

**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular**

Padrões de ativação do inflamassoma pelas vesículas extracelulares dos isolados do fungo *Cryptococcus neoformans* obtidas em diferentes condições nutricionais

Clara Luna Freitas Marina

**Brasília
2019**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Padrões de ativação do inflamassoma induzidos pelas vesículas extracelulares dos isolados do fungo *Cryptococcus neoformans* cultivado em diferentes condições nutricionais

Dissertação de Mestrado apresentado para obtenção do título de Mestre no programa de pós-graduação de Patologia Molecular – Faculdade de Medicina – Universidade de Brasília

AUTOR: CLARA LUNA FREITAS MARINA
ORIENTADOR: ANAMÉLIA LORENZETTI BOCCA

Brasília
2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe e melhor amiga Márcia Maria que sempre assumiu o papel de mãe e pai e deu tudo de si, ultrapassando obstáculos para que eu pudesse alcançar os meus sonhos da melhor forma possível, sempre dando todo o apoio emocional e financeiro.

Ao meu irmão Tiago Freitas que sempre esteve presente me incentivando e dando todo o amor e carinho. Obrigada pelas conversas, pela paciência e disposição em ajudar, sempre que necessário. Obrigada também ao meu sobrinho Teo que têm me dado a maior alegria nesses últimos anos.

À minha cachorrinha Killi, que nesse último ano de mestrado foi a maior e melhor companhia, sempre me recebendo com a maior alegria e tornando os momentos difíceis, quase irreconhecíveis.

À toda a minha família, que sempre me apoiou e me incentivou a conquistar esse sonho. As conversas, festas e alegria contagiante de vocês foram essenciais para desligar um pouco das obrigações.

Às minhas amigas de Ensino Médio, Carolina Coelho, Gabriela Araújo e Mariana Mathias, e à minha amiga da UnB, Melissa Merlone, que ouviram minhas reclamações e choros intermináveis sempre que alguma coisa dava errado e me ajudaram a superar todos os obstáculos. Obrigada pelas infinitas conversas, bebedeiras e festas.

Aos meus amigos do curso de Biologia da UnB: Ana Brígida, Débora Resende, Diogo Telheiro, Eduardo Carvalho, Fernando Pagels, Igor Cutrim, Letícia Mallmann, Lucas Giroto, Marcelo Ferreira e Victor Mendes, assim como todos os outros que me acompanharam e estiveram presentes nesses últimos 6 anos, vocês foram essenciais nessa caminhada.

À minha orientadora Anamélia L. Bocca, que abriu as portas do laboratório para mim e me ensinou muito nesses últimos anos, me dando todo o apoio profissional e emocional quando foi necessário.

Ao Pedro Bürgel, que me acompanhou desde o início no laboratório, me ensinando quase toda a parte técnica necessária para o desenvolvimento do meu mestrado e esteve presente como amigo durante todo o tempo. Você foi essencial profissional e emocionalmente em todo o processo, principalmente nesses últimos meses.

À todos os membros do Laboratório de Imunologia Aplicada da UnB (LIA), que sempre estiveram dispostos a ajudar quando necessário e sempre proporcionaram boas conversas e risadas nas horas vagas no laboratório, principalmente à Karina Simon, Lucas Las-Casas, Paulo Holanda, Raffael Castro, Thaís Bergmann e aos professores Aldo Tavares e Larissa Matos.

Aos estudantes e professores dos Laboratórios de Imunologia e Inflamação (LIMI), MOA da BioMol e do laboratório de Biofísica, que sempre nos receberam muito bem.

Aos colaboradores do Departamento de Medicina do Instituto Albert Einstein: Daniel Agostinho, Daneil Zamith-Miranda e ao professor Joshua Nosanchuk pela realização de alguns experimentos aqui representados.

Aos professores Felipe Araújo, Leonardo Nimrichter e Larissa Matos, por aceitarem participar da banca avaliadora deste trabalho.

Finalmente ao CNPq e FAP-DF, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo	6
Introdução	7
Cryptococcus neoformans	7
Infecção	9
Vesículas Extracelulares	12
Mecanismos imunológicos e neurotropismo	15
Inflamassoma	18
Objetivos	23
Geral:	23
Específicos:	23
Metodologia	24
Animais	24
Cryptococcus neoformans	24
Isolamento de Vesículas Extracelulares	25
Caracterização das vesículas	26
Microscopia de Transmissão:	26
Microscopia de Varredura	27
Microscopia Confocal	28
Detecção da atividade enzimática nas EVs	29
Diferenciação de BMDM e BMDC	29
Interação das EVs com BMDM e BMDC	31
Quantificação de citocinas por ELISA	32
Infecção dos animais e tratamento com as EVs	33
Análise Estatística	35
Resultados	36
Caracterização das vesículas	36
C. neoformans secretam Evs com diferentes concentrações de fatores de virulência, dependendo do meio do meio de cultura	42
EVs secretadas pelo isolado Δ Cap67 são mais facilmente internalizadas por macrófagos do que EVs secretadas pelo isolado B3501	43
EVs produzidas em um meio rico em nutrientes induzem uma menor ativação do inflamassoma em relação a EVs produzidas em um meio pobre quando interagindo com macrófagos ou células dendríticas	43
Tratamento com EVs modula negativamente a expressão de genes relacionados à ativação do inflamassoma em camundongos infectados com C. neoformans	47
Discussão	66
Conclusão	74
Bibliografia	75
Índice de figuras e tabelas	82
Lista de Abreviaturas	84

RESUMO

Cryptococcus neoformans é um fungo patogênico humano que infecta principalmente pacientes imunocomprometidos causando criptococose. Entre outras, uma das suas estratégias de virulência é a secreção de vesículas extracelulares (EVs) contendo polissacarídeos importantes com características imunomodulatórias. Sabe-se que diferentes sorotipos de *C. neoformans* produzem diferentes respostas inflamatórias quando incubadas com macrófagos e, dependendo da condição de crescimento, estes fungos liberam metabólitos e fatores de virulência em diferentes concentrações. Assim, mostramos que, dependendo da composição do meio de cultura, *C. neoformans* produz diferentes fatores de virulência e diferentes vesículas extracelulares. Avaliamos as características das vesículas extracelulares produzidas por sorotipos capsulares e acapsulares de *C. neoformans* (B3501 e Δ Cap67) crescendo no meio de cultura Sabouraud Dextrose Broth em diferentes concentrações nutricionais (10%, 50% e 100%) ou um meio pobre (Meio Mínimo). Afim de entender melhor a influência das EVs na modulação do inflamassoma dependendo das condições nutricionais, elas foram incubadas com macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) e células dendríticas (BMDCs) de camundongos C57BL/6 e as citocinas do sobrenadante foram quantificadas por ELISA. Além disso, foram realizados experimentos *in vivo* para analisar os genes do inflamassoma ativados durante a infecção com *C. neoformans* após o tratamento com as EVs. Os resultados mostraram que, quanto maior a concentração nutricional no meio de cultura *C. neoformans* produz EVs com menor tamanho hidrodinâmico e menos compostos de virulência. Apesar disso, ao interagirem com BMDMs e BMDCs, essas EVs induzem uma menor produção de IL-1 β em relação às EVs produzidas no meio nutricionalmente pobre. Quando utilizadas como tratamento em camundongos infectados com *C. neoformans*, as EVs produzidas no meio rico inibiram a maioria dos genes relacionados ao inflamassoma em relação aos camundongos infectados que não receberam tratamento. Tais resultados indicam que provavelmente as EVs estão relacionadas ao processo de disseminação do *C. neoformans* dos pulmões até o SNC do hospedeiro, considerando que, durante a infecção, o fungo enfrenta diferentes condições nutricionais nos tecidos pelos quais percorre até alcançar o tecido cerebral. Assim, a baixa disponibilidade de nutrientes encontrada no tecido inflamado dos pulmões estimularia a produção de EVs com função imuno-estimulatória que provocaria um maior recrutamento de macrófagos e internalização de leveduras. As leveduras, protegidas no interior dos macrófagos, conseguiriam se disseminar pelo organismo, sem ativar o sistema imune, até chegar ao SNC, tecido com maior disponibilidade de nutrientes e, onde o fungo produziria EVs com funções imuno-inibitórias e conseguiria se manter estável. Dessa forma, tais resultados mostram mais uma vez a importância das EVs no processo de infecção pelo *C. neoformans*, podendo ser alvo de estudos para desenvolvimento de tratamento para a criptococose.

INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans

Cryptococcus neoformans (Cn) é o agente etiológico da criptococose, uma das principais infecções oportunistas que acometem pacientes com AIDS (HIV positivos) (BEKONDI, *et al.* 2006). Quando a infecção ocorre em indivíduos imunocompetentes, esses apresentam um quadro clínico assintomático ou com leve pneumonia, geralmente com eliminação do fungo ou induzindo a fase de latência. No entanto, quando o Cn infecta mamíferos com imunidade mediada por células deficiente, principalmente aqueles deficientes em linfócitos T CD4+ (pacientes com sarcoidose, desordens linfoproliferativas ou em terapias imunossupressoras), as leveduras migram para o sistema nervoso central, causando meningite (PAPPAS, 2013). Estima-se que 70 a 90% dos pacientes aidséticos sofram com desordens neuropatológicas, sendo meningite criptococócica uma das mais frequentes (DEL VALLE, *et al.* 2006).

A meningite criptococócica apresenta uma incidência anual de aproximadamente 223.100 casos e 180 mil mortes, em uma escala global, sendo 73% dos casos na África Subsaariana e 19% no Sudeste Asiático (figura 1). Provavelmente observa-se uma maior incidência da doença nestas regiões devido a uma menor disponibilidade de tratamento antirretroviral (ART), favorecendo a maior disseminação do vírus HIV e do *C. neoformans*, quando comparado a outras regiões do mundo, que apresentaram reduções significativas da doença na última década (DENNING, 2016). Globalmente, a meningite criptococócica é responsável pela mortalidade de até 15% dos pacientes infectados com o vírus HIV (RAJASINGHAM, *et al.* 2017).

O *C. neoformans* é um fungo encapsulado, cuja forma patogênica é a leveduri-forme (figura 2). É uma espécie muito heterogênea e inicialmente era dividida em quatro sorotipos, dependendo das características antigênicas de sua cápsula polissacarídica (sorotipos A, B, C e D). Posteriormente, esta espécie foi dividida em duas novas espécies: *Cryptococcus neoformans*, que abrange os sorotipos A (var. *grubii*) e D (var. *neoformans*) e *Cryptococcus gattii*, devido a diferenças genéticas que impedem a reprodução entre estas espécies. Ademais, foi visto que essas espécies apresentam diferenças morfológicas em sua forma reprodutiva, ecológicas e em sua interação com o hospedei-

ro. *C. neoformans* é muito mais disseminado globalmente e infecta principalmente pacientes imunossuprimidos, enquanto que *C. gatti* infecta principalmente pacientes imunocompetentes e causa quadros clínicos mais graves, apesar de ser menos prevalente e raramente ser encontrado em sua forma livre no meio ambiente (KWON-CHUNG e VARMA, 2006). Recentemente, após análises filogenéticas e imuno específicas mais aprofundadas, foi proposta uma nova divisão dessas espécies: *C. gatti* foi dividida em outras 5 espécies e a *C. neoformans* var. *grubii* e var. *neoformans* foram consideradas espécies diferentes (HAGEN *et al*, 2015).

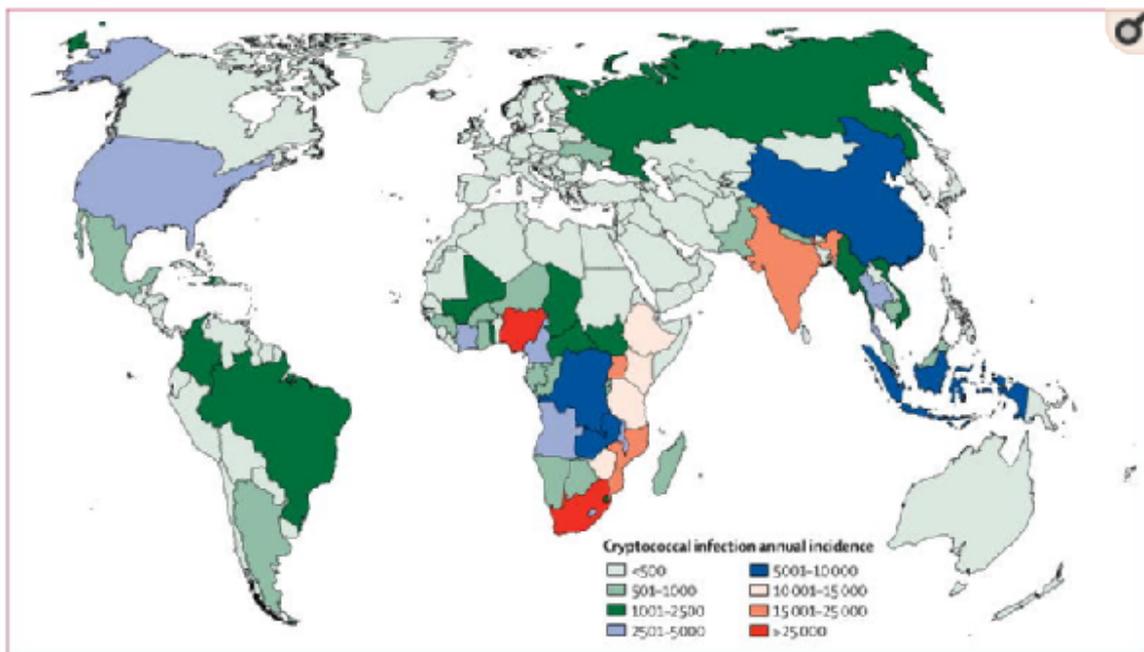


Figura 1. Estimativa de casos anuais de infecção por *C. neoformans* nos diferentes países do globo. Cores quentes representam uma maior incidência e cores frias uma menor (RAJASINGHAM, R. *et al*. 2017).

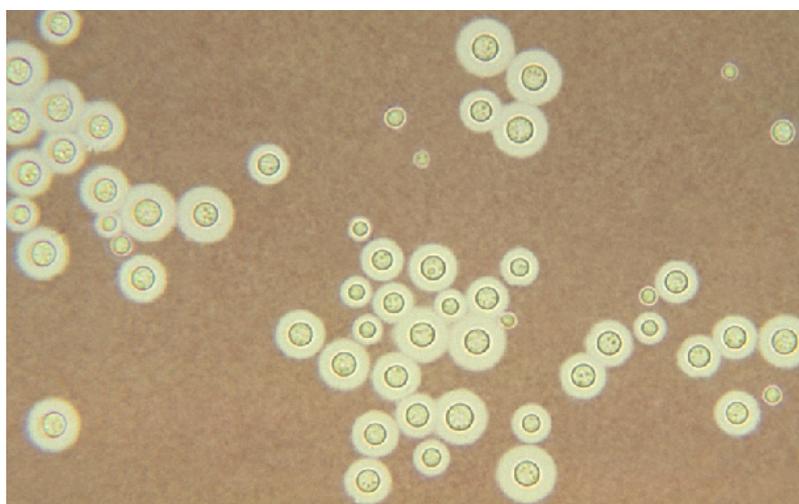


Figura 2. Microscopia óptica de *C. neoformans*. *Cryptococcus neoformans* Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL).

C. neoformans é um fungo ambiental basidiomiceto, encontrado principalmente em fezes secas de pombos e morcegos e em troncos e raízes em processo de decomposição (CALLEJAS *et al.* 2009; CHAKRABARTI *et al.* 1997; PFEIFFER *et al.*, 1992). Apesar de conseguir sobreviver bem em sua forma saprofítica, esse fungo também é capaz de infectar aves e mamíferos, sobrevivendo tanto no meio extracelular como no meio intracelular, sendo considerado assim um patógeno intracelular facultativo. Também se observou que esse fungo é capaz de infectar microorganismos do solo, como nematóides e amebas de forma semelhante a que infecta macrófagos de mamíferos, conseguindo sobreviver e inclusive modular o fagolisossoma destas espécies (STEENBERGEN e CASADEVALL 2003, CASADEVALL e PIROFSKI, 2007).

Infecção

A infecção ocorre pela inalação de propágulos fúngicos disseminados no ambiente, que se instalam nos alvéolos pulmonares, onde se diferenciam em leveduras, sua forma patogênica (IDNURM *et al.*, 2005). Estes são internalizados por células residentes da primeira linha de defesa do sistema imune inato: macrófagos e células dendríticas, que normalmente são capazes de eliminar os patógenos antes que sejam detectados sintomas específicos. Caso não sejam eliminados, os microrganismos podem ficar em estado latente até que haja uma eventual fragilidade do sistema imune do hospedeiro, quando eles conseguem voltar a se replicar e infectar outras células e órgãos (GARCIA-HERMOSO *et al.*, 1999).

Quando o fungo se instala nos alvéolos pulmonares, apresenta diversas estratégias de virulência para conseguir sobreviver e se disseminar no tecido do hospedeiro. Dentre aos fatores de virulência está a presença de cápsula polissacarídica, principal característica desse fungo, que lhe permite evadir o sistema imune e inibir sua fagocitose por macrófagos (BOLANOS e MITCHELL, 1989; LEVITZ e DIBENEDETTO, 1989). Uma outra estratégia utilizada para impedir a fagocitose é a formação de células titãs, células que podem chegar a medir até 100 µm de diâmetro, em comparação com o tamanho mais comum desta espécie que é de até 7 µm, gerando assim um impedimento físico à fagocitose. Além disso, as células titãs sofrem modificações moleculares inibitórias.

rias em sua cápsula, inibindo por mecanismos ainda não totalmente elucidados a fagocitose de células vizinhas pequenas, aumentando então a população de *C. neoformans* no pulmão infectado (OKAGAKI e NIELSEN, 2012; ZARAGOZA e NIELSEN, 2013).

