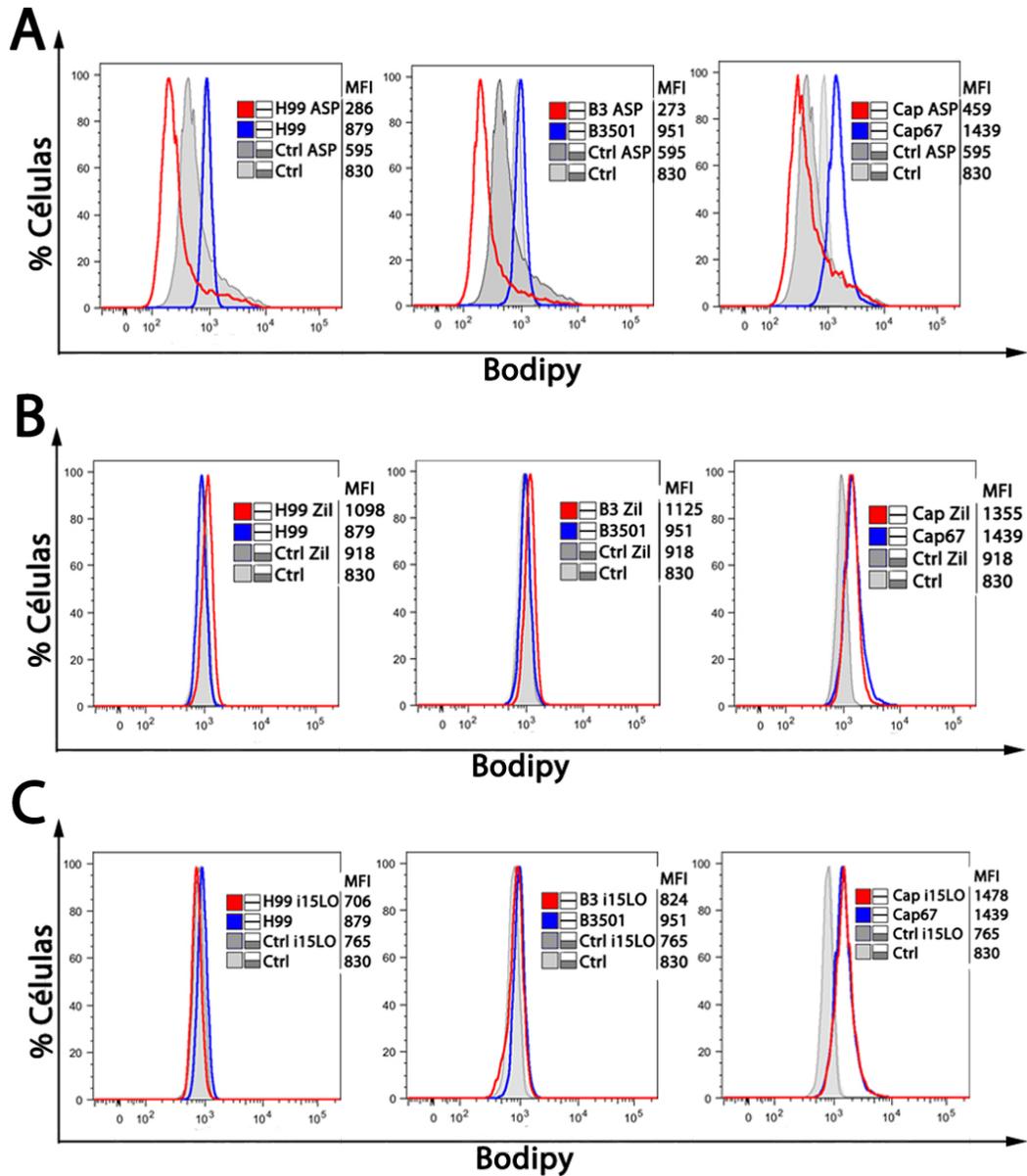
Para saber se os principais componentes da cápsula polissacarídica (GXM e GalXM) podem estar envolvidos em um possível aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos, os granulócitos foram estimulados por 2 horas com diferentes concentrações de GXM e GalXM e a marcação com a sonda bodipy foi analisada quantitativamente através de citometria de fluxo. GalXM e GXM não induziram a biogênese de corpúsculos lipídicos em granulócitos de forma significativa quando comparados as células não estimuladas (Fig. 5.7).



**Figura 5.7: Os componentes da cápsula de *C. neoformans* não induziram a biogênese de corpúsculos lipídicos em granulócitos.** Granulócitos foram estimulados com 10µg, 50µg ou 100µg por ml dos componentes majoritários da cápsula derivados das leveduras. Como controle negativo foi utilizado células não estimuladas (0µg). Após 2 horas a 37°C, as células foram marcadas e analisados para fluorescência da sonda BODIPY. (A) Normalização, com relação ao controle 0µg, da média da intensidade de fluorescência (MFI) para a sonda BODIPY (FL1-H). (B) Histogramas evidenciando a manutenção da média da intensidade de fluorescência de BODIPY. Experimento realizado com 1 doador.

### **5.8 - A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo mutante acapsular Cap67 ocorre de maneira dependente da enzima cicloxigenase (COX), mas independente das enzimas 5-lipoxigenase (5-LO) e 15-lipoxigenase (15-LO)**

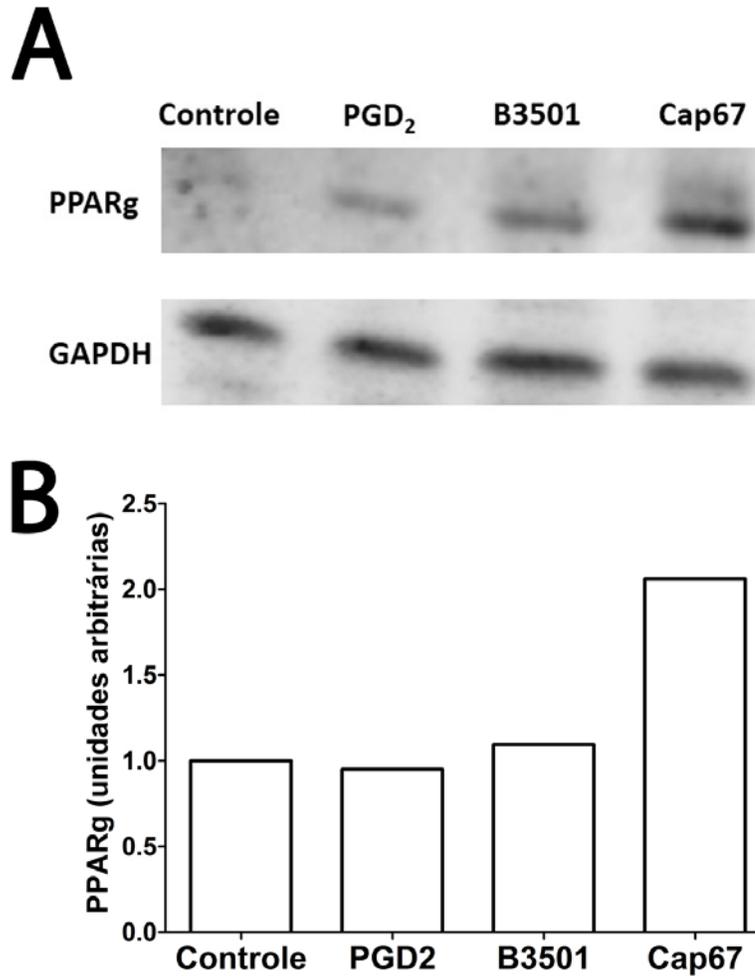
Para caracterizar a via celular pela qual o mutante acapsular *C. neoformans*, Cap67, induz o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos, os granulócitos foram pré-tratados durante 30 minutos com os inibidores de 5-Lipoxigenase (Zileuton), de 15-Lipoxigenase (i15-LO, Inibidor de 15-Lipoxigenase) e de cicloxigenase (Aspirina), enzimas essenciais para a via de síntese de leucotrienos, lipoxinas, e prostaglandinas, respectivamente. Após o pré-tratamento as células foram infectadas com as cepas H99 e B3501 e seu mutante acapsular Cap67 com MOI 5 durante 2 horas a 37°C. As células foram então marcadas com a sonda BODIPY e analisadas quantitativamente através de citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que houve uma diminuição significativa na quantidade de corpúsculos lipídicos nos granulócitos pré-tratados com aspirina, quando comparados com as células não tratadas. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas células infectadas pré-tratadas com zileuton e i15-LO em relação aos granulócitos não tratados. Desta forma, a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo mutante acapsular Cap67 ocorre de maneira dependente da enzima cicloxigenase (COX), mas independente das enzimas 5-lipoxigenase (5-LO) e 15-lipoxigenase (15-LO) (Fig. 5.8).



**Figura 5.8:** A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo mutante acapsular Cap67 ocorre de maneira dependente da enzima cicloxigenase (COX), mas independente das enzimas 5-lipoxigenase (5-LO) e 15-lipoxigenase (15-LO). Granulócitos foram pré-tratados com diferentes inibidores e incubados a 37°C com o mutante acapsular de *C. neoformans* Cap67 (MOI 5) e após 2 horas foram marcados e analisados. Histograma da média da intensidade de fluorescência de corpúsculos para células tratadas com Aspirina (A), i15-LO (B) e Zileuton (C). Dados representativos de 2 doadores.