Sabe-se que cepas acapsulares, como o mutante acapsular da cepa B3501 (Δ Cap67) conseguem se multiplicar normalmente em condições controladas em laboratório, mas no hospedeiro são facilmente eliminados, o que mostra que a cápsula não é essencial para a sobrevivência do fungo, apesar de ser muito importante para sua virulência (FROMTLING et al. 1982). Além de contribuir para a evasão do sistema imune, a cápsula, formada por uma rede entrelaçada de polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) (BOSE et al. 2003), prejudica a resposta imune do hospedeiro, que não consegue reconhecer o fungo de forma eficiente (ZARAGOZA et al, 2009).

Apesar de que *C. neoformans* consegue inibir a fagocitose por meio da presença da cápsula, observou-se que nas primeiras horas de infecção nos pulmões, as leveduras encontram-se no interior dos fagócitos (FELDMESSER et al., 2000). Uma provável hipótese é de que o fungo consegue regular o rearranjo de moléculas da cápsula, expondo opsoninas e polissacarídeos que são reconhecidos pelos fagócitos e permitem a sua fagocitose. O fungo consegue sobreviver favoravelmente na temperatura corporal dos mamíferos e em um pH ácido, como o dos fagolisossomos, o que lhe permite permanecer viável e se multiplicar no interior dos mesmos (LEVITZ et al, 1999). Além disso, *C. neoformans* inibe a fusão do lisossoma com o fagossoma (LEVITZ et al, 1999) e é capaz de regular várias características dos macrófagos, como a organização do citoesqueleto e sinalização celular para favorecer sua própria sobrevivência (QIN et al. 2011).

Foi mostrado anteriormente que *C. neoformans* viáveis são capazes de retardar a maturação do fagossoma, removendo os marcadores Rab5 e Rab11, reduzindo a sua acidificação, efluxo de cálcio e de proteases, favorecendo assim a sua proliferação (SMITH et al, 2015). Após a internalização do fungo, sua cápsula se espessa e ele começa a secretar enzimas como fosfolipase B e fosfatase ácida. Tais enzimas causam dano à membrana do fagolisossoma, neutralizando seu pH e promovendo maior permeabilização da membrana do fagócito, o que permite maior influxo de nutrientes e eventual exocitose, que pode ocorrer com lise ou não do macrófago (exocitose lítica ou não

lítica). O processo de extrusão, também chamado de vomocitose, ocorre de forma que tanto o macrófago quanto os fungos permanecem viáveis após a saída dos microrganismos e não há ativação de resposta pró-inflamatória, diferente do que ocorre no caso de lise do macrófago. Além da vomocitose, *C. neoformans* também pode ser transferido lateralmente para células adjacentes e ambas estratégias requerem que o fungo esteja viável (DAVIS *et al.* 2015).

Inicialmente, acreditava-se que a vomocitose era exclusiva de *C. neoformans*, no entanto, estudos identificaram este mesmo fenômeno ocorrendo com outros fungos (BAIN *et al.*, 2012), bactérias (HAGEDORN *et al.*, 2009; HYBISKE; STEPHENS, 2007) e até mesmo por protozoários (REAL *et al.*, 2014). Entretanto, ainda não se sabe exatamente quais são os mecanismos moleculares responsáveis por esse processo. Até o momento, a primeira molécula descrita como reguladora do processo de extrusão foi a Map quinase ERK5, receptor extracelular de macrófagos responsável pelo processo de inibição da vomocitose. A inibição da ERK5 causa uma modificação do citoesqueleto de actina em macrófagos M2, além de uma modificação no perfil de secreção de citocinas: há uma redução na produção de IL-4 e IL-10 e aumento na produção de IL-12p40 e TNF- α . Neste estudo também foi mostrado que a inibição do ERK5 *in vivo* em modelos de *zebra fish* aumenta a vomocitose e reduz a disseminação da infecção. Esses dados mostram que provavelmente a vomocitose é uma estratégia utilizada pelos macrófagos para se proteger da infecção e não uma estratégia de virulência dos patógenos, como se acreditava até então (GILBERT *et al.*, 2017). Um aspecto interessante é que a forma como ocorre a extrusão depende da via de internalização do patógeno. No caso de internalização via anticorpos, os patógenos costumam ser expelidos em aglomerados e depois continuam crescendo na forma de biofilme, enquanto que quando a internalização é via sistema complemento, as leveduras são expelidas individualmente (ALVAREZ *et al.*, 2008).

Assim, a sobrevivência das leveduras no interior dos fagócitos é uma importante estratégia de virulência desse organismo, facilitando a permanência em estado de latência e promovendo a sua disseminação pelo organismo do hospedeiro, já que assim os microrganismos permanecem protegidos do sistema imune. A disseminação do fungo via macrófagos é denominado cavalo de Tróia, e é considerado importante para a che-

gada do fungo em outros órgãos bem como no SNC, sendo transportados e atravessando a barreira hemato-encefálica dentro dos fagócitos ou sendo liberados diretamente nas células endoteliais desta barreira, em um processo dependente de urease (CASADEVALL, 2010). Corroborando com esta hipótese, um estudo utilizando modelos murinos com depleção de macrófagos alveolares observou uma menor carga fúngica cerebral nestes animais, quando infectados com *C. neoformans* (KECHICHIAN *et al*, 2007).

O *C. neoformans*, assim como várias outras espécies de patógenos, precisam se adaptar às diversas condições estressoras apresentadas pelo organismo para conseguirem sobreviver e se multiplicar no mesmo. Além das eficientes barreiras físicas e das pressões imunológicas encontradas, a disponibilidade nutricional, concentração de gases, pH, etc. variam de um tecido para outro. Os alvéolos pulmonares bem como os tecidos com processo inflamatório instalado, por exemplo, são regiões com maior concentração de CO₂ e menor concentração de O₂, apresentando menos fontes de carbono e nitrogênio para o fungo se desenvolver (BARELLE *et al*, 2006). No entanto, algumas regiões do organismo apresentam altas concentrações de glicose e NO₃, como o sangue, principal transportador dessa molécula e o tecido cerebral, que necessita altas concentrações de glicose para o bom funcionamento nervoso (DEVASKAR e MELLO, 1996; GARCÍA-CÁCERES *et al*, 2016). Assim, levando em conta que o *C. neoformans* consegue se desenvolver bem em todas essas regiões do organismo, em especial nos alvéolos pulmonares, foi visto que essa espécie apresenta uma maior expressão de fatores de virulência quando se encontra em situações de estresse nutricional, como o espessamento de sua cápsula polissacarídica (ESHER, *et al*. 2018).

Vesículas Extracelulares

Outra importante estratégia de virulência e objeto de estudo deste trabalho é a produção de vesículas extracelulares (EVs) contendo biomoléculas com funções imunomodulatórias e de resistência ao hospedeiro. A liberação de vesículas extracelulares ocorre em todos os domínios da vida e, em fungos, foi descrita pela primeira vez em *C. neoformans* (RODRIGUES *et al* 2007). Depois disso, já foram encontradas em várias outras espécies de fungo, como *C. albicans* (VARGAS *et al*, 2015), *Candida parapsilo-*

sis (MEINGASSNER *et al*, 2009), *Histoplasma capsulatum* (ALBUQUERQUE, *et al* 2008), *Malassezia sympodialis* (GEHRMANN *et al*, 2011), *Saccharomyces cerevisiae* (OLIVEIRA *et al*, 2010), *Paracoccidioides brasiliensis* (DA SILVA *et al*, 2016), *Sporothrix schenckii* (AUGUSTO *et al*, 2018), *Alternaria infectoria* (SILVA *et al*, 2014) e *Pichia fermentans* (LEONE *et al*, 2017) o que mostra que essa é uma característica dos fungos em geral. Tais vesículas são utilizadas como estratégia de transporte de macromoléculas do meio intracelular para o meio extracelular e aparentemente são produzidas associadas à via do complexo de golgi e sua secreção ocorre mediante brotamentos na membrana celular do microorganismo (RODRIGUES *et al*, 2007).

Análises morfológicas e constitutivas das EVs de *C. neoformans* mostraram uma população bastante heterogênea em forma, conteúdo e tamanho, composta por EVs variando de 30 a 400 nm de diâmetro com a sua maioria representada por EVs de 100 a 150 nm. As EVs são formadas por uma bicamada lipídica agregando em seu interior biomoléculas com funções estruturais para o fungo, como ergosterol e glucosilceramidas (RODRIGUES *et al*, 2007) ou relacionadas a sua virulência, como GXM, lacase (produção de melanina), urease, superóxido dismutase e fosfolipase B (RODRIGUES *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al*, 2010).

Assim, devido à presença de moléculas estruturais no interior das EVs, acredita-se que uma de suas funções é auxiliar na montagem da cápsula fúngica, transportando moléculas do interior para o exterior celular. Outra função apresentada pelas EVs é a capacidade de modular o sistema imune do hospedeiro, sendo internalizadas quando interagem com macrófagos e modulando a produção de citocinas. O tratamento de células dendríticas com vesículas de *C. albicans* estimula a produção de IL-12p40, IL-10 e TNF- α e expressão de CD86 e do Complexo Principal de Histocompatibilidade II (MHC II) e que o tratamento de macrófagos murinos com vesículas de *C. albicans* ou de *C. neoformans* leva a uma maior produção de óxido nítrico, IL-12, TGF- β e IL-10 por essas células (OLIVEIRA *et al*, 2010).

Acredita-se que a produção de EVs ocorra durante infecções fúngicas *in vivo* já que o soro de pacientes infectados com *C. neoformans* ou com *H. capsulatum* apresentou reatividade aos componentes vesiculares (Rodrigues *et al*. 2008), além da atividade imunomodulatória das EVs de *C. neoformans* quando interagem com macrófagos

(OLIVEIRA *et al*, 2010) e a influência do tratamento com EVs favorecendo a migração de *C. neoformans* para o SNC, aumentando a carga fúngica nesse órgão (HUANG *et al*, 2012). Além disso, já foi possível isolar EVs do plasma de pacientes infectados com *M. sympodialis* ou *C. neoformans*. Até o momento, não foi possível comprovar a produção das EVs *in vivo*, devido a falta de protocolos e marcadores específicos para sua visualização. Caso as EVs sejam produzidas durante a infecção, não se sabe como elas se manteriam viáveis no organismo do hospedeiro, já que são rompidas na presença de albumina sérica, indicando que quando são liberadas no plasma devem ser desintegradas, liberando seu conteúdo interno (WOLF *et al* 2012).

O tratamento de monócitos RAW 264.7 com EVs produzidas por cepas capsulares e acapsulares de *C. neoformans*, foi mais efetivo em ativar uma resposta inflamatória pelos macrófagos quanto tratados com os isolados acapsulares, estimulando-os a produzir níveis elevados de óxido nítrico, TNF- α , TGF- β e IL-10 (VARGAS *et al*, 2015; e OLIVEIRA *et al*, 2010). Outro resultado interessante é que o tratamento prévio de macrófagos murinos com as EVs de ambos isolados estimulou a fagocitose, quando estes foram infectados com *C. neoformans* encapsulados e não opsonizados. E novamente, as vesículas da cepa acapsular foram mais efetivas em ativar mecanismos microbicidas dos macrófagos. Provavelmente, a ausência de GXM nas vesículas da cepa acapsular seja o motivo para essa maior ativação das células do sistema imune. Além disso, é possível que as EVs contribuam para a sobrevivência do fungo no interior dos macrófagos.

Foi descrito que o acúmulo de polissacarídeos no fagolisossoma pode levar à formação de poros em sua estrutura e ao extravasamento de seu conteúdo, tornando o ambiente mais favorável para a multiplicação do fungo (TUCKER e CASADEVALL 2002). Isso favorece a hipótese de que as moléculas presentes nas EVs poderiam contribuir para esse processo, facilitando assim a sobrevivência e capacidade de evasão apresentada por essa espécie (TAYLOR-SMITH *et al*, 2016). Outro aspecto interessante descrito em EVs de *H. capsulatum* é que a opsonização do fungo com anticorpos anti-proteína de choque térmico Hsp60, protetor (6B7) ou não protetor (7B6), faz com que este fungo secrete EVs com maior conteúdo proteico e com diferentes características dependendo do anticorpo. Macrófagos pré-tratados com as EVs do *H. capsulatum* opsonizado com os anticorpos e infectados com *H. capsulatum* foram menos eficientes em

eliminar o fungo quando comparados àqueles não tratados e as EVs do fungo opsonizado com o anticorpo 7B6 inibiram mais a capacidade microbicida dos macrófagos do que o tratamento com 6B7 (BALTAZAR *et al*, 2018).

Assim, as EVs desempenham uma série de funções importantes durante o processo de infecção, modulando as funções celulares do hospedeiro. Para isso, as EVs podem ser internalizadas, permanecendo intactas ou sua membrana pode se fundir com a membrana celular, liberando seu conteúdo no interior da célula do hospedeiro (RODRIGUES *et al*, 2015). Experimentos anteriores utilizando marcação das vesículas com percloro de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina (DiIC) mostraram que estas são internalizadas e permanecem intactas, quando incubadas com macrófagos murinos (OLIVEIRA, *et al*, 2010). Entretanto, quando incubadas com células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC), elas se fundem com a membrana celular e liberam seu conteúdo diretamente no citoplasma da célula do hospedeiro. Aparentemente, após a interação com as vesículas, ocorrem modificações na permeabilidade do HBMEC, facilitando assim, a entrada e disseminação do *C. neoformans* no tecido cerebral (HUANG *et al*, 2012).

Mecanismos imunológicos e neurotropismo

C. neoformans apresenta um neurotropismo típico dessa espécie, em que as leveduras tendem a ir em direção ao SNC, levando ao quadro clínico mais sério da doença: a meningite criptocócica. Para isso, as leveduras necessitam passar por uma série de barreiras histológicas e resistir à resposta imune. Primeiramente, precisam evadir o tecido pulmonar, atravessar o endotélio vascular, ir em direção ao SNC via corrente sanguínea, atravessar a barreira hematoencefálica e colonizar o tecido cerebral. Uma estratégia utilizada para a disseminação para outros tecidos é de se manter no interior dos fagócitos e percorrer o organismo, chegando aos órgãos utilizando o mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia”, pois assim, não é reconhecido e não ativa o sistema imune (CASADEVALL, 2010). Existem algumas hipóteses para o neurotropismo, que são: a existência de substratos no SNC, que seriam necessários para o crescimento do *C. neoformans*; o sistema nervoso central serviria como um refúgio da resposta imune do hos-

pedeiro contra o fungo e a existência de receptores específicos em células neuronais que seriam responsáveis por atrair o fungo de forma mais eficiente do que outros órgãos durante a disseminação sistêmica (LIN e HEITMAN 2006).

Entretanto, os sistemas imunes inato e adaptativo competentes conseguem eliminar a infecção antes que o fungo consiga sair do pulmão e alcançar outros órgãos. Para isso, a primeira e mais importante estratégia de defesa do organismo no caso da criptococose é a imunidade inata, além das barreiras físicas, como o epitélio e a mucosa nasal. Uma das primeiras etapas do sistema imune inato é o sistema complemento. Tal sistema se caracteriza por uma cascata de ativação de proteínas séricas quando em contato com antígenos específicos. No caso da criptococose, o sistema complemento apresenta fundamental importância na eliminação dos patógenos e isso se nota a partir de estudos anteriores que mostraram que camundongos “knockout” pra proteína C5 são mais suscetíveis à criptococose do que os camundongos selvagens (RHODES, 1985).

A seguir, monócitos, neutrófilos e macrófagos são ativados pelo reconhecimento de peptídeos do sistema complemento ligados ao patógeno e o fagocitam. A fagocitose também pode ser ativada mediante o reconhecimento de moléculas de GXM na cápsula do fungo por receptores do tipo Toll 4 (TLR4) na superfície dos macrófagos (SHOHAM *et al* 2001) ou por células dendríticas, a partir do reconhecimento de manoproteínas pelos seus receptores de manose (PIETRELLA *et al* 2005). As células dendríticas são muito importantes no reconhecimento e apresentação de antígenos para células efetoras, como os linfócitos B e T sendo os principais mediadores entre a resposta imune inata e adaptativa.

Outra importante célula do sistema imune inato é o neutrófilo, células polimorfonucleares eficientes na eliminação de microrganismos mediante fagocitose e liberação de enzimas e moléculas antimicrobianas. Além disso, essas células são responsáveis por um balanço entre respostas do tipo Th1 e Th2 no organismo. Assim, em algumas infecções por *C. albicans* (FULURIJA *et al*, 1996), *L. monocytogenes* (LEAL *et al*, 1996) e *M. tuberculosis* (PEDROSA *et al*, 2000), os neutrófilos são essenciais para o controle da infecção e sobrevivência do hospedeiro. Apesar dos neutrófilos apresentarem ação fungicida contra o *C. neoformans* no cérebro (ZHANG *et al*, 2015), modelos de camundongos neutropênicos (com neutrófilos depletados) com criptococose pulmonar conseguem

combater melhor a infecção e sobrevivem mais do que camundongos selvagens. Foi visto também, que os camundongos neutropênicos apresentaram uma maior produção das citocinas IL-10, TNF- α , IL-4, e IL-12 no pulmão, mostrando que provavelmente a ausência de neutrófilos nesse órgão leva a uma produção de citocinas relacionadas às respostas Th1 responsável pela ativação de uma eficiente resposta celular efetiva para o controle do *C. neoformans* (MEDNICK *et al*, 2003).

Os anticorpos são importantes componentes da resposta imune adaptativa e uma de suas funções é a opsonização de patógenos, servindo como sinalização para outras células efectoras poderem fagocitá-los e eliminá-los. Eles podem ativar a fagocitose via reconhecimento pelos receptores Fc nos fagócitos ou podem ativar a via clássica do sistema complemento. Foi visto anteriormente, que os anticorpos produzidos pelas células B que se ligam à cápsula do *C. neoformans* podem desempenhar uma função protetora ou não protetora para o hospedeiro, dependendo do padrão de marcação dos anticorpos ao redor do fungo. A marcação pode ser pontilhada ou anelar dependendo do subtipo de anticorpo produzido e da região de afinidade do anticorpo com a cápsula fúngica. Ambos podem ser produzidos por um mesmo linfócito B e a marcação pontilhada promove uma reação protetora em camundongos, enquanto que a marcação anelar promove uma reação não protetora (MUKHERJEE *et al*, 1995). Além disso, a dose de anticorpo produzida também é importante para o desenvolvimento de uma resposta protetora ou não. Em camundongos infectados com *C. neoformans*, observou-se que a administração de anticorpos em altas concentrações é menos efetiva no controle da doença do que baixas doses e que dependendo do isotipo e da dose do anticorpo, este pode desencadear uma reação protetora, não protetora ou até deletéria (TABORDA e CASADEVALL 2001).

Os linfócitos e componentes da resposta adaptativa, também desempenham um papel essencial no desenvolvimento da criptococose, já que os principais afetados pela doença são os pacientes deficientes em linfócitos T CD4 e com aumento dos linfócitos CD8. Tais pacientes são os portadores do vírus HIV, pacientes em tratamento excessivo com corticoides, pessoas que receberam transplante de órgãos, pacientes com leucemia, linfoma ou sarcoidose. Os linfócitos também podem apresentar função citotóxica (CD8+), liberando moléculas como perforinas e granulinas, que causam a permeabilização e lise do microrganismo e são ativadas por um padrão de citocinas específico. As

células T podem desempenhar uma resposta do tipo Th1, Th2 ou Th17, dependendo do padrão de citocinas produzido e o balanço das três contribui para a eliminação efetiva ou não do microrganismo (VOELZ e MAY, 2010).

Foi mostrado anteriormente, que o tratamento de camundongos com aumento de citocinas relacionadas a uma resposta Th1 (TNF- α e IFN- γ) e Th17 (IL-17) reduz a proliferação intracelular do fungo, aumentando a atividade microbicida de macrófagos, enquanto que a presença de citocinas relacionadas a uma resposta Th2 (IL-4 e IL-13), causa um aumento da proliferação do fungo (BENJAMIN *et al*, 2014). Em pacientes com HIV, observa-se a ausência de resposta Th1 (ALTFELD *et al*, 2000), enquanto que pacientes que receberam transplante apresentam uma excessiva resposta do tipo Th2, o que explica a suscetibilidade desses pacientes à disseminação do fungo (SINGH *et al*, 2008). Além disso, foi visto que *C. neoformans* é capaz de modular ativamente o balanço de respostas Th1/Th2, aumentando a resposta Th2 a partir da expressão de eicosanoides como prostaglandinas e leucotrienos, moléculas inibitórias da resposta Th1 (NOVERR *et al* 2003) e da secreção de urease e polissacarídeos da cápsula, que estimulam a polarização Th2 (COX *et al*, 2000; ALMEIDA *et al*, 2001).

Inflamassoma

O sistema imune inato reconhece organismos estranhos ao organismo e os diferencia das moléculas próprias por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) específicos de organismos estranhos, como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicano (PGN) e flagelinas no caso de bactérias. Os PAMPs mais predominantes em fungos normalmente são polímeros da parede celular fúngica como quitina, β -glucana e manana. Tais moléculas são reconhecidas por receptores específicos na membrana de fagócitos, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Dentre eles, estão os receptores do tipo Toll (TLR); receptores do tipo lectina C (CLR); receptores do tipo RIG-1 (RLR), receptores do tipo AIM2 (ALRs) e os receptores do tipo NOD (NLR), que ativam uma série de reações no sistema imune e a eliminação do patógeno. Neutrófilos, macrófagos e monócitos fagocitam e eliminam o patógeno diretamente, enquanto células dendríticas apresentam o antígeno a linfócitos virgens, ativando

sua diferenciação e iniciando uma resposta específica ao organismo estranho (BOUR-
GEOIS *et al*, 2010).

Os principais receptores envolvidos no reconhecimento fúngico são os receptores de membrana TLR e CLR e os citoplasmáticos NLR e ALR. Os receptores de lectina (CLRs) são receptores de membrana nos fagócitos e apresentam grande importância na imunidade antifúngica. Incluem a dectina 1, 2 e 3, mincle e receptor de manose, sendo a dectina o principal receptor de β -glucana, componente abundante na parede celular fúngica. Dectina 1 e mincle ativam o inflamassoma NLRP3 via SYK-CARD9, que ativa a clivagem das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 pela caspase 1 (BROWN, 2011). Já os TLRs, também receptores de membrana, são especializados em reconhecer componentes fúngicos como zymozan, fosfolipomananas e ácido desoxirribonucleico (DNA) fúngico. Este receptor está ligado à molécula adaptadora fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e a ativa quando se liga a antígenos fúngicos específicos, ativando o fator de transcrição NF- κ B, que ativa a transcrição de genes de citocinas e defensas (VAN DE VEERDONK *et al*, 2008).

Dentre os receptores de membrana citados como importantes no reconhecimento fúngico, os principais receptores envolvidos no reconhecimento de PAMPS associados ao *C. neoformans* são os TLR 2, 4 e 9, sendo que os TLRs 2 e 4 reconhecem moléculas da cápsula, enquanto o TLR 9 reconhece padrões no DNA fúngico (CUNHA *et al*, 2010). O TLR 9 se mostrou muito importante para a montagem da resposta adaptativa frente à criptococose, favorecendo uma resposta Th1 e promovendo um aumento de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico por macrófagos (NAKAMURA *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011). Os receptores do tipo CLRs, por sua vez, apesar de serem muito importantes no reconhecimento de PAMPs fúngicos, de forma geral, não apresentam importância no reconhecimento do *C. neoformans* e na produção de uma resposta protetora frente à infecção (NAKAMURA *et al.*, 2007; WALSH *et al.*, 2017).

Além dos receptores de membrana, existem também receptores citoplasmáticos, como os NLRs e os ALRs, que reconhecem antígenos presentes no citosol da célula infectada. Os receptores do tipo NLR formam um grupo que compreende 22 membros em humanos e 34 em camundongos e alguns deles, como NLRP1, NLRP3 e NLRC4 podem se ligar a outras moléculas formando um complexo multiproteico, chamado inflamassoma.

soma. Tal complexo é responsável pela ativação da caspase-1, essencial para a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 e também pode contribuir para a piroptose, um mecanismo inflamatório de morte e lise celular (BERGSBAKEN *et al*, 2009) e para a secreção não convencional de proteínas (KELLER *et al*, 2008).

A via de ativação canônica do inflamassoma é formada pelo conjunto de uma PRR citoplasmática, uma proteína adaptadora ASC (proteína associada a apoptose ligada a caspase), um domínio de recrutamento e ativação (CARD) e uma pró-caspase-1. Quando o complexo é formado, a pró-caspase 1 é clivada, convertendo-se em caspase-1, uma protease ativa que cliva as pró-formas das citocinas IL-1 β e IL-18 em suas formas ativas e promove sua secreção. Tais citocinas são essenciais para ativação da resposta imune inata e da adaptativa via Th1 e Th17 (VAN DE VEERDONK, 2011).

O inflamassoma NLRP3 é o tipo mais importante no reconhecimento de infecções fúngicas, reconhecendo uma vasta gama de moléculas de PAMPs e DAMPs (padrões moleculares associados a danos) no citoplasma das células. Até o momento, sabe-se que para ativar o inflamassoma, são necessários dois sinais: o primeiro ocorre através dos receptores de membrana, como os TLRs e CLRs, que induzem a ativação do fator de transcrição NF- κ B, promovendo assim a transcrição de pró-IL-1 β , pró-IL-18, pró-caspase 1 e NLRP3. O segundo sinal é usualmente uma perturbação intracelular que é reconhecida pelo NLRP3, que leva à formação do complexo do inflamassoma. Quando o complexo multiproteico é formado, a pró-caspase 1 é clivada em caspase 1 ativa,

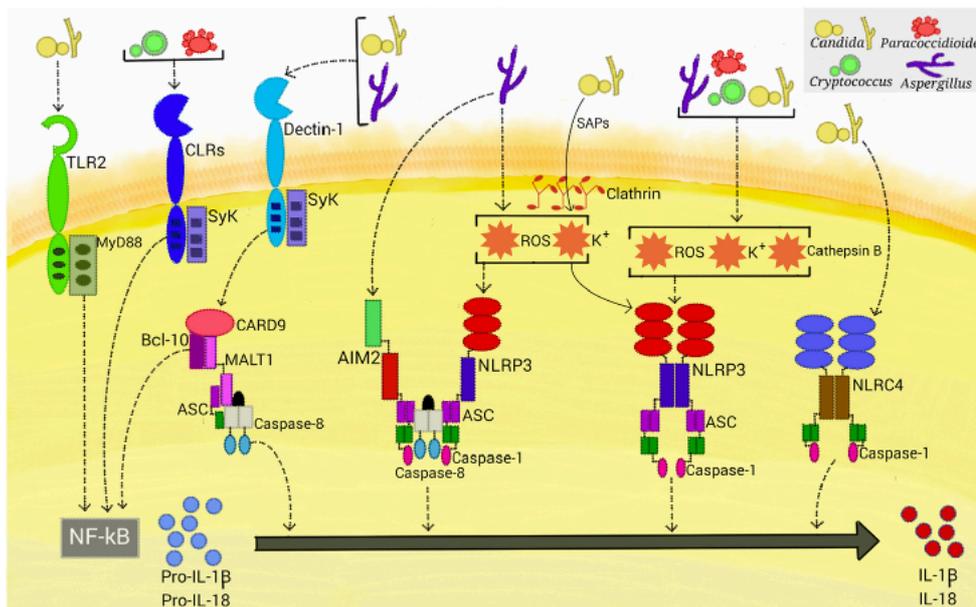


Figura 3. Ativação do inflamassoma por patógenos fúngicos (TAVARES *et al*, 2015).

que cliva as citocinas imaturas pró-IL-1 β e pró-IL-18, tornando-as biologicamente ativas (VANAJA *et al*, 2015).

Foi visto anteriormente, que fungos induzem alguns distúrbios celulares que ativam a montagem do inflamassoma e a secreção de IL-1 β , como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), efluxo de potássio e ruptura do lisossomo. A ruptura do lisossoma gera a liberação de catepsina B, que também se mostrou importante para a maturação de IL-1 β em macrófagos infectados com *C. albicans* e monócitos infectados com *C. neoformans*, *Microsporium canis* e *Trichophyton schoenleinii*. Assim, nota-se que diferentes espécies de fungos ativam o inflamassoma NLRP3 de diferentes formas e os receptores citoplasmáticos responsáveis por reconhecer cada um deles também é diferente, sendo que CLR's geralmente reconhecem *C. neoformans* e *P. brasiliensis*, enquanto Dectina 1 é responsável pelo reconhecimento de *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus* (TAVARES *et al*, 2015).

Diferente de outras espécies fúngicas, *C. neoformans* não é tão eficiente em ativar a via canônica do inflamassoma quando se encontra em sua forma capsular planctônica. Para que este fungo ative o inflamassoma e induza a produção de altas doses de IL-1 β , é necessário que esteja na forma de biofilme e esteja viável (LEI *et al*, 2013). Além disso, o GXM, presente nas cepas capsulares de *C. neoformans*, inibe a ativação do inflamassoma e secreção de IL-1 β , provavelmente devido à inibição causada pela cápsula no reconhecimento pelos PRRs dos fagócitos (GUO *et al.*, 2014). Entretanto, foi visto que leveduras capsulares e planctônicas podem sim ativar o inflamassoma desde que previamente opsonizadas e fagocitadas e que o inflamassoma apresenta importante função no combate à infecção por *C. neoformans* (CHEN *et al.*, 2015).

Considerando a importância da interação do fungo com o sistema imunológico do hospedeiro e a resposta do fungo nos diferentes tecidos que podem infectar, no presente trabalho, foram obtidas vesículas extracelulares de *C. neoformans* crescendo em meios de cultura com diferentes concentrações nutricionais *in vitro*, com o objetivo de analisar possíveis diferenças em suas características morfológicas, constitutivas e quanto a sua atividade imunomodulatória *in vitro* e *in vivo*.

Para isso, foram utilizados meios de cultura com diferentes concentrações nutricionais como meio para indução da produção de vesículas e foram utilizadas as cepas de *C. neoformans* B3501 (capsular) e Δ Cap67 (acapsular). Após o isolamento e caracterização das EVs, foram analisadas suas características imunomodulatórias por meio da interação com macrófagos e células dendríticas derivados de medula óssea (BMDMs e BMDCs respectivamente). Ademais, foram utilizadas como tratamento de camundongos infectados com *C. neoformans* para posterior análise dos genes relacionados à ativação do inflamassoma que poderiam estar diferencialmente expressos em função do tipo de EVs utilizadas como tratamento.

OBJETIVOS

Geral:

Analisar as funções imunomodulatórias das vesículas extracelular de *C. neoformans* e sua influência na modulação do inflamassoma em função da disponibilidade nutricional no meio de cultura em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Específicos:

- Obter e caracterizar EVs de *C. neoformans* crescendo em diferentes condições nutricionais;
- Realizar ensaios *in vitro* de interação das EVs isoladas com macrófagos e células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos (BMDMs e BMDCs) e avaliar a concentração de IL1 β nos sobrenadantes.
- Analisar a influência das EVs no tratamento de camundongos infectados com *C. neoformans* na modulação do inflamassoma, por meio de análise da carga fúngica, histopatológica e expressão gênica nesse órgãos em função do tratamento utilizado.

METODOLOGIA

Animais

Neste trabalho foram utilizados 36 camundongos de uma linhagem isogênica de C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade. A linhagem C57BL/6 é amplamente utilizada em modelos de estudo para infecção por *C. neoformans*, sendo considerada uma linhagem susceptível à infecção quando nesta idade, apresentando resposta imune polarizada para Th2 (BLACKSTOCK *et al*, 2004; CHEN *et al*, 2008). Todos os camundongos foram criados no biotério do Instituto de Biologia – UnB, sendo mantidos em padrão sanitário, recebendo água e alimentação “*ad libitum*”. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA-UnB), sob projeto intitulado: “Papel de Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) na Infecção Murina por Patógenos Fúngicos” (UnBDoC nº 55924/2016) e conduzidos de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA).

Cryptococcus neoformans

Foram utilizadas duas cepas de *C. neoformans*, uma capsular B3501 (*C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D) (KWON-CHUNG *et al*, 2006) e Δ CAP67 (*C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D - mutante acapsular derivado da cepa B3501) (BULMER *et al*, 1967). Estas cepas foram inoculadas em um meio de congelamento, composto de 70% de Sabouraud Dextrose Broth (Kasvi) e 30% glicerol (Vetec), e mantidas em alíquotas congeladas em -80°C por um ano (SILVA *et al*, 2008). Antes de ser utilizada em experimentos, a alíquota foi descongelada e cultivada em meio Sabouraud Dextrose Broth (SDB) por 72 horas, a 30°C sob agitação de 120 RPM. Após este período, uma pequena alíquota destas leveduras foi retirada e cultivada em um novo meio SDB, desta vez por 48 horas, nas mesmas condições de cultivo. Após este segundo crescimento as leveduras eram preparadas para serem utilizadas nos experimentos subsequentes. O preparo das leveduras era realizado centrifugando uma alíquota a 3000 g por cinco minutos e ressuspensando as células em tampão fosfato salina (PBS), repetindo esta operação por mais duas vezes. Após estas lavagens, o fungo estava pronto para ser utilizado.

Isolamento de Vesículas Extracelulares

As vesículas foram isoladas a partir de sobrenadantes de cultura de *C. neoformans* das cepas B3501 e Δ Cap67, usando como base protocolos já bem descritos na literatura (BROWN *et al*, 2015). Foram utilizados os meios de cultura nutricionalmente rico Sabouraud Dextrose caldo (dextrose - 20g/L e peptona - 10g/L) - Kasvi nas concentrações de 100%, 50% e 10% (tamponados com MOPS na concentração de 50 mM). Também foi usado o meio definido e nutricionalmente pobre (meio mínimo composto de dextrose (15 mM), MgSO₄ (10 mM), KH₂PO₄ (29,4 mM), glicina (13 mM) e tiamina-HCl (3 μ M). Inicialmente, as duas cepas de *C. neoformans* foram inoculadas nos meios de cultura citados anteriormente na concentração de 5×10^4 células/mL para cada 500 mL de meio e ficaram crescendo em frascos erlenmeyer de 1L por 5 dias a 30°C sob agitação a 120 rpm.