### **5.9- *C. neoformans* acapsular induz a expressão intracelular de PPARgamma**

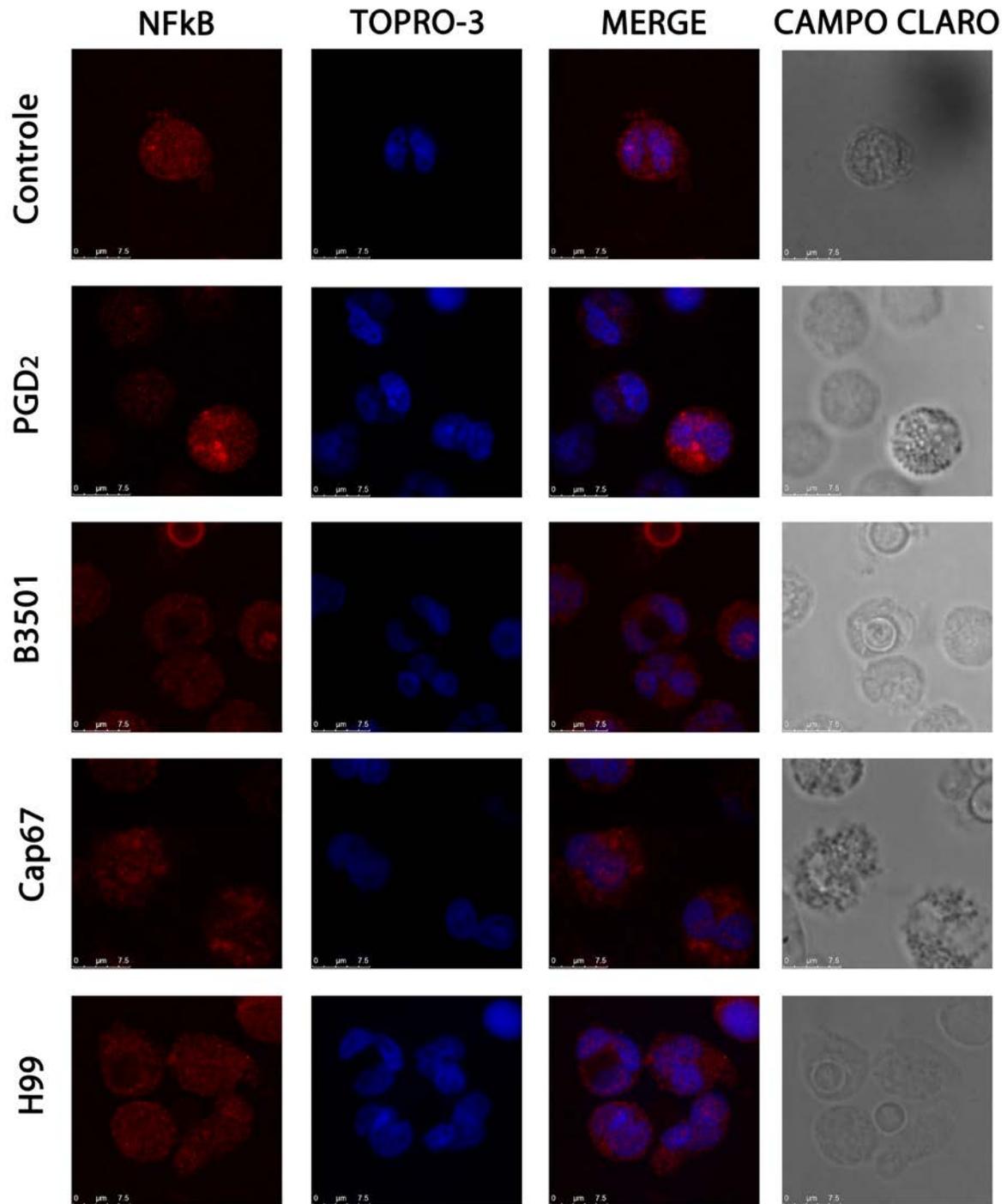
Para saber se *C. neoformans* modifica a expressão de fatores nucleares importantes na inflamação, os granulócitos foram infectados com B3501 e seu mutante acapsular Cap67 com MOI 1 durante 2 horas a 37°C. Após o estímulo as proteínas totais foram extraídas e analisadas através de Western Blotting. Nossos resultados demonstram o aumento da expressão de PPARgamma durante a infecção pela levedura acapsular Cap67 em comparação com o seu *background* B3501, bem como ao controle não infectado (Fig. 5.9)



**Figura 5.9: Cap67 induz o aumento na expressão do receptor nuclear PPARgamma.** Granulócitos foram incubados a 37°C com *C. neoformans* (MOI 1) e após 2 horas as células lisadas e as proteínas analisadas por Western Blot. (A) Expressão de PPARgamma (~50KDa) e GAPDH (37KDa) presentes na membrana de nitrocelulose. (B) Quantificação através da densitometria das bandas.

### **5.10 - *C. neoformans* não induziu translocação de NFkB para o núcleo**

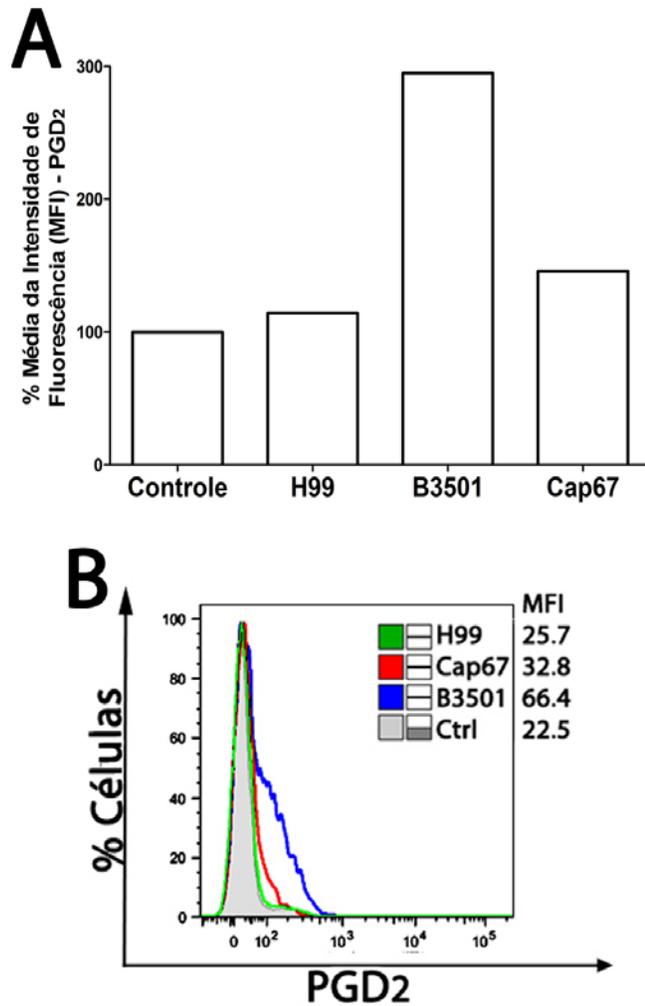
Para saber se *C. neoformans* induz a translocação do fator de transcrição NFkB para o núcleo em granulócitos, os granulócitos foram infectados com sorotipo A H99 e sorotipo D B3501 e seu mutante Cap67 com MOI 1 durante 2 horas a 37°C. Após o estímulo as células foram marcadas para NFkB e analisadas qualitativamente através de microscopia confocal de fluorescência. Não houve diferença significativa entre os diferentes sorotipos de *C. neoformans* (MOI 1 e 5) nem entre as leveduras mutantes em relação ao controle não infectado (Fig. 5.10).



**Figura 5.10:** *C. neoformans* não altera a expressão do fator de transcrição **NFkB**. Granulócitos foram incubados a 37°C com as diferentes cepas de *C. neoformans* (MOI 1 e 5) e após 2 horas foram marcados e analisados. Prancha com imagens do microscópio confocal de fluorescência. Aumento 9x. MOI 5.

### **5.11 - *C. neoformans* sorotipo D B3501 induziu o aumento da expressão de Prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) intracelular em granulócitos**

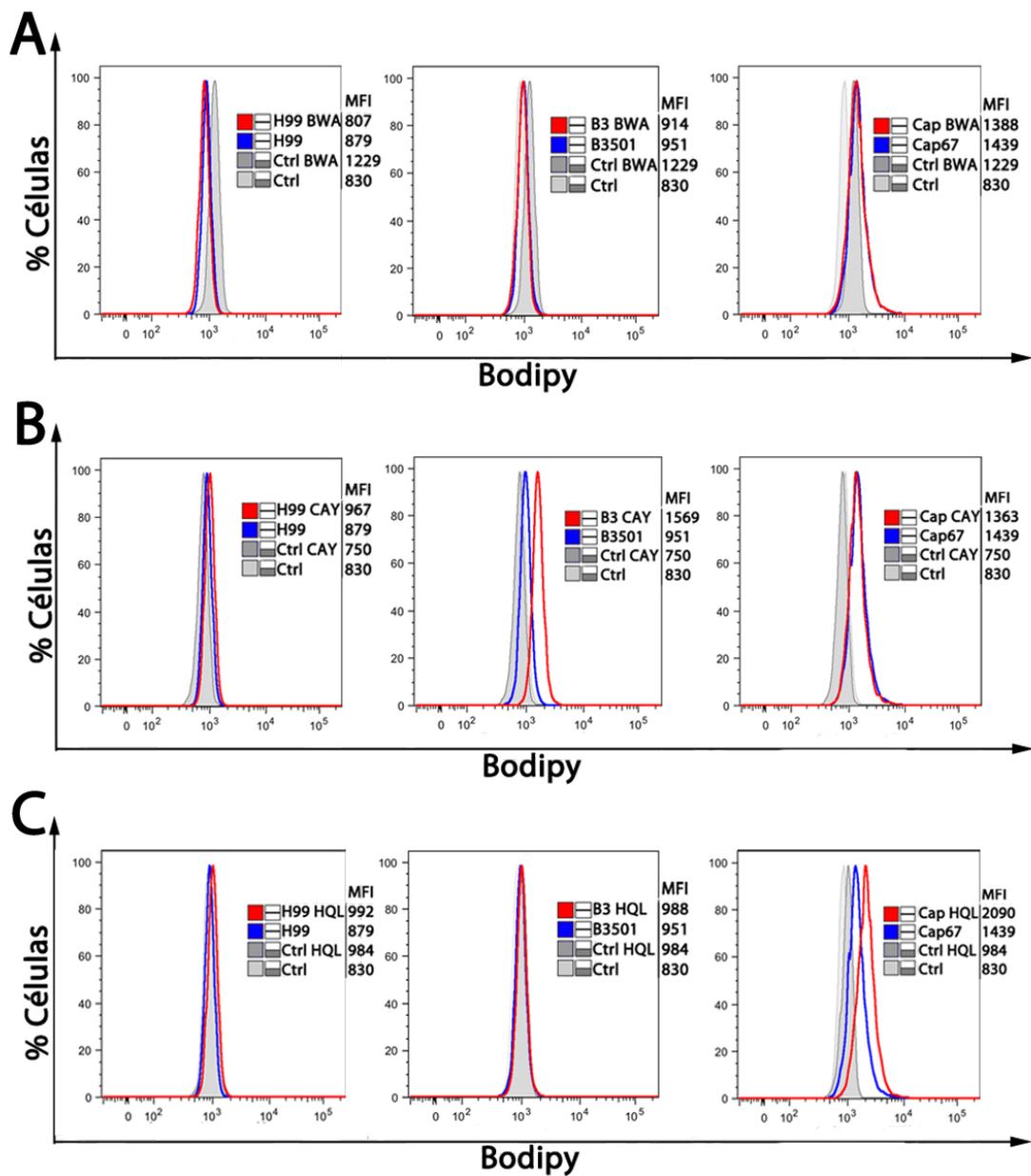
PGD<sub>2</sub> é a principal prostaglandina envolvida na ativação de granulócitos. Desta forma, a expressão intracelular do mediador lipídico PGD<sub>2</sub> foi analisado em granulócitos infectados com *C. neoformans*. Uma vez que este mediador tem importante função em granulócitos. Para isso os granulócitos foram infectados com as cepas H99 e B3501 e seu mutante acapsular Cap67 com MOI 5 durante 2 horas a 37°C. Após o estímulo as células foram permeabilizadas e marcadas para PGD<sub>2</sub> e analisadas quantitativamente por citometria de fluxo. O sorotipo A H99 não induziu o aumento de PGD<sub>2</sub> intracelular, enquanto o sorotipo D B3501 aproximadamente triplicou os níveis intracelulares de PGD<sub>2</sub> dentro dos granulócitos, em comparação ao controle não infectado. A levedura acapsular Cap67 diminuiu significativamente os níveis intracelulares de PGD<sub>2</sub> em comparação ao seu *background* selvagem B3501. (Fig. 5.11).