Após 5 dias em cultura, o fungo foi centrifugado duas vezes a 15000 g por 15 minutos, retirando o pellet entre as centrifugações a fim de usar o sobrenadante, onde estavam as vesículas. O sobrenadante, então, passou por sucessivas etapas de filtração a vácuo em membranas Millipore com poros de 0,8 μ m e 0,45 μ m respectivamente, sendo o filtrado posteriormente concentrado num sistema Amicon com uma membrana de 100 KDa Millipore. O concentrado retido pela membrana passou por dois ciclos de ultracentrifugação a 100.000 g por 1 hora cada, sendo ressuspenso em PBS estéril com gentamicina a 25 mg/L, a fim de se evitar contaminações durante o processo.

O GXM, uma das principais moléculas constituintes da cápsula fúngica do *C. neoformans*, estava presente nas suspensões de vesículas, como visto em experimentos anteriores realizados pelo grupo. Para a sua retirada, realizou-se um ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de captura com afinidade por GXM usando o anticorpo 18B7 (RODRIGUES *et al*, 2007). Esse, é um anticorpo monoclonal murino do tipo IgG1 que possui especificidade contra a GXM e é usado para opsonização de *C. neoformans* e foi gentilmente cedido pelo Dr. Arturo Casadevall (*Albert Einstein College of Medicine* – Nova Iorque) (CASADEVALL *et. al.*, 1998). Em estudos anteriores do grupo ainda não publicados, esse anticorpo se mostrou eficiente também na captura de GXM presente nas suspensões de vesícula. Para isso, uma placa de ELISA de 96 poços foi sensibilizada com 50 μ L do anticorpo na concentração de 10 μ g/mL, por uma hora

em temperatura ambiente. Depois disso, a placa foi lavada três vezes com PBS estéril e depois bloqueada com 50 μ L albumina sérica bovina (BSA) a 1mg/mL por uma hora a 37°C. Depois disso a placa foi lavada novamente três vezes com PBS a fim de retirar todo o BSA, já que a albumina possui a capacidade de romper as vesículas (WOLF, J.M. et. al. 2012) e foram adicionados 50 μ L de vesículas previamente isoladas em cada poço, que ficaram por uma hora em temperatura ambiente e depois foram passadas a outros poços previamente tratados com 18B7 por mais uma hora.

Caracterização das vesículas

As EVs foram indiretamente quantificadas pela dosagem de esterol utilizando o kit Amplex Red Cholesterol e pela quantificação de proteínas com o kit Micro BCA, ambos da Thermofisher Scientific, utilizando as instruções do fabricante. Os dois kits são colorimétricos e em uma placa de 96 poços, fez-se uma curva com concentrações padrão de colesterol ou albumina sérica bovina (BSA), respectivamente, adiciona-se as amostras e em cada um dos poços se adicionou uma solução coquetel presente nos kits, que reage com as moléculas a serem quantificadas, provocando mudança de cor. Tal cor é detectada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de fluorescência com excitação em 540 nm e emissão em 590 nm no caso do Amplex Red e de absorvância 562 nm no caso do Micro BCA.

Para caracterização morfológica foi utilizado Dynamic Light Scattering (DLS) “Zetasizer Nano ZS” do laboratório de biofísica molecular da Universidade de Brasília (UnB), e Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão e Microscopia Confo-cal feitas no Laboratório de Microscopia e Microanálise da UnB.

Microscopia de Transmissão:

As vesículas isoladas foram ultracentrifugadas novamente a 100.000 g por uma hora e ressuspendidas em 100 μ L de tampão Karnovsky (4% paraformaldeído e 2,5% glutaraldeído em tampão fosfato 1%), em que ficaram em suspensão por pelo menos duas horas. Este tampão é usado para uma pré-fixação das proteínas presentes em amostras biológicas, como descrito por Karnovsky, 1965. Uma gota dessa suspensão foi colocada sobre uma tela de microscopia (grid) de cobre fornecida pelo Laboratório de Mi-

croscopia e Microanálise da UnB, que promove a atração dos elétrons provenientes do canhão de elétrons do microscópio e permite a passagem dos mesmos. Após a secagem do material, foi adicionada uma gota do contrastante acetato de uranila sobre a amostra, promovendo uma maior interação entre os elétrons e a amostra. Após esta etapa, as amostras foram levadas para o microscópio eletrônico de transmissão “Jeol JEM-1011” e foram obtidas imagens com aumento de 15 mil e 25 mil vezes de aumento, permitindo visualizações panorâmicas e mais específicas das amostras.

Microscopia de Varredura

Da suspensão de vesículas pré-fixadas com tampão Karnovsky, foi adicionada uma gota sobre uma lamínula coberta com polidrilisina, que permite a aderência da amostra na lamínula. Esperou-se secar a amostra e depois adicionou-se uma gota de tetróxido de ósmio, para a fixação dos lipídeos. Após 30 minutos, as amostras passaram por sucessivas lavagens em acetona a fim de substituir o conteúdo de água por acetona, permitindo então a secagem a ponto crítico. As lavagens foram feitas aumentando progressivamente a concentração de acetona (50%, 70%, 90% e duas de 100%) a fim de desidratar a amostra lentamente, evitando mudanças drásticas na estrutura das vesículas. Após desidratação, as amostras passaram pela etapa de secagem a ponto crítico, uma técnica usada para retirar o líquido presente nas amostras, substituindo a acetona por CO₂. Para isso, é usado um equipamento específico, contendo uma câmara que se enche de CO₂ líquido, a uma temperatura muito fria, substituindo a acetona presente na amostra por CO₂ líquido e depois aumenta lentamente a temperatura até 30°C, para que o CO₂ passe para a fase gasosa. Por fim, as amostras foram metalizadas, a fim de tornar a superfície boa condutora e atrair os elétrons para a amostra, permitindo a formação da imagem. As lamínulas foram fixadas em cima de um suporte de metal e as amostras revestidas com uma cobertura de platina utilizando equipamento específico para metalização. Após esta etapa, as amostras estavam prontas para visualização no microscópio eletrônico de varredura “Jeol JSM-7000F”. Neste, foram obtidas imagens com aumento de 30 ou 70 mil vezes, a fim de se obter registros panorâmicos ou mais específicos da amostra.

Microscopia Confocal

Para a análise da internalização de vesículas ou do conteúdo vesicular por fagócitos no Microscópio Confocal, foi realizado um ensaio de interação entre macrófagos diferenciados de medula (BMDM) e as EVs de Δ Cap67 e B3501 produzidas em SDB 50% ou 100%. Para a identificação dos macrófagos, foi utilizado 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI - Life Technologies), fluoróforo que se liga em regiões ricas em adenina e tiamina nas moléculas de DNA. Este fluoróforo apresenta absorção máxima em comprimento de onda 358 nm e emissão em 460 nm, emitindo uma fluorescência azul. Para marcação das EVs foi utilizado o fluoróforo 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina (DiIC) solução de marcação celular (Invitrogen), com afinidade por membranas e lipídeos biológicos. Este fluoróforo absorve luz no comprimento de onda 450 nm e emite em 600 nm. O ensaio foi realizado em um sistema de lâmina associada a uma câmara de cultura (Lab-Tek), na qual foi plaqueado 1 mL de RPMI + 10% SFB contendo 7×10^5 macrófagos e ficaram por duas horas em estufa para aderirem no fundo da placa.

As vesículas purificadas foram marcadas por uma hora com Dil a 5 μ M diluído em PBS e depois foram lavadas uma vez com PBS 1% (ultracentrifugação a 100 mil g por uma hora) (NICOLA *et al*, 2009). Após a marcação, as vesículas foram incubadas com os macrófagos na concentração final de 50 ng/mL por 30 minutos a 37°C e em 5% CO₂ (OLIVEIRA *et al*, 2010). Posteriormente, os macrófagos incubados com as vesículas foram lavados com PBS e fixados com paraformaldeído (Vetec) a 4% em PBS por 5 minutos. Depois, as células foram lavadas novamente e bloqueadas com PBS + 5% de BSA por uma hora em temperatura ambiente. Depois disso, foi feita mais uma lavagem e o núcleo dos macrófagos foi marcado com DAPI (10 μ g/mL) por 5 minutos. Por fim, as células e vesículas marcadas foram lavadas mais uma vez e foi adicionada uma gota de glicerol 50 mM diluído em PBS (OLIVEIRA *et al*, 2010). Depois disso, a câmara de cultura foi retirada, deixando somente a lâmina contendo a amostra tratada e por cima dela foi fixada uma lamínula com auxílio de esmalte nas bordas. Após esta etapa, as amostras foram visualizadas em microscópio confocal de varredura a laser “TCS SP5 X” (Leica) em filtros específicos para cada fluoróforo, com imersão em óleo.

Deteção da atividade enzimática nas EVs

As enzimas lacase e urease, fatores de virulência utilizados pelo *C. neoformans* para degradar o fagolisossomo do hospedeiro e a fosfatase ácida, proteína criptococócica que permite a adesão do fungo em células epiteliais e está relacionada à secreção de vesículas, foram quantificadas nas suspensões de vesículas por meio de ensaios espectrofotométricos. O pellet obtido após a ultracentrifugação a 100.000 g foi ressuspenso em PBS e diluído seriadamente em meios específicos para as reações de catálise de cada uma das enzimas. O meio de reação próprio para a lacase era composto por 0.2% (10 mM) de L-DOPA em PBS, o meio para atividade ureásica era composto por 4% de ureia, 0.02% de extrato de levedura, 0.002% phenol red, 0.273% KH_2PO_4 e 0.285% de Na_2HPO_4 . Para a determinação de fosfatase, o meio de reação consistia de tampão de acetato (pH 5) suplementado com 5 mg/ml de *p*-nitrofenil-fosfato. As suspensões de vesículas foram incubadas overnight em temperatura ambiente e protegidas da luz e as reações foram quantificadas por meio de leitura a 450 nm (lacase), 405 nm (fosfatase) e 540 nm (urease) em espectrômetro de massa Multiscan mass spectrometer (MS) (Labsystem, Helsinki, Finland). A quantidade de EVs utilizada foi relacionada à concentração proteica, em que foram utilizados 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como concentração máxima (RODRIGUES *et al*, 2008).

Diferenciação de BMDM e BMDC

Os macrófagos e células dendríticas derivados da medula óssea (BMDM e BMDC) foram diferenciados a partir de células de medula óssea obtidas de camundongos C57BL/6 entre 8 e 10 semanas de idade. Para isso foram utilizados fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos GM-CSF (ImmunoTools) e β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) para obtenção de macrófagos com um perfil pró-inflamatório M1 e células dendríticas, enquanto o sobrenadante de células L-929 foi utilizado para a obtenção de macrófagos com um perfil anti-inflamatório (M2).

Para extração das células de medula óssea, foi utilizada a técnica de lavagem femoral. Resumidamente, os camundongos foram sacrificados por meio de asfixia em câmara de CO_2 , seguido pela retirada do fêmur e tibia das duas patas traseiras, separadamente. Cada osso era cortado ao meio e seu interior, lavado utilizando-se uma seringa

de agulha 0,3 x 13 mm contendo meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), obtendo-se assim as células. As células foram então submetidas por um processo de lise de eritrócitos, a partir de um tampão de lise contendo cloreto de amônio em tampão Tris, e em seguida contadas em hemocitômetro. Estas células posteriormente foram ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino (SFB – Gibco) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) e acondicionadas em criotubos, na concentração de $5 \times 10^6/\text{mL}$. Os criotubos eram acondicionados em um recipiente denominado “Mr. Frosty” (Thermo Scientific), que mantém a viabilidade celular durante o congelamento, a partir de uma queda de temperatura constante (-1°C por minuto). Após 24 horas em freezer -80°C , os criotubos eram transferidos para um reservatório contendo nitrogênio líquido.

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

dimento proporcional de macrófagos e DCs foi analisado por meio de citômetro de fluxo (FACSVerse – BD Biosciences).

Para a obtenção de macrófagos com um perfil M2 anti-inflamatório, as células foram ressuspensas em meio de diferenciação LCCM (20% de SFB, 50% de RPMI-1640 e 30% de sobrenadante de L929) e transferidas para placas de cultivo na concentração de 2×10^6 por 10 mL por placa, sendo colocadas em situação de cultivo (37°C sob atmosfera de 5% de CO_2). Após quatro dias, mais 10 mL de meio de diferenciação LCCM foram adicionados em cada placa. No oitavo dia de cultivo, o sobrenadante foi retirado da placa e as células foram coletadas usando “Tryple Express” (Life Technologies), por 30 minutos a 37°C . Os macrófagos foram então ressuspensos em meio de experimento (90% de RPMI-1640 e 10% de SFB,) e plaqueados em placa de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células por mL, ficando em repouso por duas horas em estufa a 37°C para aderirem ao fundo da placa. Após este tempo, o meio contido nas placas foi renovado e os experimentos subsequentes foram realizados (ZAMBONI e RABINOVITCH, 2003).

A linhagem celular L929 é uma cultura de hibridomas murinos com característica de fibroblastos. Quando em cultura, esta linhagem celular apresenta a capacidade de expressar grandes quantidades de fator de crescimento de macrófagos (M-CSF) e uma pequena quantidade de GM-CSF (ENGLER *et al*, 1995). Estes fatores são os responsáveis pela diferenciação das células de medula óssea em macrófagos primários no procedimento de diferenciação supracitado. Para a obtenção destes fatores, células L929 foram cultivadas em garrafas de cultura e deixadas em crescimento (90% de RPMI-1640 e 10% de SFB) até a obtenção da confluência (todo o espaço de cultivo preenchido). Atingindo este evento, o meio foi repostado e as células permaneceram em situação de cultivo por 7 dias. O sobrenadante resultante deste cultivo foi filtrado em poro $0,22 \mu\text{m}$, dando origem ao sobrenadante de L929, utilizado no meio de diferenciação LCCM.

Interação das EVs com BMDM e BMDC

Para analisar a influência das EVs produzidas em diferentes condições nutricionais na ativação do inflamassoma, os macrófagos e BMDCs foram incubadas com 40 ng/mL de esterol de cada tipo de EVs, previamente quantificadas pelo kit Amplex Red.

Foram incubadas 10^6 células por mL por poço em placa de 96 poços e posteriormente os sobrenadantes foram coletados para quantificação de citocinas pelo método de ELISA.

Como controle, as células foram incubadas somente com PBS (controle negativo), ou estimuladas com lipopolissacarídeos de *E. coli* (LPS - Sigma-Aldrich), responsável pelo primeiro sinal de ativação do inflamassoma, ou nigericina (Invivogen), responsável pelo segundo sinal, ou os dois (controle positivo). Outro controle utilizado foi o meio condicionado da cepa B3501, cultivado em Meio Mínimo (CM35), que contém moléculas secretadas $<1\text{KDa}$ e apresenta a capacidade de inibição do inflamassoma canônico, como descrito em experimentos anteriores realizados pelo grupo (BÜRCEL, 2018). Os grupos experimentais foram as células somente com as vesículas, para investigar se as mesmas são capazes de ativar o inflamassoma por si só; as células pré-ativadas com LPS, nigericina ou LPS + nigericina e incubadas com as EVs produzidas em diferentes condições, a fim de saber se as vesículas funcionam como primeiro ou segundo sinal para a ativação do inflamassoma. Além disso, também foram testados grupos com ou sem soro fetal bovino, já que este soro contém albumina, componente responsável pela desintegração das vesículas causando a liberação de seu conteúdo.

Após o plaqueamento das células, estas eram estimuladas ou não com LPS - 500 ng/mL por 4 horas, a partir da ativação de NF- κ B. Após este período, eram acrescentados 40 ng/mL de conteúdo de esterol das vesículas produzidas nos diferentes meios de cultura, que ficavam em cultura overnight (aproximadamente 18 horas). Essa concentração foi escolhida por representar a menor concentração efetiva em modular o inflamassoma (dados não mostrados, obtidos pelo grupo). No dia seguinte, os poços específicos recebiam nigericina (20 μM – Invivogen) por 40 minutos, promovendo o efluxo de potássio e conseqüentemente a ativação do NLRP3. Após este tempo, o sobrenadante foi coletado.

Quantificação de citocinas por ELISA

Os sobrenadantes obtidos a partir do ensaio de interação entre os macrófagos ou células dendríticas *in vitro* e as vesículas e dos macerados dos pulmões dos animais infectados e tratados com as vesículas foram utilizados para a dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , a partir da técnica de ELISA do tipo sanduíche. Foram utilizados

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

Infecção dos animais e tratamento com as EVs

Para analisar a influência do tratamento com as EVs em camundongos infectados com *C. neoformans*, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade. Para esse experimento, foi escolhida a cepa B3501 capsular, que ficou em cultura em meio Sabouraud Broth por 24h, a 30°C, sob agitação de 120 RPM. Os tratamentos foram realizados com EVs de B3501 e Δ Cap67 cultivados em meio rico (Sabouraud 100%)

Cada grupo experimental foi composto por um n=3 camundongos e foram realizados dois esquemas de tratamento, em que os animais foram tratados com as vesículas no segundo e no quarto dia pós infecção, sendo sacrificados 5 ou 15 dias pós infecção e outro em que o tratamento foi feito dois e quatro dias antes da infecção e o sacrifício ocorreu 15 dias após. Para a infecção, os animais foram anestesiados segundo as recomendações do Comitê de Ética injetando uma solução (1:1) de Ketamina injetável (Vetnil) e Xilazina injetável (Ceva) na região intramuscular de uma das patas traseiras dos camundongos. Realizou-se uma solução estoque de anestésico contendo 120 μ L de Xilazina, 120 μ L de Ketamina e 560 μ L de soro fisiológico. O animal era pesado e seu

peso em gramas era multiplicado por 5 para determinar o volume em microlitros da solução a ser administrada. Esperou-se que os camundongos ficassem inconscientes, tentando colocá-los com a barriga voltada para cima e observando se não reagem a dor. Se a dose de anestesia não fosse suficiente, repetia-se a dose. Depois disso, utilizou-se uma lâmina de bisturi cirúrgico estéril (CIRUBLADE) para fazer um corte da pele na região traqueal do animal, expondo a traqueia. Usando uma seringa e agulha, foram inoculados 30 μL de PBS contendo 2×10^4 células de *C. neoformans* ou somente PBS, no caso do grupo controle, e a região do corte foi fechada com cola VetBond (3M). Para o tratamento, cada animal foi tratado via intranasal com 50 μg (conteúdo proteico) de EVs (HUANG, 2012) em 20 μL de PBS, sendo um grupo tratado com EVs de ΔCap67 , outro com EVs de B3501 e os outros dois só com PBS (HUANG, 2012).

Os camundongos infectados e tratados foram monitorados diariamente para a verificação do estado de saúde geral dos animais e foram sacrificados com 5 ou 15 dias pós-infecção utilizando asfixia em câmara de CO_2 para retirada dos pulmões e cérebro. Pequenos fragmentos dos órgãos foram isolados, fixados em 10% de formaldeído e inseridos em cassetes para realização dos blocos e lâminas de histopatológico. Demais fragmentos foram adicionados em tubos de 2 mL contendo pérolas de metal e 1 mL de PBS, sendo homogeneizados utilizando o aparelho TissueLyser (Qiagen). Os homogenatos obtidos foram diluídos 10 e 100 vezes e semeados em placas de Sabouraud ágar (Kasvi) e cultivados durante 2 dias a 30°C para quantificação da carga fúngica por meio da quantificação de unidades de colônia (UFC). Adicionalmente, o homogeneizado restante foi centrifugado e o sobrenadante coletado para quantificação de citocinas por ELISA.

Alternativamente, fragmentos do pulmão foram homogeneizados pela técnica descrita acima, porém em 1 mL do tampão de lise “QIAzol Lysis Reagent” (Qiagen). Para detecção dos genes diferencialmente expressos nos pulmões infectados, foi utilizado um kit de PCRarray denominado “Mouse Inflammasomes RT2 Profiler PCR Array” (Qiagen), que reconhece 84 genes-chave envolvidos na ativação do inflamassoma, proteínas associadas ao complexo do inflamassoma, proteínas envolvidas na imunidade inata, bem como na sinalização do NOD-like (NLR). Para isso, primeiramente foi feita a extração do ácido ribonucleico (RNA) das células anteriormente homogenei-

zadas, utilizando mini-kit RNeasy (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi quantificado utilizando o nanofotômetro Implen e foi feito um gel de eletroforese para a verificação da integridade do RNA. Estando íntegro, o RNA foi convertido a DNA complementar (cDNA) utilizando o kit “RT² First Strand Kit” (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante, para posteriormente ser utilizado no ensaio de RT² PCR. O preparo das amostras seguiu as instruções e reagentes fornecidos pelo kit de PCR Array e o ensaio foi realizado em instrumento próprio para RT PCR da Applied Biosystems™ 7500 Fast Real Time PCR System. A análise dos dados obtidos foi realizada no software online da Qiagen denominado “GeneGlobe Data Analysis Center”.

Os genes constitutivos utilizados como controle foram os genes: Beta-2 microglobulin (BM2), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), Glucuronidase, beta (Gusb), Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1 (Hsp90ab1), Mouse Genomic DNA Contamination (MGDC), Reverse Transcription Control (RTC), Positive PCR Control (PPC). A normalização foi feita manualmente e os genes utilizados como controle foram os Hsp90ab1 e Gusb. O fold change utilizado em todas as análises foi de 2X e o C_T mínimo de detecção foi considerado a partir de 30.

Análise Estatística

Os resultados apresentados nesse trabalho referem-se a um experimento representativo, com grupos em triplicata, de pelo menos dois ensaios independentes. As análises estatísticas foram realizadas a partir do método one-way ANOVA, comparando os resultados de todas as amostras. Foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software). Dados considerados significativos foram demonstrados com *, quando $P < 0,05$; com **, quando $P < 0,01$; com ***, quando $P < 0,001$; com ****, quando $P < 0,0001$ e com ns, quando $P > 0,05$.

RESULTADOS

Caracterização das vesículas

Após a obtenção e isolamento das EVs, as mesmas foram caracterizadas quanto ao seu tamanho, quantidade produzida, conteúdo de esterol e de proteínas a fim de comparar possíveis alterações, dependendo da disponibilidade de nutrientes no meio de cultura, bem como as diferenças relativas a cada cepa estudada. Observou-se que, quando *C. neoformans* (B3501 e Δ Cap67) é cultivado no meio Sabouroud 100%, observa-se uma quantidade maior de vesículas e com maior conteúdo proteico do que quando os fungos são cultivados em um meio mais pobre (Figura 4). Curiosamente, nenhuma diferença significativa foi visualizada entre a cepa selvagem e mutante, assim como não foi possível o estabelecimento de uma correlação clara entre a quantidade de ergosterol na membrana e a concentração proteica presente nas EVs. Desta forma, os resultados obtidos nos ensaios de quantificação demonstram que o cultivo do fungo em meio de cultura com uma maior presença de nutrientes, favorece a maior produção de EVs pelo fungo, independente da presença da cápsula polissacarídica.

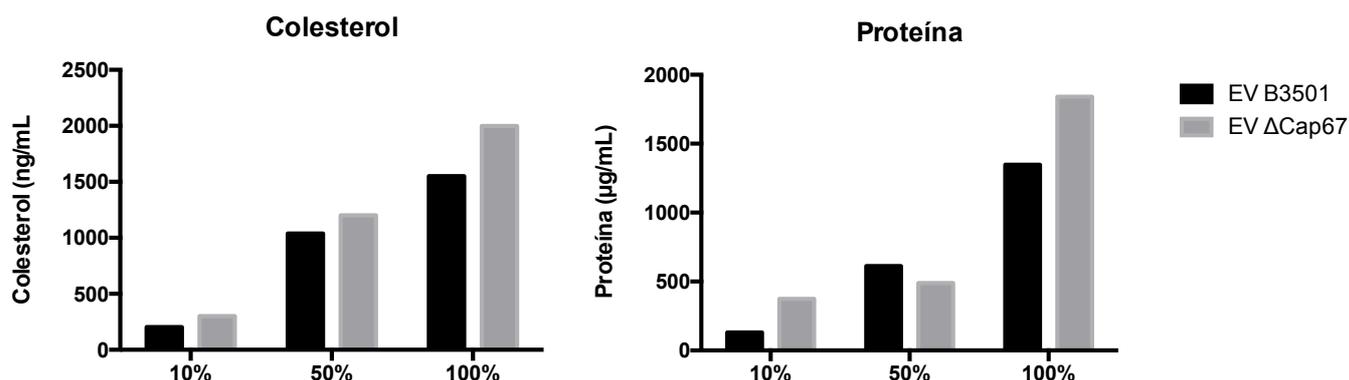
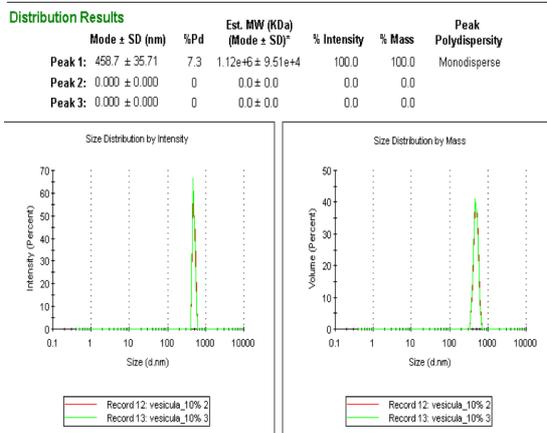


Figura 4. Conteúdo proteico e de esterol nas suspensões de EVs. O fungo *C. neoformans*, dos isolados B3501 e Δ Cap67, foram cultivados em meio SDB nas concentrações de 100%, 50% e 10% durante 5 dias. Após este tempo, as vesículas foram separadas, quantificadas quanto ao seu conteúdo protéico e de esterol. Figura representativa de várias quantificações realizadas.

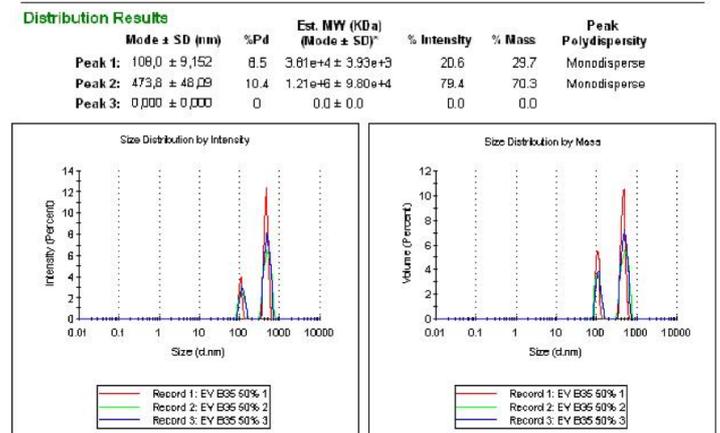
Posteriormente, foi feita uma caracterização qualitativa das EVs por meio de (DLS) e Microscopias Eletrônica de Transmissão e Varredura. O DLS foi utilizado a fim de analisar diferenças em seus diâmetros hidrodinâmicos e na polidispersão das suspensões, enquanto a microscopia eletrônica foi utilizada a fim de corroborar os índices observados no DLS e visualizar características de membrana das EVs.

Na Figura 5 estão representados os picos de intensidade e volume obtidos no DLS das EVs da cepa B3501 após ser cultivada em meios SDB 10%, 50% e 100%. É possível observar que os diâmetros hidrodinâmicos das EVs produzidas no meio SDB 10% foram significativamente maiores (Figura 5a), com média de 458,7 nm do que as EVs produzidas no meio rico SDB 100%, que tiveram uma média de 105 nm (Figura 5c). Já as EVs produzidas no meio SDB 50% apresentaram dois picos, um predominante, com média de 473,8 nm e outro menos frequente com média de 108 nm (Figura 5b). Assim, o cultivo do B3501 em meios mais pobres aparentemente estimula a produção de EVs maiores do que o cultivo em um meio rico, porém com um conteúdo protéico menor.

(a) SDB 10%



(b) SDB 50%



(c) SDB 100%

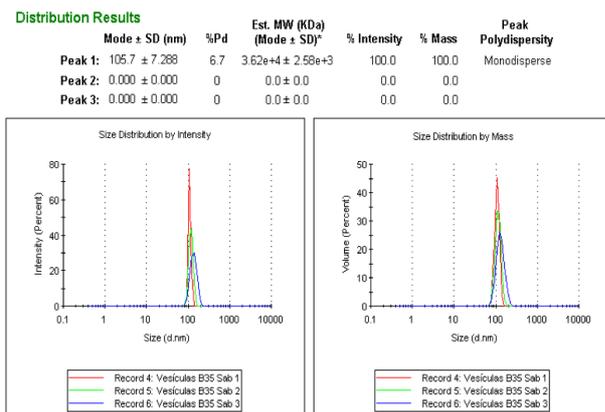


Figura 5. Diâmetro hidrodinâmico das EVs de *C. neoformans* B3501 produzidas durante o crescimento do fungo em meios de cultura (a) meio SDB em concentração de 10%, (b) 50 % (c) 100 %.

Na Figura 6 também estão representados os picos de intensidade e volume das EVs registrados no DLS. Nesta figura, estão representadas as EVs da cepa acapsular Δ Cap67 produzidas durante o cultivo do fungo em meios SDB 50% e 100% e um gráfico comparando as médias dos diâmetros hidrodinâmicos dependendo do meio de cultura utilizado no cultivo de cada cepa (Figura 6D). As EVs da cepa Δ Cap67 se comportaram da mesma forma que as EVs de B3501, em que as EVs produzidas em meios de cultura mais pobres apresentaram diâmetros hidrodinâmicos maiores do que as EVs produzidas no meio rico SDB. As EVs produzidas no meio SDB 50% apresentaram uma média de 312,6 nm (Figura 6a) e as no meio SDB 100%, uma média de 91,28 nm (Figura 6b). Assim, tanto a cepa capsular B3501, quanto seu mutante acapsular Δ Cap67 produzem vesículas maiores, principalmente quando cultivados em um meio SDB 50%, apesar de a carga proteica dessas EVs não ter sido maior nessas condições. O aumento das EVs de acordo com a diminuição dos nutrientes no meio de cultura está de acordo com o aumento da cápsula fúngica, fator de virulência que sofre um aumento significativo quando este está em condições de estresse nutricional, caracterizando as EVs também como possível fator de virulência.

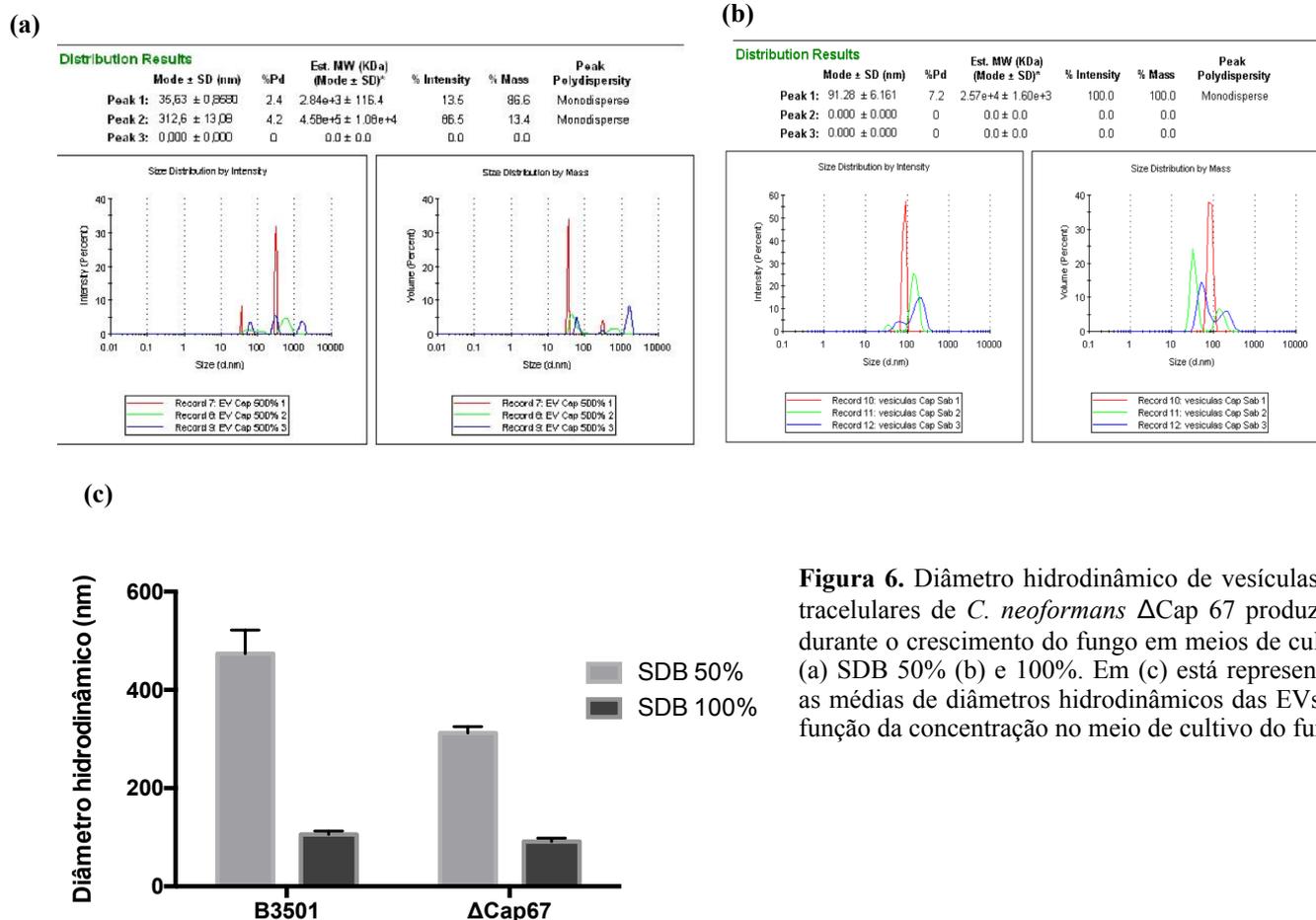


Figura 6. Diâmetro hidrodinâmico de vesículas extracelulares de *C. neoformans* Δ Cap 67 produzidas durante o crescimento do fungo em meios de cultura (a) SDB 50% (b) e 100%. Em (c) está representado as médias de diâmetros hidrodinâmicos das EVs em função da concentração no meio de cultivo do fungo.