**Figura 5.11:** *C. neoformans* B3501, sorotipo D, aumenta a expressão intracelular de PGD<sub>2</sub> em granulócitos. Granulócitos foram incubados a 37°C com as diferentes cepas de *C. neoformans* (MOI 5) e após 2 horas foram marcados e analisados. (A) Normalização da média da intensidade de fluorescência (MFI) para PGD<sub>2</sub>. (B) Histograma da fluorescência de PGD<sub>2</sub>. Experimento realizado com 1 doador.

### **5.12 - A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo mutante acapsular Cap67 ocorre de maneira independente dos receptores DP1, CRTH2 e da enzima Prostaglandina sintase (h-PGDS)**

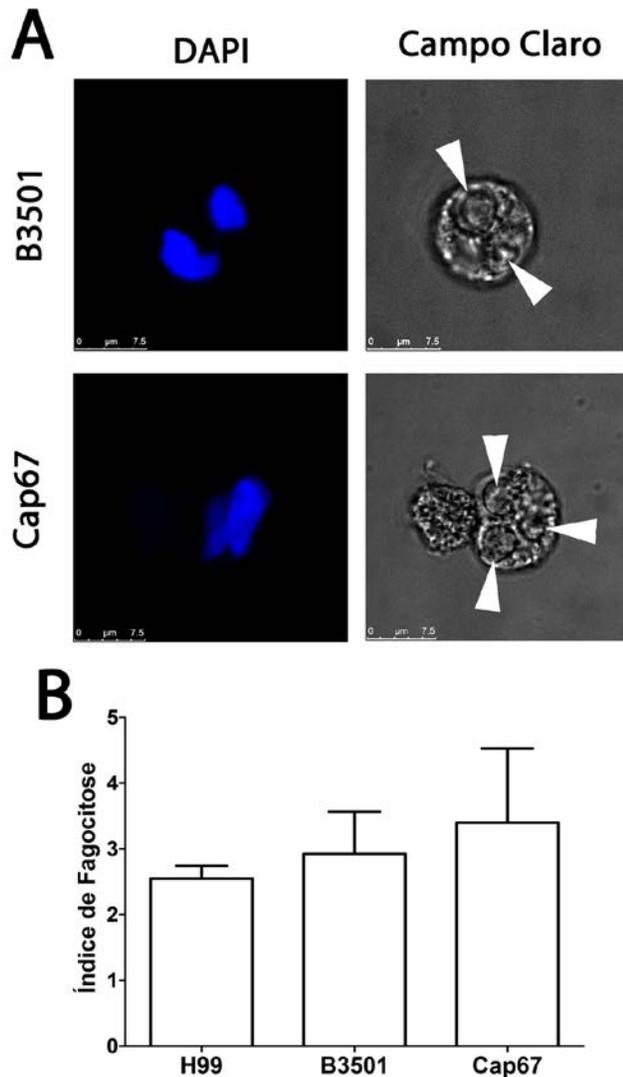
Uma vez que *C. neoformans* foi capaz de induzir o aumento da produção de PGD<sub>2</sub>, o passo seguinte foi analisar qual a influência dos receptores de prostanóides DP1 e CRTH2 e da enzima h-PGDS no aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos, induzidos por Cap67. Para isso os granulócitos foram pré-tratados durante 30 minutos com os antagonistas dos receptores DP1 (BWA 868c) e CRTH2 (CAY 10471), além do inibidor de h-PGDS (HQL-79). Após o pré-tratamento as células foram infectadas com as cepas H99 e B3501 e seu mutante acapsular Cap67 com MOI 5 durante 2 horas a 37°C. As células foram então marcadas com a sonda BODIPY e analisadas quantitativamente através de citometria de fluxo. Não foram observadas diferenças significativas nas células pré-tratadas com BWA868c e CAY 10471 em relação aos granulócitos não tratados quando infectados por Cap67. A inibição de h-PGDS favoreceu o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos em granulócitos infectados pela levedura acapsular. Desta forma, a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo mutante acapsular Cap67 ocorre de maneira independente dos receptores DP1 e CRTH2, bem como de h-PGDS (Fig. 5.12).



**Figura 5.12: A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por Cap67 ocorre de maneira independente dos receptores DP1 e CRTH2 e da h-PGDS.** Granulócitos foram pré-tratados com diferentes inibidores e incubados a 37°C com as diferentes cepas de *C. neoformans* (MOI 5) e após 2 horas foram marcados e analisados (MOI 5). Histograma da média da intensidade de fluorescência de corpúsculos para células tratadas com BWA868c (A), CAY10471 (B) e HQL-79 (C). Dados representativos de 5 doadores.

### **5.13 – Granulócitos foram capazes de fagocitar as diferentes cepas de *C. neoformans***

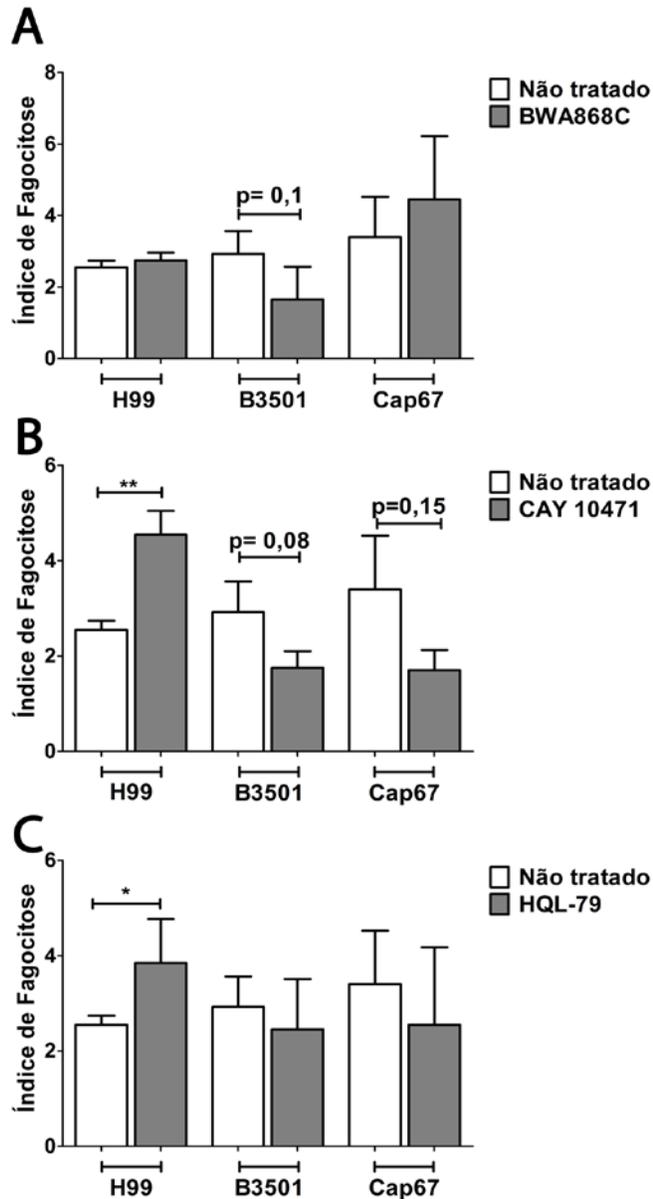
A fim de se conhecer a capacidade de granulócitos de fagocitar as diferentes cepas de *C. neoformans*, as células foram infectadas com H99 e B3501 e seu mutante Cap67 com MOI 1 durante 2 horas a 37°C. Após a infecção as células foram coradas e contagem das leveduras internalizadas ou aderidas na membrana dos granulócitos foi realizada. Os resultados demonstraram que as leveduras selvagens e mutante são fagocitadas pelos granulócitos de forma muito semelhante, mantendo índices de fagocitose próximos (Fig. 5.13).



**Figura 5.13: Granulócitos são capazes de fagocitar as diferentes cepas de *C. neoformans*.** Granulócitos foram incubados a 37°C com as diferentes cepas de *C. neoformans* (MOI 1) e após 2 horas foram corados e as células fagocitárias e as leveduras internalizadas foram contados. (A) Fotografias do microscópio confocal de fluorescência evidenciando leveduras (cabeças de seta) internalizadas pelas células; (B) Índice de fagocitose para cada cepa de *C. neoformans*. O experimento foi realizado com 2 doadores. As análises estatísticas foram realizadas com resultados de triplicata técnica através do teste *one way anova* e *teste t de student*.