As vesículas foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura, quando produzidas em meio SDB 50% e 100%. Na Microscopia de Varredura (Fig. 7) foi possível notar a presença de EVs de B3501 significativamente maiores quando produzidas em SDB 50% (~200 nm) (Figura 7a) em relação àquelas produzidas em SDB 100% (~100 nm) (Figura 7b), apesar de serem encontradas EVs de 100 nm também na suspensão de EVs produzidas no SDB 50% (Figura 7a). Esse dado corrobora com o obtido no DLS, que mostra duas populações de EVs na suspensão de EVs a 50% (Figura 5b). Entretanto, o mesmo não foi possível observar na imagem das EVs de Δ Cap67, em que estão representadas EVs com tamanhos similares em ambas as condições de crescimento do fungo. Já na Microscopia de Transmissão (Figura 8), observou-se que as EVs de Δ Cap67 eram maiores quando o fungo crescia no meio pobre SDB 50% (Figura 8c) do que quando ele crescia no meio rico SDB 100% (Figura 8d), corroborando com os dados do DLS. Assim, apesar de as EVs de ambas as cepas apresentarem uma característica heterogênea, aparentemente o cultivo em meio pobre estimula a produção de EVs maiores, já que em situações de estresse, o fungo aparentemente produz uma quantidade maior de moléculas encapsuladas nas EVs.

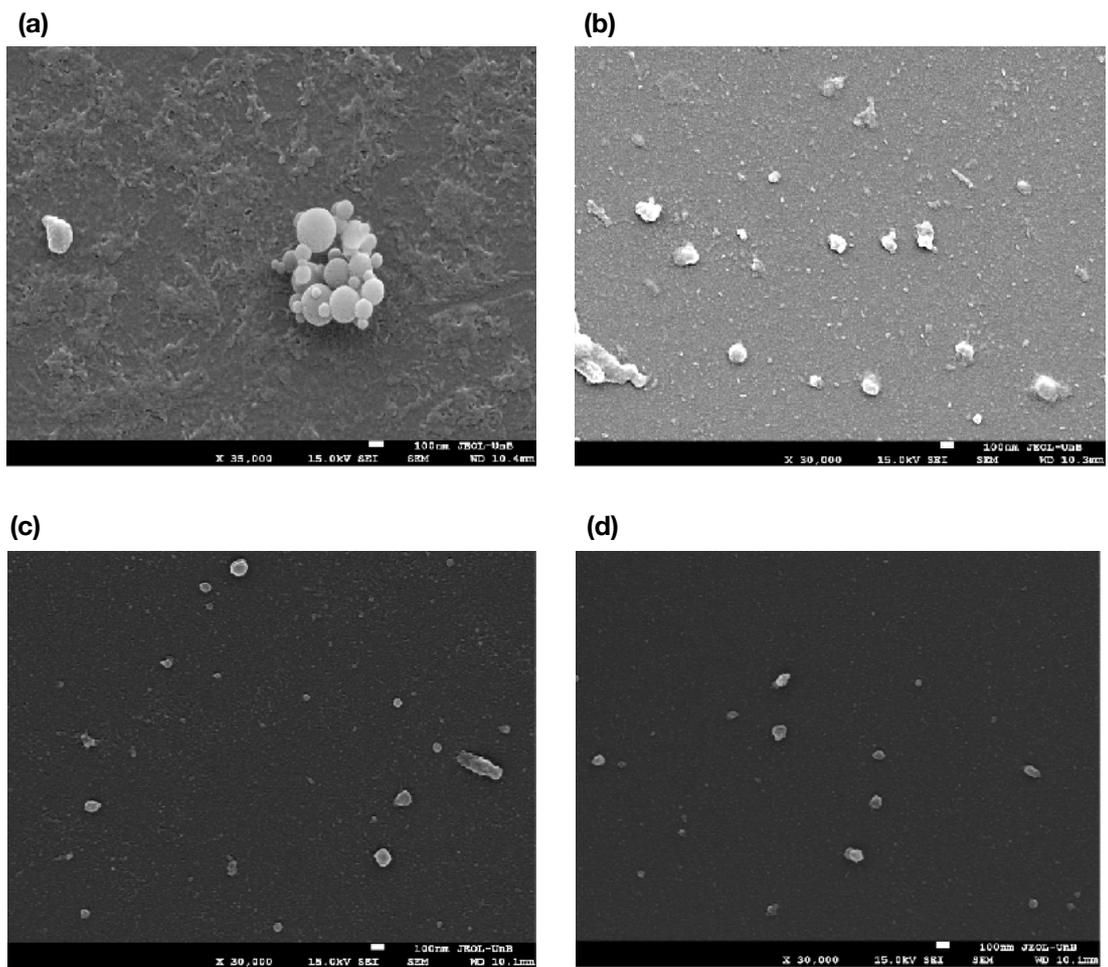


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de vesículas extracelulares de *C. neoformans* marcadas com tetróxido de ósmio. (a) EVs de B3501 cultivado em SDB 50%; (b) EVs de B3501 cultivado em SDB 100%; (c) EVs de Δ Cap67 cultivado em SDB 50% e (d) EVs de Δ Cap67 cultivado em SDB 100%.

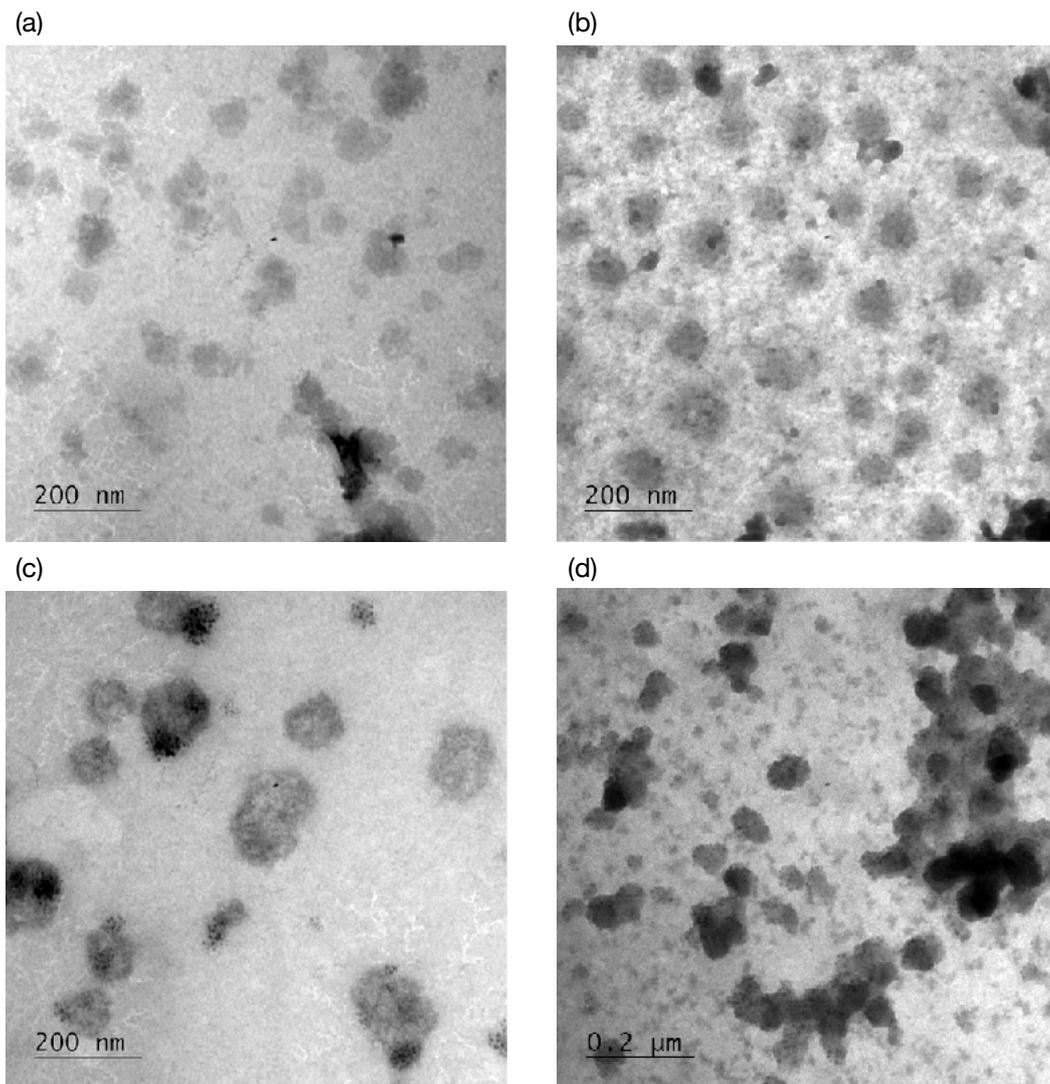


Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas extracelulares de *C. neoformans* marcadas com acetato de uranila. (a) EVs de B3501 cultivado em SDB 50%; (b) EVs de B3501 cultivado em SDB 100%; (c) EVs de Δ Cap67 cultivado em SDB 50% e (e) EVs de Δ Cap67 cultivado em SDB 100%.

C. neoformans secretam Evs com diferentes concentrações de fatores de virulência, dependendo do meio do meio de cultura

Lacase e urease são enzimas de virulência conhecidamente secretadas por *C. neoformans* e sabe-se que estão presentes nas vesículas secretadas por esse fungo, favorecendo sua sobrevivência no interior do fagolisossoma (RODRIGUES, M. *et al*, 2008; WILLIAMSON, 1997; FU *et al*, 2018). O GXM, molécula predominante da cápsula fúngica, também está relacionada ao processo de virulência, inibindo o reconhecimento pelo hospedeiro e também está presente nas EVs, sendo transportada para o exterior celular, provavelmente auxiliando na montagem da cápsula. Dessa forma, essas moléculas foram quantificadas nas EVs produzidas em meio pobre (meio mínimo) ou em meio rico (SDB) (Figura 9) e observou-se que as EVs de B3501 produzidas no meio mínimo apresentaram maior concentração de lacase e GXM do que as demais produzidas no meio rico (Figura 9 A e C) e que tanto as de B3501 quanto de Δ Cap67 apresentaram maior concentração de urease (Figura 9B) quando produzidas no meio mais pobre, demonstrando a importância dessas moléculas quando o fungo está em uma situação de estresse nutricional.

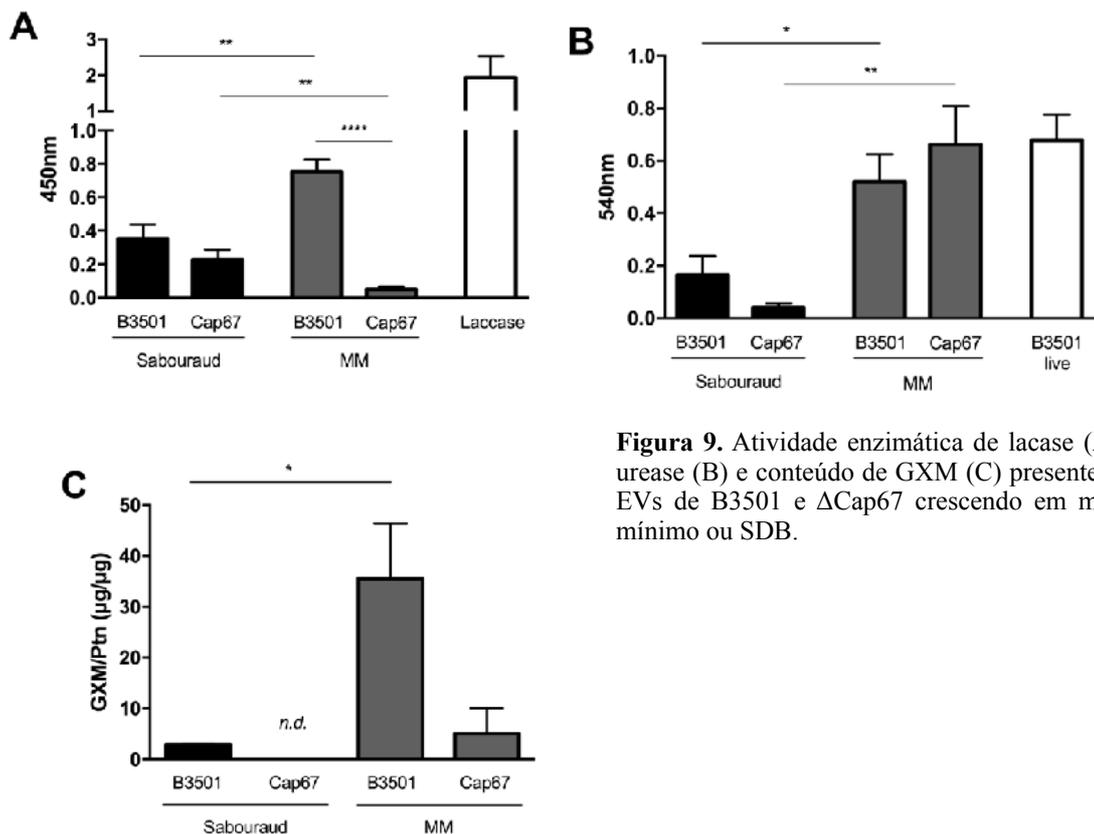


Figura 9. Atividade enzimática de lacase (A) e urease (B) e conteúdo de GXM (C) presente nas EVs de B3501 e Δ Cap67 crescendo em meios mínimo ou SDB.

EVs secretadas pelo isolado Δ Cap67 são mais facilmente internalizadas por macrófagos do que EVs secretadas pelo isolado B3501

Para analisar a interação das EVs com macrófagos, essas foram marcadas com DIL e incubadas com macrófagos marcados com DAPI por 30 minutos a 37°C e posteriormente foram levados para observação no microscópio confocal, em que se obtiveram as imagens representadas na Figura 10. Com esta análise foi possível notar a internalização de EVs de Δ Cap67, marcadas com DIL, pelos macrófagos, principalmente no caso das EVs produzidas em SDB 100%, que foram internalizadas em grande quantidade por alguns macrófagos dispersos. A partir das imagens obtidas neste experimento, aparentemente não houve internalização das EVs de B3501, já que foi utilizada uma concentração inicial de EVs de 50 ng/mL de esterol em todos os grupos e as EVs não internalizadas provavelmente foram eliminadas durante as lavagens das células com PBS. Provavelmente, as EVs de B3501 são mais dificilmente internalizadas por macrófagos devido a presença de GXM em sua composição, como foi mostrado na Figura 9. Essa molécula, constituinte da cápsula do *C. neoformans*, é uma das responsáveis pela inibição da fagocitose desse fungo, que ocorre com uma frequência significativamente menor em cepas capsulares em relação às acapsulares. Outro fator que pode ter favorecido a internalização e visualização das EVs de Δ Cap67, pode ter sido a formação de agregados dessas EVs, expondo maior quantidade de antígenos a serem reconhecidos pelos macrófagos.

EVs produzidas em um meio rico em nutrientes induzem uma menor ativação do inflamassoma em relação a EVs produzidas em um meio pobre quando interagindo com macrófagos ou células dendríticas

O inflamassoma é um complexo multiproteico intracelular, formado por um receptor intracelular do tipo NLR, predominantemente o NLRP3, responsável pela produção da interleucina IL-1 β , que é clivada em sua forma ativa, pela caspase 1 ativada, em resposta a sinais específicos pró-inflamatórios. Neste trabalho, a ativação do inflamassoma foi analisada mediante quantificação da interleucina IL-1 β no sobrenadante de

macrófagos e células dendríticas incubadas com 40 ng/mL (esterol) de EVs de *C. neoformans* cultivado em meios de cultura com diferentes concentrações nutricionais. A citocina pró-inflamatória TNF- α , não dependente do inflamassoma, também foi quantificada, a fim de saber se a modulação causada pelas EVs seria específica do inflamassoma ou se interferiria de uma forma geral no processo inflamatório. Como controle negativo, as células foram incubadas com PBS, como controle positivo, elas foram incubadas com LPS e nigericina, primeiro e segundo sinais necessários para ativar o inflamassoma. Como controle positivo da inibição da ativação do inflamassoma, foi usado o CM35, molécula menor que 1 KDa produzida pelo B3501 e já mostrada anteriormente pelo grupo (BÜRGELE, 2018).

As Figuras 11 e 12 representam os níveis de IL-1 β e TNF- α no sobrenadante dos macrófagos e células dendríticas incubadas com as EVs. A Figura 11 mostra a resposta à interação dessas células com as EVs de B3501, enquanto a Figura 12 mostra a interação com as EVs do mutante acapsular Δ Cap67. Em ambas as figuras é possível observar uma redução nos níveis de IL-1 β no sobrenadante das células, quando incubadas com as EVs, em relação ao controle positivo. Isso ocorre principalmente com as EVs produzidas no meio SDB rico em nutrientes. As EVs produzidas no meio mais pobre são capazes inclusive de estimular a produção de IL-1 β , mas não de TNF- α por macrófagos e células dendríticas, quando incubadas com nigericina, o que as caracteriza como ativadores primários do inflamassoma. Na Figura 12 observa-se que o mesmo ocorre com as EVs de Δ Cap67, inibindo a produção de IL-1 β quando produzidas no meio rico e estimulando quando produzidas no meio mais pobre. Na Fig. 12 (a), foram utilizadas EVs produzidas no meio mínimo e também nesse caso, elas estimularam a produção de IL-1 β pelas células dendríticas em relação à interação com EVs produzidas no meio SDB 100%, mostrando mais uma vez a influência das condições nutricionais na modulação do inflamassoma.