#### **5.14 – A fagocitose das diferentes cepas de *C. neoformans* foi diferencialmente modulada pela via da PGD<sub>2</sub>**

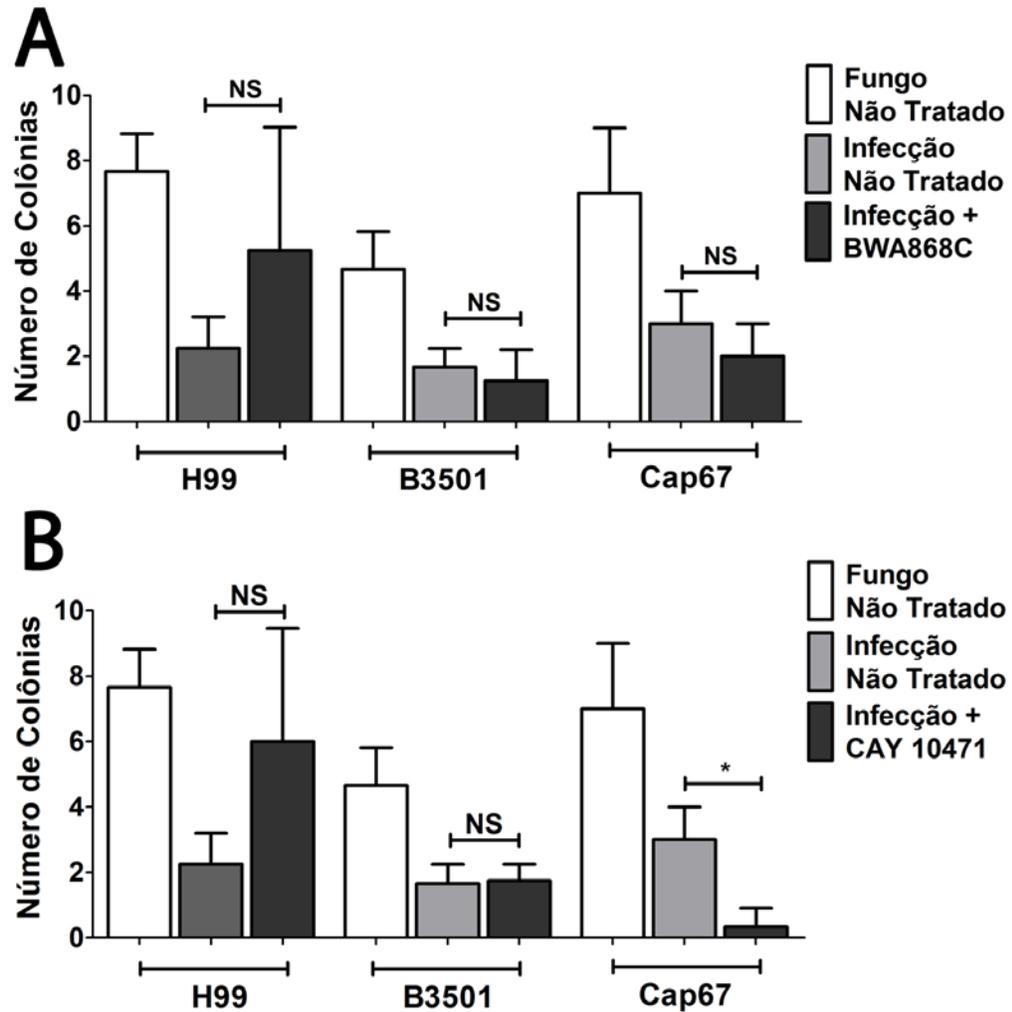
Considerando a influência da via das prostaglandinas na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por *C. neoformans*, o próximo passo foi a quantificação do índice de fagocitose de granulócitos quando tratados com os antagonistas de DP1 (BWA868c) e CRTH2 (CAY10471) e inibidor de h-PGDS (HQL-79) para o conhecimento acerca da influência dessa via na fagocitose de *C. neoformans*. A inibição de DP1 não alterou o índice fagocítico de granulócitos quando infectados com *C. neoformans* H99, entretanto essa inibição foi importante para a fagocitose do sorotipo D B3501 quando comparados a células não tratadas. Não há alteração significativa na fagocitose da levedura mutante Cap67 de células tratadas com BWA868C em comparação a células não tratadas (Figura 5.15 A). O receptor CRTH2, por sua vez, é importante para a fagocitose de B3501 e seu mutante Cap67, enquanto ele não participa da fagocitose do sorotipo A H99 uma vez que ele induziu um aumento na capacidade fagocítica de células tratadas com CAY 10471 quando comparadas a células não tratadas (Figura 5.15 B). Da mesma forma que nas células tratadas com CAY 10471, nas células tratadas com HQL-79 a capacidade fagocítica para H99 aumentou quando comparada a células não tratadas (Figura 5.15 C). Dessa forma, a fagocitose por granulócitos de *C. neoformans* H99 é induzida com a inibição de CRTH2 e h-PGDS, enquanto a fagocitose de B3501 é dependente dos receptores DP1 e CRTH2 e independente de HQL-79. Para o mutante acapsular a fagocitose por granulócitos é dependente do receptor CRTH2.



**Figura 5.14: A fagocitose das diferentes cepas de *C. neoformans* é diferencialmente modulada pela via das prostaglandinas.** Granulócitos foram pré-tratados e infectados com as diferentes cepas de *C. neoformans* (MOI 1) e após 2 horas foram corados e as células fagocitárias e as leveduras internalizadas foram contados. Índice de fagocitose de células tratadas com BWA868c (A), CAY10471 (B) e HQL-79 (C) para cada cepa de *C. neoformans*. O experimento foi realizado com 2 doadores. As análises estatísticas foram realizadas com resultados de triplicata técnica através do teste *one way* anova e *teste t de student*, \* $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

### **5.15 – A morte de *C. neoformans* selvagem induzida por granulócitos é independente dos receptores DP1 e CRTH2**

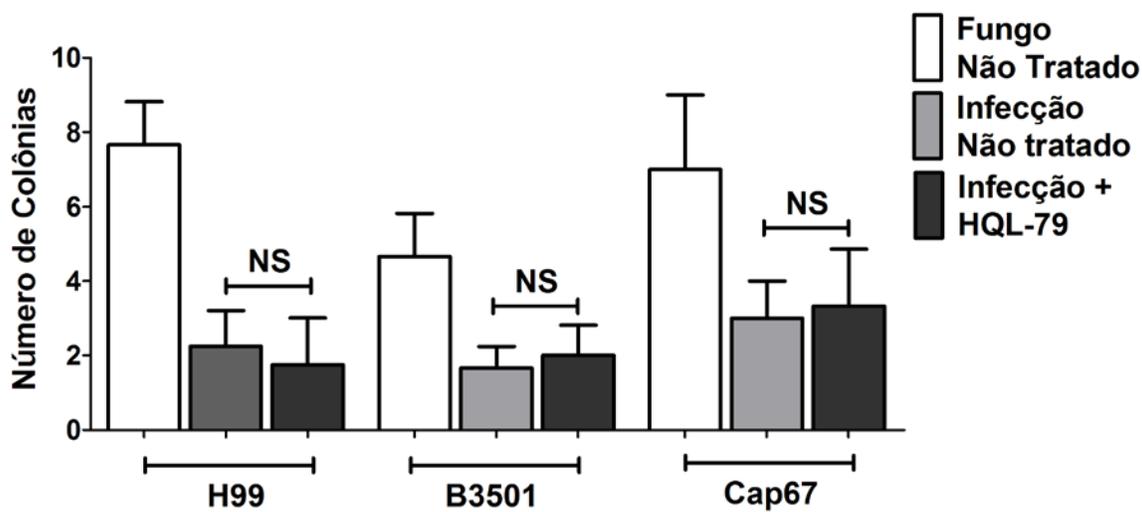
Para saber a influência dos receptores de PGD<sub>2</sub>, DP1 e CRTH2, na morte de *C. neoformans* por granulócitos, as células foram pré-tratadas durante 30 minutos com os antagonistas de DP1 (BWA868c) e CRTH2 (CAY10471). Após o pré-tratamento as células foram infectadas com H99 e B3501 e seu mutante Cap67 com MOI 1 durante 2 horas a 37°C. Após a infecção as células foram lisadas e as colônias formadas pelos fungos foram quantificadas. Independentemente do sorotipo, os granulócitos foram capazes de inviabilizar mais de 50% das leveduras. Os resultados demonstraram que os receptores DP1 e CRTH2 são dispensáveis na morte de *C. neoformans* induzida por granulócitos (Fig. 5.15). A inibição de CRTH2 favorece a morte de Cap67 ocasionada pelos granulócitos em comparação às células não tratadas (Fig. 5.15B). Os inibidores não modificaram a viabilidade das leveduras (Dado não mostrado).



**Figura 5.15: Os receptores de prostanóides DP1 e CRTH2 não interferiram na morte de *C. neoformans* selvagem induzida por granulócitos.** Granulócitos foram incubados a 37°C com as diferentes cepas de *C. neoformans* (MOI 1) e após 2 horas foram lisados e as leveduras foram crescidas para quantificação de unidades formadoras de colônias (CFU). Gráficos mostrando a quantidade de colônias formadas após a interação de *C. neoformans* com células tratadas ou não com BWA868c (A) e CAY 10471 (B). Os dados foram adquiridos através da triplicata técnica de 2 doadores diferentes e análise estatística foi feita através do teste one-way anova e teste t. \* $p < 0,05$  NS: Não significativo

### 5.16 – A morte de *C. neoformans* induzida por granulócitos é independente da enzima mediadora da síntese de PGD<sub>2</sub>, h-PGDS

Para saber a influência da síntese interna de Prostaglandina D<sub>2</sub> na morte de *C. neoformans* por Granulócitos, as células foram pré-tratadas durante 30 minutos com o inibidor de h-PGDs (HQL-79). Após o pré-tratamento as células foram infectadas com H99 e B3501 e seu mutante Cap67 com MOI 1 durante 2 horas a 37°C. Após a infecção as células foram lisadas e as colônias formadas pelos fungos foram quantificadas. H-PGDS é dispensável para função citotóxica de granulócitos quando infectados por *C. neoformans*. O inibidor não modificou a viabilidade das leveduras (Dado não mostrado).



**Figura 5.16: h-PGDs não interfere na morte de *C. neoformans* induzida por granulócitos.** Granulócitos foram incubados a 37°C com as diferentes cepas de *C. neoformans* (MOI 1) e após 2 horas foram lisados e as leveduras foram crescidas para quantificação de unidades formadoras de colônias (CFU). Gráficos mostrando a quantidade de colônias formadas após a interação de *C. neoformans* com células tratadas ou não com HQL-79. Os dados foram adquiridos através da triplicata técnica de 2 doadores diferentes e análise estatística foi feita através do teste one-way anova e teste t. NS: Não significativo

## 6- Discussão

O presente trabalho visou caracterizar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ativação de granulócitos por *C. neoformans*, analisando o papel da cápsula e do metabolismo lipídico celular nesse processo.

Sabe-se que o aumento do tamanho e da granulosidade de granulócitos caracteriza um processo de ativação celular destas células, através do aumento da produção de grânulos, os quais contêm diversas substâncias microbidas e moduladoras da resposta imunológica e inflamatória como citocinas, histaminas, heparina, eicosanóides, entre outras. O aumento de tamanho dos granulócitos ocorre em decorrência do aumento do volume do citoplasma destas células. Assim, o primeiro objetivo deste trabalho foi verificar a modificação conformacional de granulócitos induzida pela infecção por *C. neoformans* e caracterizar através de quais mecanismos essa modificação pode ocorrer. Nossos dados demonstraram que a levedura mutante acapsular Cap67 induz ao aumento significativo do tamanho e granulosidade de granulócitos, enquanto a cepa selvagem B3501 não teve este efeito. De acordo com Sobroe e colaboradores (2009), as mudanças conformacionais também resultam de rearranjo no citoesqueleto e estão relacionados à migração de células da circulação para os locais de inflamação e também podem estar relacionadas com um aumento no volume celular. Dessa forma, o a cepa selvagem, B3501, pode estar inibindo enquanto Cap67 pode estar induzindo a mudança conformacional de células. O sorotipo A, H99, é a cepa mais virulenta e encontrada na maioria dos casos de AIDS (Franzot *et al.*, 1999) e não induz a mudança conformacional de granulócitos. Esses dados indicam que o fungo capsulado não induz a ativação celular através da mudança conformacional, o que pode favorecer o crescimento fúngico.

Outro importante marcador de ativação celular é a biogênese dos corpúsculos lipídicos. Não há nada descrito na literatura sobre a modulação na biogênese de corpúsculos lipídicos induzidos por *C. neoformans*. No presente trabalho, foi observado que os sorotipos A (H99) e D (B3501) não aumentaram a biogênese de corpúsculos lipídicos de forma significativa, enquanto a levedura

acapsular Cap67 aumentou consideravelmente a quantidade e tamanho destas organelas no interior dos granulócitos. Os corpúsculos lipídicos são marcadores de ativação celular e estão relacionados a diversos processos inflamatórios e produção de mediadores lipídicos inflamatórios e citocinas (Bozza & Viola, 2010). Assim, nossos dados indicam que a presença da cápsula do fungo está relacionada com um mecanismo de escape, induzindo uma diminuição da produção de grânulos e da biogênese de corpúsculos lipídicos, desta maneira *C. neoformans* reduziria a geração de substâncias microbidas, citocinas, substâncias vasoativas e mediadores inflamatórios.

Dados na literatura indicam que os corpúsculos lipídicos podem ser utilizados pelos patógenos como fonte de alimento (Melo *et al.*, 2011) ou até mesmo como mecanismo de transporte, reprodução e escape da resposta imunológica por patógenos (Herker & Ott, 2011). *C. neoformans* tem a capacidade de se reproduzir no interior de células (Coelho *et al.*, 2013; Srikanta *et al.*, 2014; Zaragoza *et al.*, 2011) e assim, *C. neoformans* pode também utilizar os lipídeos no interior dos corpúsculos lipídicos para manutenção do seu ciclo de vida e persistência intracelular.

Considerando que a cepa acapsular foi capaz de induzir significativo aumento da granulosidade e tamanho dos granulócitos, bem como aumento da biogênese dos corpúsculos lipídicos, tornou-se necessário saber quais moléculas poderiam estar envolvidas neste processo. De fato nossos resultados mostraram que os lipídeos isolados de todos os fungos são capazes de aumentar a biogênese de corpúsculos lipídicos. Porém, os lipídeos derivados da cepa acapsular Cap67 aumentaram significativamente a abundância destas organelas no interior dos granulócitos, indicando que a ausência da cápsula expõe lipídeos fúngicos que estariam envolvidos na indução da ativação de granulócitos. Entretanto, estes lipídeos não estão envolvidos no aumento da formação de grânulos e de tamanho dos granulócitos.

Posteriormente analisamos se os componentes da cápsula, GXM e GalXM, poderiam estar modulando a biogênese de corpúsculos lipídicos e o aumento da granulosidade e tamanho dos granulócitos. Nossos resultados

indicaram que nem GXM nem GalXM foram capazes de induzir resposta de ativação de granulócitos. Esses resultados eram esperados, pois é sabido que a cápsula é o maior mecanismo de evasão da resposta imunológica, inibindo a fagocitose e estresse oxidativo, o que foi verificado pela utilização de leveduras acapsulares (Chang *et al.*, 1994; Naslund *et al.*, 1995; Feldmesser *et al.*, 2000). O polissacarídeo mais presente na cápsula é o GXM (90-95%) e atualmente tem sido descrito como o componente principal da cápsula, enquanto GalXM está envolvido no transporte de GXM para o espaço extracelular e formação de cápsula em leveduras filhas (De Jesus *et al.*, 2009).

A via das prostaglandinas tem importante papel em processos pró- e anti-inflamatórios (Pettipher, 2008; Arima & Fukuda, 2011) e está envolvida em processos como resposta a patógenos, alergias, e câncer. A fim de se entender através de quais vias de sinalização ocorre biogênese de corpúsculos lipídicos durante a infecção por *C. neoformans*, nós investigamos o papel das vias das prostaglandinas, através de COX, na biogênese dos corpúsculos lipídicos. Nossos dados indicaram que a enzima COX participa significativamente do processo de indução da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por Cap67. Segundo Sanding (2007) o bloqueio da produção de prostaglandinas pela inibição de COX reduz significativamente a resposta inflamatória. Já foi descrito que corpúsculos lipídicos são sítios de síntese para prostaglandinas (Bozza *et al.*, 2009). Esses dados corroboram a hipótese de que a biogênese de corpúsculos lipídicos seja um importante mecanismo celular para o controle da infecção por *C. neoformans*, através da indução de uma inflamação efetiva e protetora.

De forma semelhante, a produção de leucotrienos é um importante mecanismo de ativação da resposta inflamatória. A produção de leucotrienos é iniciada pela enzima 5-LO e 15-LO, e resultam na produção de leucotrienos e lipoxinas, importantes mediadores lipídicos envolvidos em processos importantes como recrutamento de células e vasodilatação (Peters-Golden & Henderson, 2007). Assim, investigamos se a via dos leucotrienos, através das enzimas 5-LO e 15-LO, seria importante na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pela cepa acapsular de *C. neoformans*. A inibição de 5-LO e 15-LO não influenciou na

biogênese de corpúsculos lipídicos durante a infecção. Esses resultados demonstraram que a via dos leucotrienos não é essencial na infecção por *C. neoformans* com relação à criação de uma resposta inflamatória induzida pelos corpúsculos lipídicos.

NFκB está relacionado com a transcrição de diversos genes relacionados a apoptose, proliferação, migração e inflamação (Baeuerle & Henkel, 1994) e em decorrência do estímulo o NFκB ativo é translocado para o núcleo (Hyldahl et al., 2012). Nossos dados indicaram que a infecção por *C. neoformans* não induziu a translocação de NFκB para o núcleo, que pode indicar que outros fatores de transcrição podem estar envolvidos na ativação do metabolismo lipídico e expressão de citocinas e proteínas importantes na resposta imunológica induzida por *C. neoformans*. Em contraste ao NFκB, PPARγ é um receptor nuclear envolvido em diversas vias do metabolismo celular e quando é ativado se torna um fator de transcrição, controlando a expressão de genes envolvidos na adipogênese, metabolismo lipídico e homeostase (Ahmadian et al., 2013). Alguns metabólitos da Prostaglandina D<sub>2</sub>, como a 15d-PGJ<sub>2</sub>, pode se ligar a PPARγ resultando na sua ativação e consequente modulação do metabolismo lipídico celular (Forman et al., 1995; Sanding et al., 2007;). Em granulócitos infectados por Cap67 houve um aumento na expressão de PPARγ, indicando a função desse fator de transcrição durante a infecção e modulação do metabolismo lipídico de forma dependente da cápsula do fungo *C. neoformans*.

Dentro do contexto de modulação do metabolismo lipídico, a PGD<sub>2</sub>, se destaca como tendo diversas funções na inflamação, em especial em granulócitos, como ações anti- e pró-inflamatórias descritas na resposta imunológica (Sanding et al., 2007). Além disso, esses mediadores são frequentemente sintetizados dentro dos corpúsculos lipídicos (Bozza et al., 2009). No presente trabalho, foi observado que *C. neoformans* do sorotipo D é capaz de induzir o aumento de PGD<sub>2</sub> intracelular e o seu mutante Cap67 diminui significativamente a produção deste mediador. Em contraste, *C. neoformans* do sorotipo A, o qual é mais virulento não induziu o aumento de PGD<sub>2</sub>. Esses resultados demonstram que a

PGD<sub>2</sub> pode estar envolvida de formas diferentes na infecção por *C. neoformans* e deve ser expressa em uma quantidade ideal para controle da infecção. O excesso ou a falta pode resultar em uma resposta imunológica não protetiva. Não há muitos relatos na literatura sobre a função de PGD<sub>2</sub> na infecção fúngica, entretanto a função de outras prostaglandinas é vastamente descrita para *C. neoformans* (Erb-Downward & Huffnagle, 2007; Qiu *et al.*, 2012), *Aspergillus fumigatus* (Kupfahl *et al.*, 2011), *Candida albicans* (Noverr *et al.*, 2001; Erb-Downward & Noverr, 2007) e *Histoplasma capsulatum* (Pereira *et al.*, 2013). PGE<sub>2</sub> em especial tem função imunossupressora, induzindo o aumento da resposta anti-inflamatória, e está relacionada a evasão da resposta imunológica pelo patógeno (Valdez *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2013).

A inibição da enzima h-PGDS, a qual participa da síntese da PGD<sub>2</sub>, induziu um aumento maior na biogênese de corpúsculos lipídicos na infecção por Cap67, indicando que a produção de PGD<sub>2</sub> pelo fungo selvagem pode estar envolvida na contenção da resposta inflamatória, através da manutenção do número de corpúsculos lipídicos. De fato, a PGD<sub>2</sub> está relacionada com a resolução da inflamação em alguns modelos de infecção e de neoplasias (Sanding *et al.*, 2007).