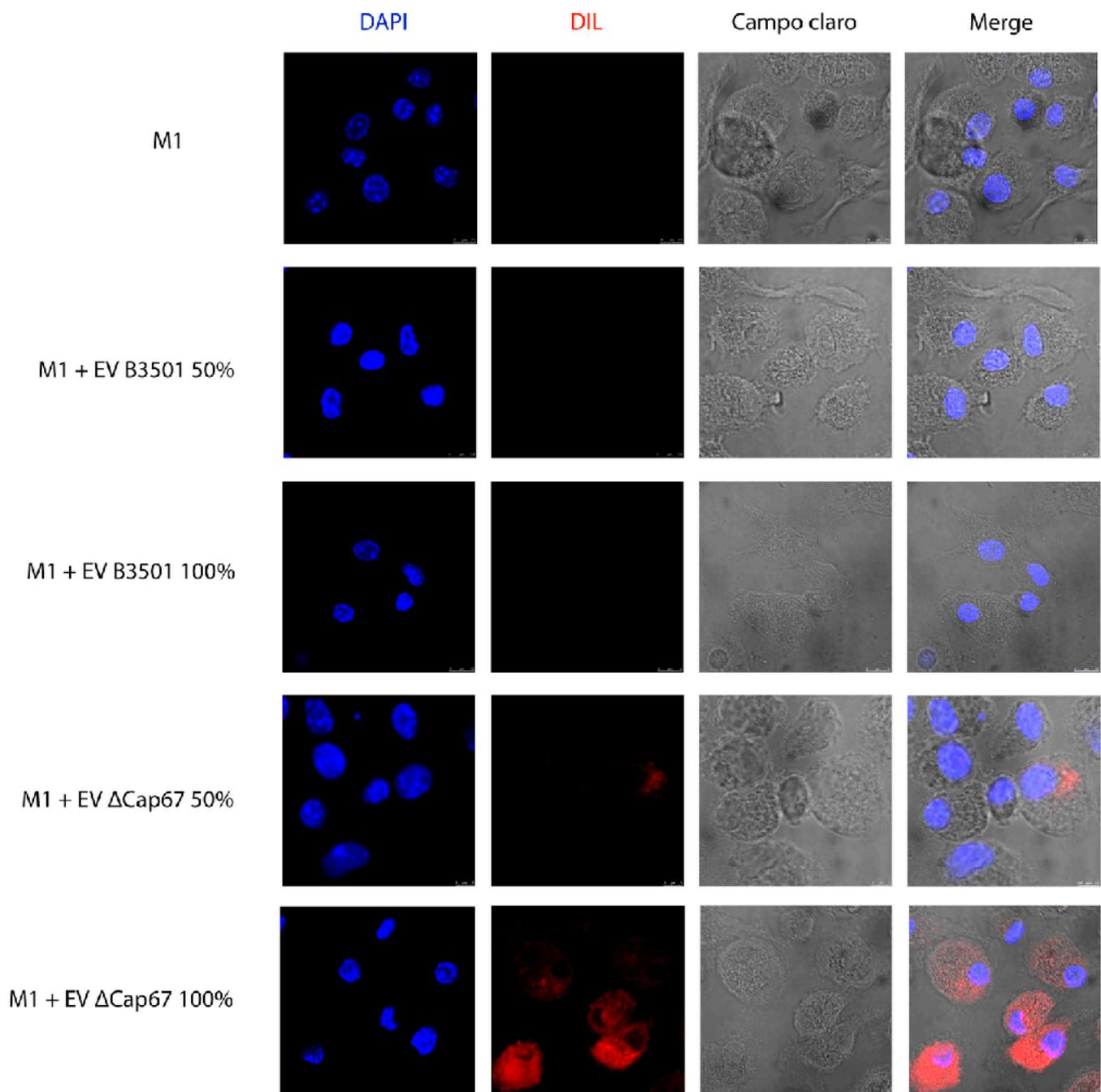


Figura 10. Microscopia confocal de macrófagos do tipo M1 após interagirem por 30 min com EVs de B3501 e Δ Cap67 produzidas em SDB 50% ou 100%. Foi utilizado o fluoróforo DAPI (marcação por 5 min) para marcar o núcleo dos macrófagos, absorvendo luz com maior intensidade no comprimento de onda 345 nm e emite fluorescência a 460 nm, gerando a coloração azul; Para marcar as EVs foi utilizado o fluoróforo DIL (marcação por 1h), que absorve luz no comprimento de onda 450 nm e emite fluorescência em 600 nm, gerando a cor vermelha. É possível visualizar o citoplasma dos macrófagos na imagem do campo claro e a internalização das EVs quando as imagens são sobrepostas.

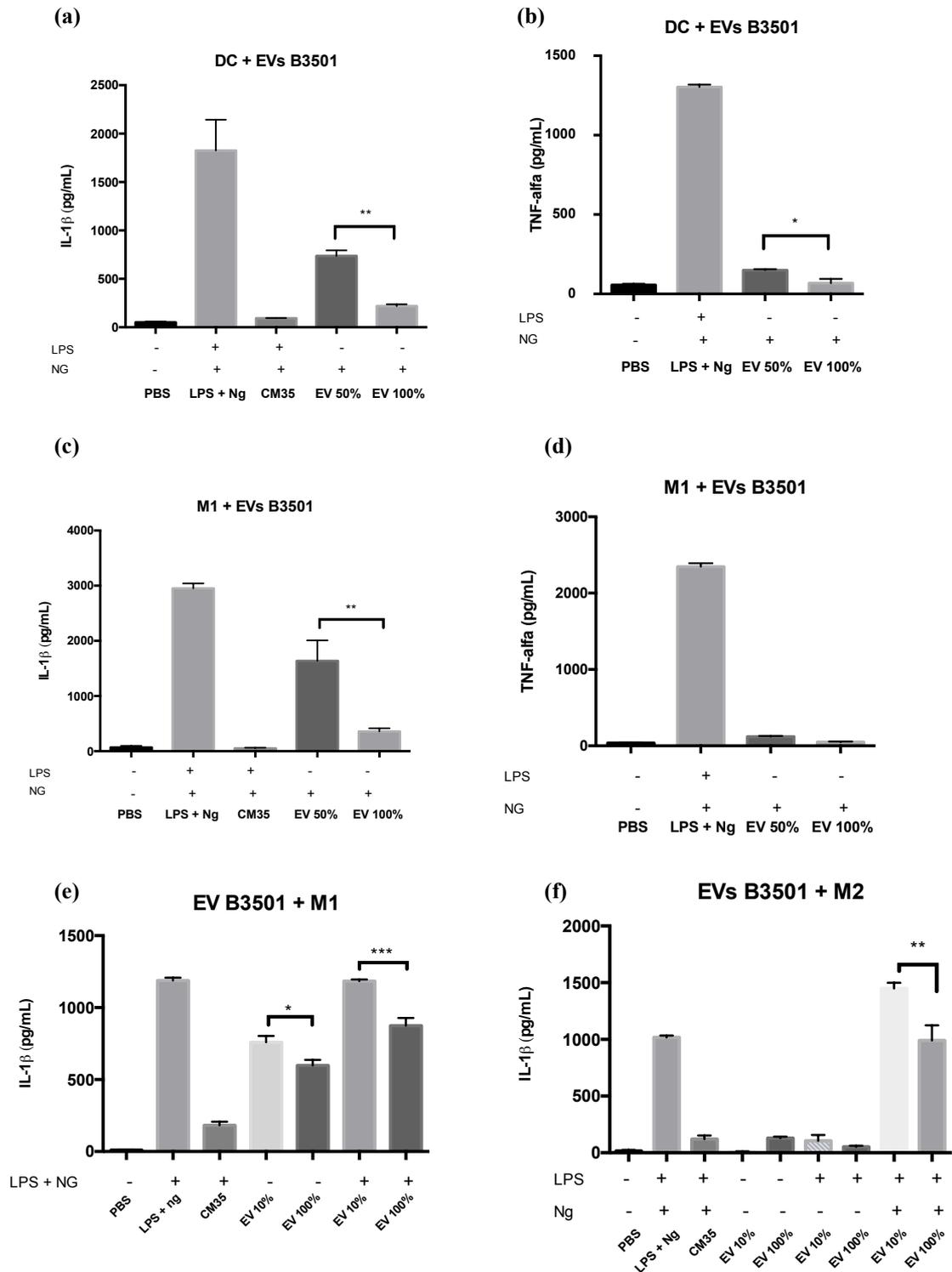


Figura 11. Concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no sobrenadante da cocultura de células dendríticas (a e b), macrófagos com perfil M1 (c, d e e) ou M2 (f) com EVs de *C. neoformans* B3501 produzidas em SDB 10% + MOPS, 50% ou 100%.

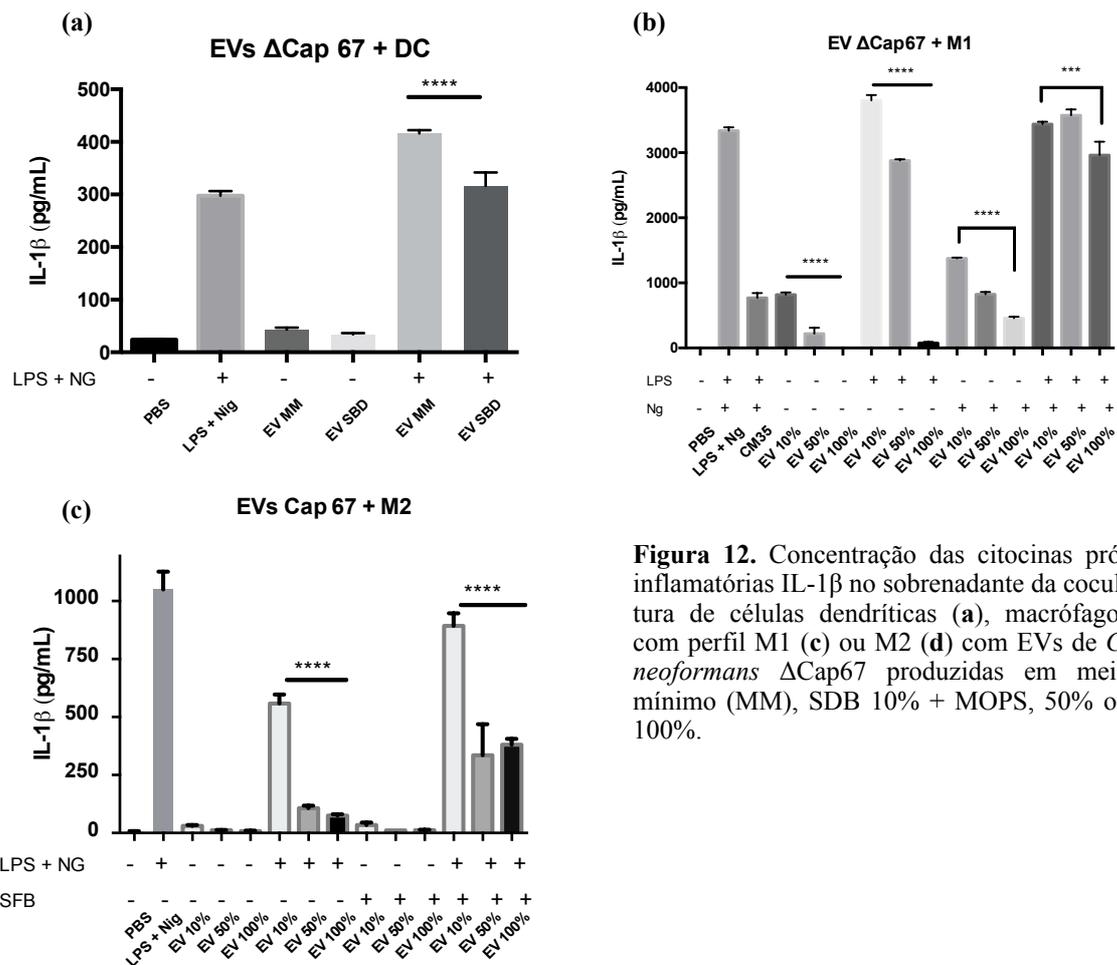


Figura 12. Concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1β no sobrenadante da cocultura de células dendríticas (a), macrófagos com perfil M1 (c) ou M2 (d) com EVs de *C. neoformans* ΔCap67 produzidas em meio mínimo (MM), SDB 10% + MOPS, 50% ou 100%.

Tratamento com EVs modula negativamente a expressão de genes relacionados à ativação do inflamassoma em camundongos infectados com *C. neoformans*.

A fim de saber se as EVs produzidas no meio rico também são capazes de inibir o inflamassoma *in vivo*, camundongos C57BL/6 infectados com *C. neoformans* B3501 receberam tratamento com as EVs de B3501 e ΔCap67 produzidas no meio SDB 100% 1 e 3 dias após a infecção e foram sacrificados 5 dpi. Após o sacrifício dos animais e retirada dos pulmões, os mesmos foram macerados e os homogenatos foram inoculados em cultura em placas de Sabouraud ágar, que ficaram em cultura a 30°C por 24h. Após esse tempo, as colônias foram contadas, de forma que cada uma representa uma unidade formadora de colônia (UFC). A figura 13 representa o log do UFC em função do peso dos pulmões (g) dos camundongos sacrificados com 5 dias pós infecção com o tratamento em 1 e 3 dias pós infecção. Tal figura mostra uma redução significativa da carga

fúngica nos pulmões dos animais tratados com as EVs tanto de B3501 quanto de Δ Cap67 em relação aos animais que não receberam o tratamento, demonstrando uma provável influência das EVs no processo infeccioso do fungo.

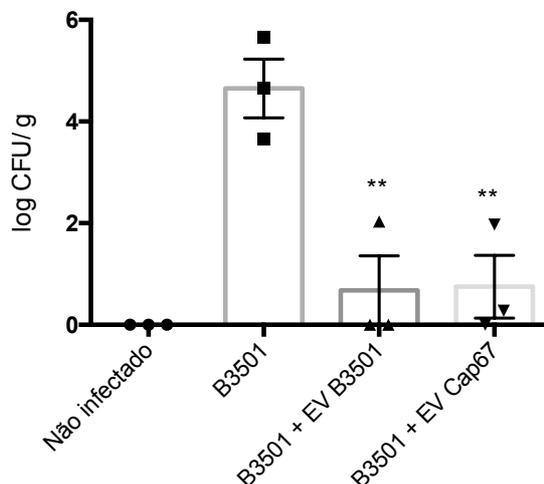


Figura 13. Quantificação da carga fúngica nos pulmões 5 dias pós infecção por meio da cultura do homogenato do órgão em placas de Sabouraud ágar por 24h e contagem das unidades de colônias por placa.

O sobrenadante dos pulmões macerados foi utilizado para quantificação de citocinas, o que está representado na figura 14. Observando esta figura, foi possível notar um aumento significativo na produção de IL-1 β (Figura 14 a) e TNF- α (Figura 14 b) nos pulmões dos camundongos tratados com as EVs de Δ Cap67 em relação aos que não receberam tratamento, o que não ocorreu no caso dos camundongos tratados com as EVs de B3501. Tal resultado está de acordo com a redução do CFU nos pulmões dos camundongos tratados com as EVs (Fig. 13), já que um aumento na produção destas citocinas no pulmão poderia levar a uma maior eficiência na eliminação do fungo pelo organismo infectado.

Após a quantificação do CFU e das citocinas, foi extraído o RNA dos pulmões dos camundongos tratados, que foi convertido em cDNA, o qual foi submetido a RT²P-CR para quantificação dos genes diferencialmente expressos nos grupos infectados e tratados ou não infectados nem tratados.

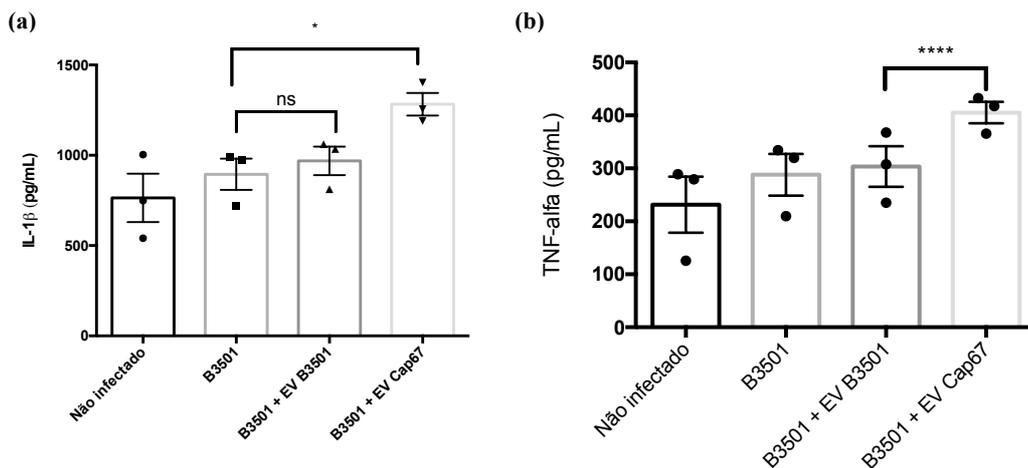


Figura 14. Concentração de IL-1 β (a) e TNF- α (b) no sobrenadante dos macerados dos pulmões dos camundongos infectados com B3501 e tratados 1 e 3 dias pós infecção, e sacrificados 5 dpi medidos pelo ensaio de ELISA. (*) representa diferença significativa em relação ao grupo infectado com B3501 que não recebeu tratamento, pelo método one-way ANOVA ($P < 0,05$).

A Figura 15 e Tabela 1 representam a expressão dos genes nos pulmões dos camundongos infectados em relação ao grupo não infectado. Foi possível notar que quando se compara a expressão gênica nos pulmões dos camundongos infectados com *C. neoformans*, há um aumento na expressão da maioria dos genes relacionados à ativação do inflamassoma (Figura 15), independente do tratamento com as EVs. Entretanto, observa-se que o tratamento com as EVs de B3501 causaram uma inibição de vários genes em relação ao grupo controle. Os genes mais alterados nesse grupo foram os *Ikbkg* (Inhibitor of kappaB kinase gamma), inibidor da quinase responsável pela clivagem do NF- κ B, responsável pela transcrição da pró-IL1 β e o gene responsável pela transcrição do NLRP4: *Nlrp4e* (NLR family, pyrin domain containing 4E).