Os principais receptores de PGD<sub>2</sub>, DP1 e CRTH2, possuem funções opostas na resposta celular inflamatória. Quando CRTH2 é bloqueado, a PGD<sub>2</sub> se liga prioritariamente a DP1, resultando no aumento de cAMP e bloqueio da ativação celular, o que desfavorece a resposta antifúngica (Stebbins *et al.*, 2010). Já quando DP1 é inibido aumenta a ativação mediada por CRTH2, resultando na diminuição de cAMP e indução da ativação celular (Arima & Fukuda, 2011). Enquanto o receptor DP1 controla funções celulares como produção de citocinas e mediadores lipídicos, CRTH2 controla a mudança conformacional, respostas quimiotáticas e degranulação celular. De forma geral, DP1 está associado a inibição da resposta celular, enquanto CRTH2 na ativação celular (Arima & Fukuda, 2011).

No presente trabalho, verificamos a influência dos receptores DP1 e CRTH2 na biogênese de corpúsculos lipídicos. Nós observamos que a inibição de

ambos os receptores, DP1 e CRTH2, não interferiu na biossíntese dessas organelas, indicando que a sinalização gerada por estes receptores não participa na expressão de moléculas envolvidas na formação dos corpúsculos lipídicos.

A fagocitose é um processo importante da iniciação da resposta inflamatória e a resposta imunológica a patógenos intracelulares. Neste trabalho, nós investigamos a capacidade fagocítica e citotóxica de granulócitos na infecção por *C. neoformans*, verificando o papel dos receptores DP1 e CRTH2 e da h-PGDS nessa atividade. Sabe-se que granulócitos possuem atividade anticriptocócica (Mambula *et al.*, 2000). De fato, nossos resultados também demonstraram uma ação tóxica dessas células, de forma que os fungos que foram internalizados pelo granulócitos tiveram sua viabilidade diminuída em aproximadamente 50% em comparação ao controle de crescimento dos fungos, não havendo diferença entre os diferentes sorotipos ou com o mutante acapsular.

Estudos que usaram linhagens acapsulares mostraram que a cápsula tem função de diminuir a fagocitose por macrófagos (Price & Perfect, 2011). Entretanto, nossos resultados demonstraram que H99 e B3501, fungos capsulares, são fagocitados de forma similar ao acapsulado. Isso pode ser explicado devido ao fato de que, mesmo com a presença de cápsula, a fagocitose ocorre posteriormente a opsonização das leveduras com proteínas do sistema complemento (Seider *et al.*, 2010). Dentre os sorotipos, os receptores de PGD<sub>2</sub> tiveram papéis diferentes. Os receptores DP1 e CRTH2 contribuem em conjunto para a fagocitose de B3501, enquanto na infecção por Cap67 somente o receptor CRTH2 é influente no englobamento dessa levedura acapsular. Para o sorotipo A, H99, a inibição de CRTH2 favoreceu o aumento no índice de fagocitose, o que pode indicar uma maior ativação do receptor DP1, que pode estar envolvido no reconhecimento dessa linhagem. Além disso, a inibição da h-PGDS também favoreceu a fagocitose, contribuindo para o fato de que a PGD<sub>2</sub> pode estar influenciando negativamente na infecção por *C. neoformans* H99.

Outro parâmetro importante a ser analisado é formação de unidades formadoras de colônias de fungos após a interação com granulócitos tratados ou não com os inibidores relacionados à via da PGD<sub>2</sub>. A citotoxicidade de

granulócitos pode ocorrer através da liberação do conteúdo dos grânulos no fagossoma ou no meio extracelular, impossibilitando o crescimento de patógenos fagocitados (Urban *et al.*, 2006). Nossos resultados demonstraram que a sinalização de PGD<sub>2</sub> pelos receptores e a síntese desse eicosanoide não interferem na capacidade citotóxica de granulócitos durante a infecção por *C. neoformans*, sendo somente a morte de Cap67 favorecida quando o receptor CRTH2 é inibido. Outros estudos são necessários para investigar se outro receptor, menos específico, estaria envolvido na função citotóxica, como o receptor de tromboxano (TX) (Schuligoi *et al.*, 2010). Não há relatos na literatura sobre a função de PGD<sub>2</sub> no combate a infecções por *C. neoformans*, sendo somente descrito que o fungo é capaz de produzir PG para evadir a resposta imunológica.

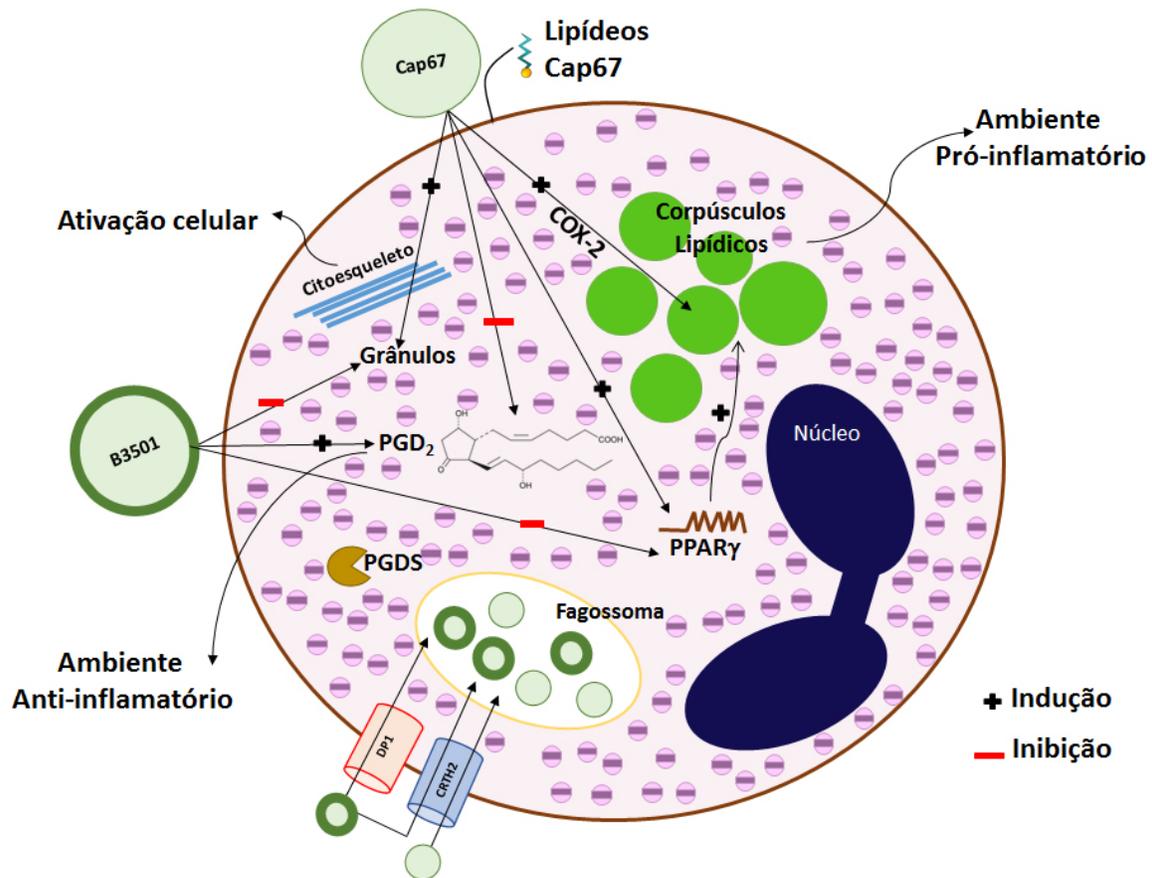
Levando em consideração que neutrófilos não expressam quantidades significativas de CRTH2, supõe-se que os efeitos inibitórios de PGD<sub>2</sub> são mediados por DP1 (Sanding *et al.*, 2007) e a inibição de CRTH2 está influenciando de forma mais significativa a resposta de eosinófilos. Assim, os efeitos mediados pelo receptor CRTH2 na fagocitose de Cap67 podem estar sendo mediados em grande parte por eosinófilos.

No presente trabalho conseguimos descrever uma função anti-inflamatória de PGD<sub>2</sub> durante a infecção de *C. neoformans*, e o bloqueio da síntese de PGD<sub>2</sub> ou da via de sinalização dessa molécula pode auxiliar no controle da infecção. Esses dados descrevem mais uma via de escape da resposta imunológica pelo fungo *C. neoformans* induzida pela cápsula polissacarídica. Mais estudos acerca da função da via da PGD<sub>2</sub> no estabelecimento e disseminação da infecção por *C. neoformans* precisam ser realizados, de forma que todos os mecanismos envolvidos sejam elucidados e novos alvos terapêuticos possam sejam descritos.

## 7 - Conclusões

- *C. neoformans* é capaz de induzir a ativação celular de granulócitos;
- A levedura acapsular Cap67 é capaz de induzir o aumento de grânulos intracelulares em granulócitos;
  - Nossos dados mostraram pela primeira vez que o mutante acapsular Cap67 induz o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos e que esse aumento é devido, em parte, pelo lipídeo total derivado do fungo;
  - Determinamos através de qual via os corpúsculos lipídicos são sintetizados durante a infecção por *C. neoformans* Cap67 e concluímos que o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos é dependente da via das prostaglandinas (COX) e independente da via dos leucotrienos (5-LO e 15-LO);
  - Observamos a indução da expressão de PGD<sub>2</sub> no interior de granulócitos pela infecção por *C. neoformans* B3501 e a consequente diminuição dessa expressão na infecção pela levedura acapsular Cap67;
  - Identificamos que a infecção por *C. neoformans* modula a expressão do receptor nuclear e fator de transcrição PPAR<sub>γ</sub> e não induz na translocação de NFκB em granulócitos;
  - Descrevemos que granulócitos são capazes de fagocitar os diferentes sorotipos e o mutante e que a capacidade fagocítica é dependente da ativação ou inibição de receptores de prostaglandina, principalmente CRTH2;
  - Documentamos que os granulócitos são capazes de matar os diferentes sorotipos e o mutante e essa capacidade de eliminação do patógeno é independente da via das PGD<sub>2</sub>;
  - Identificamos que a PGD<sub>2</sub> sintetizada por granulócitos pode ter função anti-inflamatória na infecção por *C. neoformans*, favorecendo a manutenção e proliferação do patógeno;
  - Nossos dados demonstram pela primeira vez que *C. neoformans* é capaz de modular a biogênese de corpúsculos lipídicos, a ativação do receptor PPAR<sub>γ</sub>, e de modular a via de sinalização de PGD<sub>2</sub>, como mecanismo de escape através da presença da sua cápsula, induzindo uma resposta inflamatória ineficaz.

As principais contribuições deste trabalho acerca dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória de granulócitos na infecção por *C. neoformans* selvagem e seu mutante acapsular estão sumarizados no modelo proposto abaixo:



**Figura 7.1: Modelo de ativação celular de granulócitos durante a infecção por *C. neoformans* selvagem e mutante acapsular.** A infecção pelo mutante acapsular Cap67 induz a criação de um ambiente pró-inflamatório, através do aumento da indução da biogênese de corpúsculos lipídicos, ativação de PPARgamma, formação de grânulos celulares, e diminuição de PGD<sub>2</sub>, favorecendo a eliminação do patógeno. Em contraste, a infecção pela levedura selvagem B3501 não induz a biogênese de corpúsculos lipídicos, formação de grânulos e ativação de PPARgamma, e induz o aumento da expressão de PGD<sub>2</sub>, favorecendo a criação de um ambiente anti-inflamatório e a consequente manutenção da permanência do fungo.

## 8 - Referências Bibliográficas

Ahmadian, M.; Suh, J.M.; Hah, N., Liddle, C.; Atkins, A.R.; Downes, M. & Evans, R.M. (2013). PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good the bad and the future. *Nature medicine*, 19.

Akira, S.; Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801.

Amulic, B.; Cazalet, C.; Hayes, G.L.; Metzler, K.D. & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology*, 30, 459–89.

Aratani, Y.; Kura, F.; Watanabe, H.; Akagawa, H.; Takano, Y.; Ishida-Okawara, A.; Suzuki, K. *et al.* (2006). Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defence against *Cryptococcus neoformans*. *Journal of medical microbiology*, 55(Pt 9), 1291–9.

Arima, M. & Fukuda, T. (2011). Prostaglandin D<sub>2</sub> and T(H)<sub>2</sub> inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. *The Korean journal of internal medicine*, 26(1), 8–18. Baeuerle, P. A. & Henkel, T. (1994). Function and Activation of NF $\kappa$ B in the Immune System. *Annual review of immunology*, 12, 141–179.

Bandeira-Melo, C.; Serra, M.F.; Diaz, B.L.; Cordeiro, R.S.B.; Silva, P.M.R.; Lenzi, H.L.; Bakhle, Y.S. *et al.* (2000). Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandin E<sub>2</sub> and Lipoxin A<sub>4</sub> Accelerate Resolution of Allergic Edema in *Angiostrongylus costaricensis*-Infected Rats: Relationship with Concurrent Eosinophilia. *The Journal of Immunology*, 164(2), 1029–1036.

Barish, G.D.; Narkar, V.A. & Evans, R.M. (2006). PPAR $\delta$ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 116, 590–597.

Blanchard, C. & Rothenberg, M.E. (2009). *Biology of the eosinophil. Advances in immunology* (1st ed., Vol. 101, pp. 81–121). Elsevier Inc.

Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8):911-7.

Bozza, P.T., Magalhães, K.G., & Weller, P.F. (2009). Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(6), 540–51.

Chang, Y.C., & Kwon-Chung, K.J. (1994). Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Molecular and cellular biology*, 14(7), 4912–9.

- Chen, K. & Kolls, J.K. (2013). T Cell-Mediated Host Immune Defenses in the Lung. *Annual reviews of immunology*, 605–633.
- Cherniak, R., Morris, L.C., Anderson, B.C., & Meyer, S.A. (1991). Facilitated isolation, purification, and analysis of glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 59(1), 59–64.
- Coelho, C.; Bocca, A. L. & Casadevall, A. (2014). The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. *Annual review of pathology*, 9, 219–38.
- Cohen, M.S., Isturiz, R.E., Malech, H.L., Root, R.K., Wilfert, C.M., Gutman, L., & Buckley, R.H. (1981). Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi. *The American journal of medicine*, 71(1), 59–66.
- De Jesus, M.; Nicola, A. M.; Rodrigues, M. L.; Janbon, G. & Casadevall, A. (2009). Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylomannan. *Eukaryotic cell*, 8(1), 96–103.
- Del Poeta, M. & Casadevall, A. (2012). Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. *Mycopathologia*, 173(5-6), 303–10.
- Dong, Z. M. & Murphy, J. W. (1996). Cryptococcal polysaccharides induce L-selectin shedding and tumor necrosis factor receptor loss from the surface of human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 97(3), 689–98.
- Ellerbroek, P.M.; Ulfman, L.H.; Hoepelman, A.I. & Coenjaerts, F.E.J. (2004). Cryptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium. *Cellular microbiology*, 6(6), 581–92.
- Erb-Downward, J.R., & Huffnagle, G.B. (2007). *Cryptococcus neoformans* produces authentic prostaglandin E2 without a cyclooxygenase. *Eukaryotic cell*, 6(2), 346–50.
- Erb-Downward, J.R., Noggle, R.M., Williamson, P.R., & Huffnagle, G.B. (2008). The role of laccase in prostaglandin production by *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*, 68(6), 1428–37.
- Erb-Downward, J.R., & Noverr, M.C. (2007). Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 75(7), 3498–505.
- Evans, R.M., Barish, G.D., & Wang, Y.X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nature medicine*, 10(4), 355–61.
- Feldmesser, M; Casadevall, A; Kress, Y.; Spira, G. & Orlofsky, A. (1997). Eosinophil-*Cryptococcus neoformans* interactions in vivo and in vitro. *Infection and immunity*, 65(5), 1899–907.

- Feldmesser, M; Kress, Y. & Casadevall, A. (1998). Effect of antibody to capsular polysaccharide on eosinophilic pneumonia in murine infection with *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of infectious diseases*, 177(6), 1639–46.
- Feldmesser, M; Kress, Y. & Casadevall, A. (2001). Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 8), 2355–65.
- Feldmesser, M; Kress, Y; Novikoff, P. & Casadevall, A. (2000). *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infection and immunity*, 68(7), 4225–37.
- Forman, B.M.; Tontonoz, P.; Chen, J.; Brun, R.P.; Spiegelman, B.M. & Evans, R.M. (1995). 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 is a ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR $\gamma$ . *Cell*, 83, 803–812.
- Franzot, S.P.; Salkin, I.F. & Casadevall, A. (1999). *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. *Journal of clinical microbiology*, 37(3), 838–849.
- García-Rodas, R. & Zaragoza, O. (2012). Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 64(2), 147–61.
- Garro, A.P.; Chiapello, L.S.; Baronetti, J.L. & Masih, D.T. (2011). Rat eosinophils stimulate the expansion of *Cryptococcus neoformans*-specific CD4(+) and CD8(+) T cells with a T-helper 1 profile. *Immunology*, 132(2), 174–87.
- Giles, S.S., Dagenais, T.R.T., Botts, M.R., Keller, N.P. & Hull, C.M. (2009). Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(8), 3491–500.
- Griffiths, E.J., Kretschmer, M., & Kronstad, J.W. (2012). Aimless mutants of *Cryptococcus neoformans*: Failure to disseminate. *Fungal Biology Reviews*, (3 mm).
- Haeggström, J.Z., & Funk, C.D. (2011). Lipxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chemical reviews*, 111(10), 5866–98.
- Herker, E. & Ott, M. (2012). Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions. *The Journal of biological chemistry*, 287(4), 2280–7.
- Hogan, S.P.; Rosenberg, H.F.; Moqbel, R.; Phipps, S.; Foster, P.S.; Lacy, P.; Kay, A.B. et al. (2008). *Eosinophils: biological properties and role in health and disease*. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 38, pp. 709–50).

- Holmer, S.M.; Evans, K.S.; Asfaw, Y.G.; Saini, D.; Schell, W.A.; Ledford, J.G.; Frothingham, R. *et al.* (2013). Impact of surfactant protein D, interleukin-5, and eosinophilia on Cryptococcosis. *Infection and immunity*, 82(2), 683–93.
- Huffnagle, G.B.; Boyd, M.B.; Street, N.E. & Lipscomb, M.F. (1998). IL-5 Is Required for Eosinophil Recruitment, Crystal Deposition, and Mononuclear Cell Recruitment During a Pulmonary *Cryptococcus neoformans* Infection in Genetically Susceptible Mice (C57BL/6). *The Journal of Immunology*, 2393–2400.
- Hull, C.M. & Heitman, J. (2002). Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annual review of genetics*, 36, 557–615.
- Hyldahl, R.D.; Schwartz, L.M. & Clarkson, P.M. (2013). NF- $\kappa$ B activity functions in primary pericytes in a cell- and non-cell-autonomous manner to affect myotube formation. *Muscle & nerve*, 47(4), 522–31.
- Kozubowski, L.; Lee, S.C. & Heitman, J. (2009). Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cellular microbiology*, 11(3), 370–80.
- Kronstad, J.W.; Attarian, R.; Cadieux, B.; Choi, J.; D'Souza, C.A.; Griffiths, E.J.; Geddes, J.M.H. *et al.* (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature reviews. Microbiology*, 9(3), 193–203.
- Kupfahl, C.; Tsikas, D.; Niemann, J.; Geginat, G. & Hof, H. (2012). Production of prostaglandins, isoprostanes and thromboxane by *Aspergillus fumigatus*: identification by gas chromatography-tandem mass spectrometry and quantification by enzyme immunoassay. *Molecular immunology*, 49(4), 621–7.
- Kvarnhammar, A.M. & Cardell, L.O. (2012). Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology*, 136(1), 11–20.
- Lin, X. & Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual review of microbiology*, 60, 69–105.
- Loftus, B.J.; Fung, E.; Roncaglia, P.; Rowley, D.; Amedeo, P.; Bruno, D.; Vamathevan, J. *et al.* (2005). The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307(5713), 1321–4.
- Luna-Gomes, T.; Bozza, P. T. & Bandeira-Melo, C. (2013). Eosinophil recruitment and activation: the role of lipid mediators. *Frontiers in pharmacology*, 4, 27.
- Luna-Gomes, T.; Magalhães, K.G.; Mesquita-Santos, F.P.; Bakker-Abreu, I.; Samico, R.F.; Molinaro, R.; Calheiros, A.S. *et al.* (2011). Eosinophils as a novel cell source of prostaglandin D2: autocrine role in allergic inflammation. *Journal of immunology*, 187(12), 6518–26.

Mambula, S.S.; Simons, E.R.; Hasteley, R.; Selsted, M.E. & Levitz, S.M. (2000). Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 68(11), 6257–64.

Mantovani, A.; Cassatella, M. A.; Costantini, C. & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology*, 11(8), 519–31.

Martinez, L.R.; Garcia-rivera, J. & Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) Strains Are More Susceptible to Heat than *C. neoformans* var. *grubii* (Serotype A) Strains. *Journal of clinical microbiology*, 39(9), 3365.

McFadden, D.; Zaragoza, O. & Casadevall, A. (2006). The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends in microbiology*, 14(11), 497–505.

McTaggart, L.; Richardson, S.E.; Seah, C.; Hoang, L.; Fothergill, A. & Zhang, S.X. (2011). Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii* by Use of Rapid Biochemical Tests, Differential Media and DNA Sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 49, 2522–2527.

Melo, R.C.N.; D'Avila, H.; Wan, H.C.; Bozza, P.T.; Dvorak, A.M. & Weller, P.F. (2011). Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 59(5), 540–56.

Miller, M.F. & Mitchell, T.G. (1991). Killing of *Cryptococcus neoformans* strains by Human Neutrophils and Monocytes. *Infection and immunity*, 59(1).

Monneret, G., Gravel, S., Diamond, M., Rokach, J., & Powell, W. S. (2001). Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood*, 98(6), 1942–1948. doi:10.1182/blood.V98.6.1942

Muller, U.; Stenzel, W.; Piehler, D.; Grahnert, A.; Protschka, M.; Kohler, G.; Frey, O. *et al.* (2013). Abrogation of IL-4 receptor- $\alpha$ -dependent alternatively activated macrophages is sufficient to counter resistance against pulmonary cryptococcosis despite an ongoing Th2 response. *International Immunology*.

Naslund, P.K.; Miller, W.C. & Granger, D.L. (1995). *Cryptococcus neoformans* fails to induce nitric oxide synthase in primed murine macrophage-like cells. *Infection and immunity*, 63(4), 1298–304.

Noverr, M.C.; Cox, G.M.; Perfect, J. R. & Huffnagle, G.B. (2003). Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infection and immunity*.

Noverr, M.C.; Phare, S.M.; Toews, G.B.; Coffey, M.J. & Huffnagle, G.B. (2001). Pathogenic Yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* Produce Immunomodulatory Prostaglandins. *Infection and immunity*, 69(5), 2957–2963.

Noverr, M.C.; Toews, G.B. & Huffnagle, G.B. (2002). Production of Prostaglandins and Leukotrienes by Pathogenic Fungi. *Infection and immunity*, 70(1), 400–402.

Osterholzer, J.J.; Surana, R.; Milam, J.E.; Montano, G.T.; Chen, G.H.; Sonstein, J.; Curtis, J.L. *et al.* (2009). Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *The American journal of pathology*, 174(3), 932–43.

Pereira, P.A.T.; Trindade, B.C.; Secatto, A.; Nicolete, R.; Peres-Buzalaf, C.; Ramos, S.G.; Sadikot, R. *et al.* (2013). Celecoxib improves host defense through prostaglandin inhibition during *Histoplasma capsulatum* infection. *Mediators of inflammation*.

Peters-golden, M. & Henderson, W.R. (2007). Leukotrienes. *The new England Journal of Medicine*, 1841–1854.

Pettipher, R. (2008). The roles of the prostaglandin D(2) receptors DP(1) and CRTH2 in promoting allergic responses. *British journal of pharmacology*, 153 Suppl S191–9.

Piebler, D.; Stenzel, W.; Grahnert, A.; Held, J.; Richter, L.; Köhler, G.; Richter, T. *et al.* (2011). Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T-helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis. *The American journal of pathology*, 179(2), 733–44.

Powell, W.S. (2003). A novel PGD<sub>2</sub> receptor expressed in eosinophils. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69(2-3), 179–185.

Price, M.S. & Perfect, J.R. (2011). Host defenses against cryptococcosis. *Immunological investigations*, 40(7-8), 786–808.

Qin, Q.M.; Luo, J.; Lin, X.; Pei, J.; Li, L.; Ficht, T.A. & Figueiredo, P. (2011). Functional analysis of host factors that mediate the intracellular lifestyle of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS pathogens*, 7(6), e1002078.

Qiu, Y.; Davis, M.J.; Dayrit, J.K.; Hadd, Z.; Meister, D. L.; Osterholzer, J.J.; Williamson, P.R. *et al.* (2012). Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. *PloS one*, 7(10)

Qureshi, A., Subathra, M., Grey, A., Schey, K., Del Poeta, M., & Luberto, C. (2010). Role of sphingomyelin synthase in controlling the antimicrobial activity of neutrophils against *Cryptococcus neoformans*. *PloS one*, 5(12), e15587.

Robertson, E.J.; Najjuka, G.; Rolfes, M.A.; Akampurira, A.; Jain, N.; Anantharanjit, J.; Von Hohenberg, M. *et al.* (2014). *Cryptococcus neoformans* ex vivo capsule size is associated with intracranial pressure and host immune response in HIV-associated cryptococcal meningitis. *The Journal of infectious diseases*, 209(1), 74–82.

Rodríguez, M.; Domingo, E.; Municio, C.; Alvarez, Y.; Hugo, E.; Fernández, N. & Sánchez Crespo, M. (2014). Polarization of the innate immune response by prostaglandin E2: a puzzle of receptors and signals. *Molecular pharmacology*, 85(1), 187–97.

Roilides, E.; Holmes, A.; Blake, C.; Pizzo, P. & Walsh, T. (1995). Effects of granulocyte colony-stimulating factor and interferon- $\gamma$  on antifungal activity of human polymorphonuclear neutrophils against pseudohyphae of different medically important *Candida* species. *Journal of leukocyte biology*, 57, 651–656.

Sabroe, I.; Hartnell, A.; Jopling, L.A.; Bel, S.; Ponath, P.D.; Pease, J.E.; Collins, P.D. *et al.* (1999). Differential regulation of eosinophil chemokine signaling via CCR3 and non-CCR3 pathways. *Journal of immunology* 162(5), 2946–55.

Sandig, H.; Pease, J.E. & Sabroe, I. (2007). Contrary prostaglandins: the opposing roles of PGD<sub>2</sub> and its metabolites in leukocyte function. *Journal of leukocyte biology*, 81(2), 372–82.

Schuligoi, R.; Sturm, E.; Luschnig, P.; Konya, V.; Philipose, S.; Sedej, M.; Waldhoer, M. *et al.* (2010). CRTH2 and D-type prostanoid receptor antagonists as novel therapeutic agents for inflammatory diseases. *Pharmacology*, 85(6), 372–82.

Scott, W.A.; Pawlowski, N.A.; Andreach, M. & Cohn, Z.A. (1982). Resting Macrophages Produce Distinct Metabolites From Exogenous Arachidonic Acid. *Journal of Exp Med*, 155, 535–547.

Seider, K.; Heyken, A.; Lüttich, A.; Miramón, P. & Hube, B. (2010). Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Current opinion in microbiology*, 13(4), 392–400.

Snijdewint, F.G.; Kaliński, P.; Wierenga, E.A.; Bos, J.D.; Kapsenberg, M.L. (1993). Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol*. 150(12):5321-9.

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

Stebbins, K.J.; Evans, J.F. & Lorrain, D.S. (2010). DP2 Receptor Antagonists: Novel Therapeutic Target for COPD. *molecular and cellular pharmacology*, 2(3), 89–96.

Steenbergen, J.N.; Shuman, H.A. & Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15245–50.

Thomas, C.J. & Schroder, K. (2013). Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends in immunology*, 34(7), 317–28.

Underhill, D.M. & Iliev, I.D. (2014). The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature reviews. Immunology*, 14(6), 405–16.

Urban, C.F.; Lourido, S. & Zychlinsky, A. (2006). How do microbes evade neutrophil killing? *Cellular microbiology*, 8(11), 1687–96.

Vaishnav, V.V.; Bacon, B.E.; O'Neill, M. & Cherniak, R. (1998). Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. *Carbohydrate research*, 306(1-2), 315–30.

Valdez, P.A.; Vithayathil, P.J.; Janelsins, B.M.; Shaffer, A.L.; Williamson, P.R. & Datta, S.K. (2012). Prostaglandin E2 suppresses antifungal immunity by inhibiting interferon regulatory factor 4 function and interleukin-17 expression in T cells. *Immunity*, 36(4), 668–79.

Vecchiarelli, A. & Monari, C. (2012). Capsular Material of *Cryptococcus neoformans*: Virulence and Much More. *Mycopathologia*, 375–386.

Villena, S.N.; Pinheiro, R.O.; Pinheiro, C.S.; Nunes, M.P.; Takiya, C.M.; DosReis, G.A.; Previato, J.O. *et al.* (2008). Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cellular microbiology*, 10(6), 1274–85.

Wang, D. & Dubois, R.N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 10(3), 181–93.

Wright, H.L.; Moots, R.J.; Bucknall, R.C. & Edwards, S.W. (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*, 49(9), 1618–31.

Yamada, M.; Numaguchi, Y.; Okumura, K.; Harada, M.; Naruse, K.; Matsui, H.; Ito, T. *et al.* (2002). Prostacyclin Synthase Gene Transfer Modulates Cyclooxygenase-2-Derived Prostanoid Synthesis and Inhibits Neointimal Formation in Rat Balloon-Injured Arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22, 256–262.

Yamaguchi, H.; Komase, Y.; Ikehara, M.; Yamamoto, T. & Shinagawa, T. (2008). Disseminated cryptococcal infection with eosinophilia in a healthy person. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 14(4), 319–24.

Yan, Z.; Sun, S.; Shahid, M. & Xu, J. (2007). Environment factors can influence mitochondrial inheritance in the fungus *Cryptococcus neoformans*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 44(5), 315–22.

Yousefi, S.; Gold, J.A.; Andina, N.; Lee, J.J.; Kelly, A.M.; Kozlowski, E.; Schmid, I. *et al.* (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature medicine*, 14(9), 949–53.