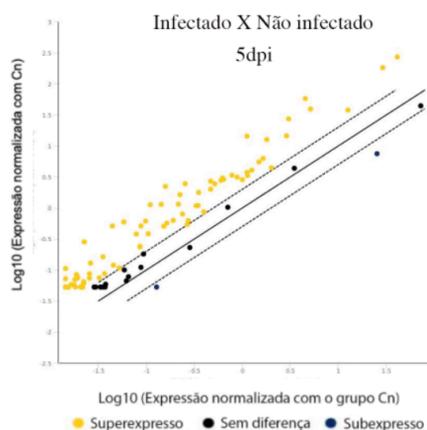


Figura 15. Relação entre os genes expressos nos pulmões dos camundongos infectados com *C. neoformans*, sacrificados 5 dias pós infecção em relação aos não infectados. Dados obtidos a partir do RT²PCR array e produzidos no software fornecido pela Qiagen.

Quando a análise da expressão gênica foi feita em relação ao grupo infectado não tratado, representado na Figura 16 e na Tabela 2, observa-se que todos os grupos apresentaram uma expressão significativamente diminuída em relação ao grupo infectado, mas não tratado. Nota-se claramente que o tratamento dos camundongos reduziu a expressão da maioria dos genes relacionados à ativação do inflamassoma nos animais sacrificados após 5 dias de infecção.

Os genes que apresentaram uma maior inibição foram o *Cflar* (CASP8 and FADD-like apoptosis regulator) e o *Ikbkg* (Inhibitor of kappaB kinase gamma). Além disso, genes muito importantes para a cascata de ativação do inflamassoma também ficaram subexpressos, como o do ligante de CD40, os das Caspases 1 e 8, da molécula adaptadora Myd 88, dos receptores intracelulares NLRP3, NLRC4, NLRP5, das citocinas IL-1 β , IL-33, IL-18, IL-12 e TNF. O tratamento com as EVs de Δ Cap67 também inibiu a maioria dos genes relacionados a ativação do inflamassoma, embora um pouco menos do que o tratamento com as EVs de B3501. No caso deste tratamento, não houve inibição dos genes da Caspase 8, do adaptador Myd 88, do IL-33, do NLRP3 e NLRC4. Entretanto, interessante, este tratamento inibiu a expressão de genes de quimiocinas como *Ccl2*, *Ccl7* e *Ccl12*, citocinas com função de atrair monócitos e células dendríticas circulantes para o tecido que não foram alteradas no outro tratamento (Tabela 2).

Tais dados são contrastantes com os resultados de CFU e da quantificação de citocinas dos animais sacrificados 5 dpi, representados nas Figuras 13 e 14, em que obteve-se redução de CFU acompanhado de aumento na produção de TNF- α nos camundongos tratados com as EVs, ao mesmo tempo em que a quantificação gênica mostrou uma subexpressão destes precursores. Isso pode indicar que em um primeiro momento há uma excessiva ativação do sistema imune (Figura 14), responsável pela eliminação do fungo nos pulmões quando os animais são tratados com as EVs (Figura 13). Os precursores gênicos inibidos (Figura 15 e 16 e Tabela 1 e 2) indicam que em um segundo momento as EVs induzem a inibição do sistema imune de forma favorável à sobrevivência do fungo. Para comprovar isso, foi realizado um outro experimento, em que um grupo de camundongos recebeu o tratamento com as EVs 2 e 4 dias antes da infecção e

um segundo grupo recebeu o tratamento 2 e 4 dias após a infecção e ambos foram sacrificados 15 dias depois da infecção.

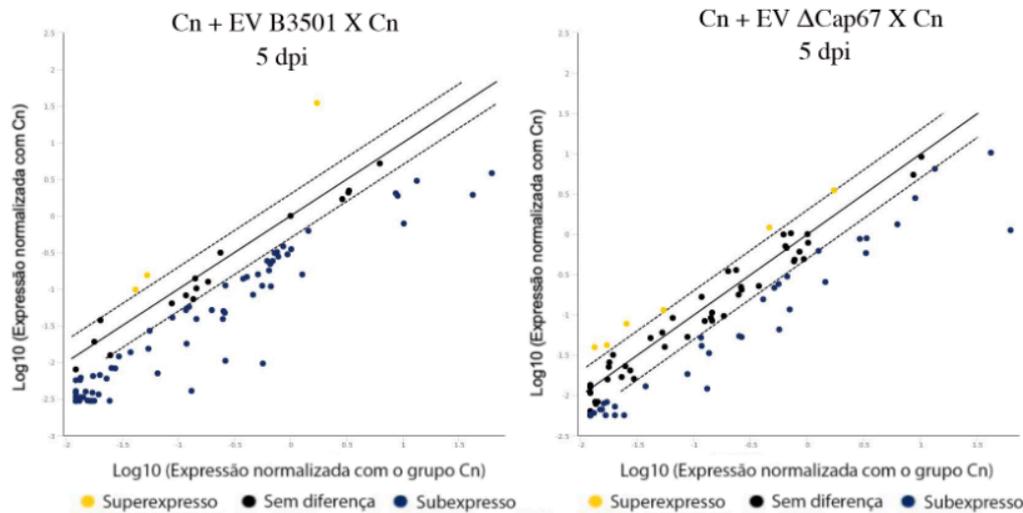


Figura 16. Relação entre os genes expressos nos pulmões dos camundongos infectado e tratados com as EVs em relação aos infectados que não receberam tratamento. Dados obtidos a partir do RT²PCR array e produzidos no software fornecido pela Qiagen "GeneGlobe Data Analysis Center".

Os histopatológicos dos pulmões com 5 dias de infecção estão representados na Figuras de 17. Foi possível observar um grande aumento de infiltrado celular intenso no tecido pulmonar dos camundongos infectados em relação aos não infectados, indicando um processo inflamatório intenso. Curiosamente, nos pulmões dos camundongos tratados com as EVs houve consideravelmente menos infiltrado celular e maior formação de granulomas contendo *C. neoformans* do que nos não tratados, demonstrando uma resposta inflamatória mais controlada quando os camundongos recebiam tratamento com as EVs. A predominância de granulomas nos grupos dos camundongos tratados, indica que provavelmente as EVs estão associadas a processos de latência do fungo. Nota-se também que o tratamento com as EVs de Δ Cap67 foram capazes de inibir ainda mais tal resposta inflamatória, inibindo a migração celular. Tais características observadas nos histopatológicos estão de acordo com o padrão de expressão gênica observado anteriormente, em que o tratamento com as EVs inibiu a expressão da maioria dos genes relacionados à ativação do inflamassoma, o que levaria a um menor infiltrado celular nos pulmões e uma menor resposta inflamatória.

O tratamento dos animais infectados foi realizado novamente, então, tratando-os 2 e 4 dias antes da infecção ou 2 e 4 dias após, sendo sacrificados 15 dias dpi, afim de se saber se há diferença no tratamento prévio ou posterior com as EVs e se após 15 dias seria modificada a expressão de citocinas nos pulmões. Após o sacrifício destes animais, não foi encontrada quantidade significativa de CFU em nenhum dos grupos, podendo ser explicada pelo baixo inóculo inicial utilizado na infecção (2×10^4), que pode ter sido controlada pelo sistema imune já nos primeiros dias de infecção. Entretanto, observou-se um maior número de colônias nos grupos tratados com as EVs previamente a infecção em relação aos grupos não tratados ou tratados após a infecção (dados não representados).

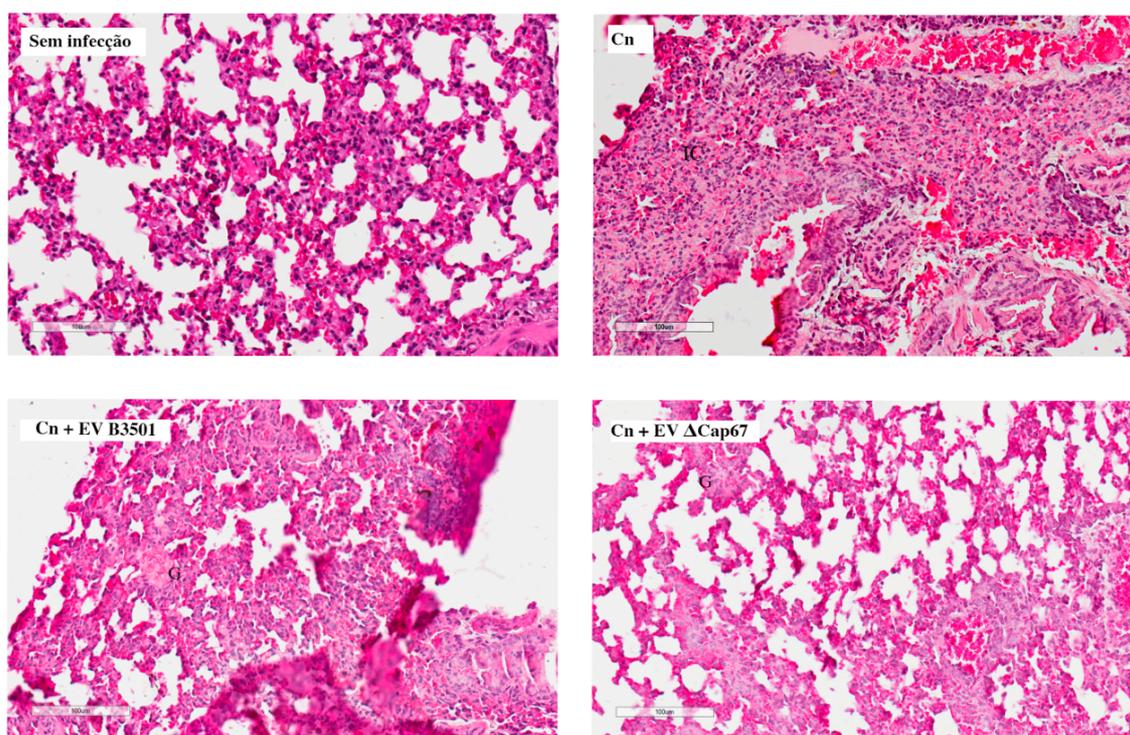


Figura 17. Histopatológico dos pulmões dos camundongos infectados e tratados ou não com as EVs de *C. neoformans* B3501 e Δ Cap67 1 e 3 dias após a infecção e sacrificados no quinto dia. A escala de tamanho está representando uma distância de 100 μ m. G indica a presença de granuloma contendo *C. neoformans* e IC indica a presença de infiltrado celular.

Diferentemente do que foi observado nos animais sacrificados com 5 dias, quando eles foram sacrificados com 15 dias observou-se uma redução nos transcritos de IL-1 β (Figura 18a) em todos os grupos que receberam tratamento com as EVs, tanto antes quanto depois da infecção. Houve também uma redução nos níveis de TNF- α (Fi-

gura 18b) nos grupos tratados com as EVs, com exceção do grupo tratado previamente com EVs de B3501 e não observou-se diferenças significativas na expressão de IL-6 (Figura 18c) em função do tratamento utilizado. A redução de IL-1 β está de acordo com a inibição gênica dessa citocina encontrados no PCR array dos pulmões dos animais sacrificados tanto com 5 dias, quanto com 15 dias (Tabelas 1 e 2 e Figuras 16, 19), mostrando que realmente há um aumento inicial desta citocina, seguido por uma redução, após a consolidação da infecção, quando os animais são tratados com as EVs. Isto provavelmente indica uma influência das EVs no processo infeccioso no *C. neoformans*, que as produz ativamente como estratégia de virulência, favorecendo sua sobrevivência no organismo hospedeiro.

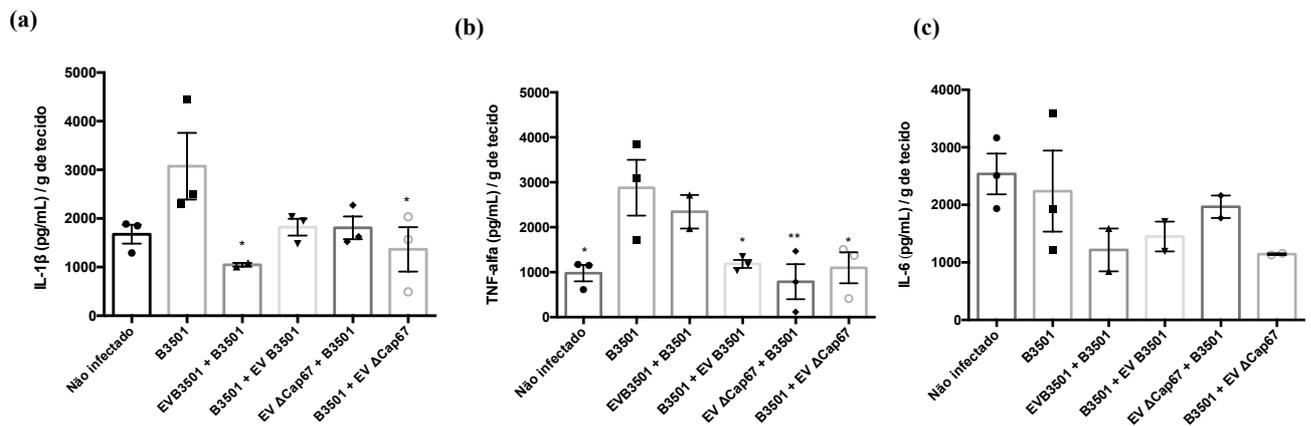


Figura 18. Concentração de IL-1 β (a), TNF- α (b) e IL-6 (c) no sobrenadante dos macerados dos pulmões dos camundongos infectados com B3501 e tratados 2 e 4 dias antes (EVB3501 + B3501 e EV Δ Cap67 + B3501) ou depois (B3501 + EVB3501 e B3501 + EV Δ Cap67), e sacrificados 15 dpi medidos pelo ensaio de ELISA. (*) representa diferença significativa em relação ao grupo infectado com B3501 que não recebeu tratamento, pelo método one-way ANOVA (P<0,05).

O mesmo padrão de expressão gênica foi observado nos camundongos sacrificados com 15 dias de infecção (Figura 19 e Tabela 1 e 2), em que observou-se uma inibição dos genes relacionados ao inflamassoma quando os animais eram tratados com as EVs, o que também observou-se nos transcritos de citocinas. Um aspecto interessante foi que as EVs de Δ Cap67 foram mais eficientes em modular essa expressão gênica tanto no primeiro momento, induzindo um aumento de TNF- α , quanto em um segundo momento, inibindo a expressão da maioria dos genes relacionados ao inflamassoma. Isso pode indicar uma maior importância das EVs para o mutante acapsular como estra-

tégia de virulência do que para a cepa capsular, já que aquele apresenta maior dificuldade em sobreviver no organismo hospedeiro e investe mais na produção de EVs.

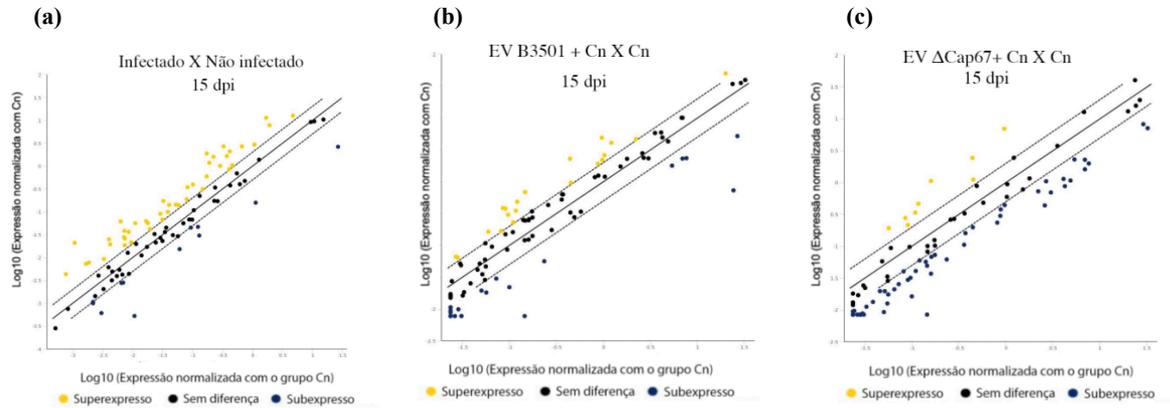


Figura 19. Relação entre os genes expressos nos pulmões dos camundongos infectado e tratados com as EVs em relação aos não infectados (a) e em relação aos infectados que não receberam tratamento (b e c). Dados obtidos a partir do RT²PCR array e produzidos no software fornecido pela Qiagen "GeneGlobe Data Analysis Center".

Diferente do que foi observado no histopatológico dos pulmões dos camundongos sacrificados com 5 dias, não observou-se grandes diferenças nos tecidos pulmonares (Figura 20) e cerebrais (dados não mostrados) dos camundongos sacrificados 15 dias após a infecção. No entanto, encontra-se uma maior concentração de infiltrado celular nos pulmões dos camundongos infectados em relação aos não infectados, indicando provavelmente um processo inflamatório mais acentuado nesses grupos (Figura 20). Esse padrão foi um pouco mais acentuado nos grupos tratados anteriormente com as EVs do que nos não tratados. Também não observou-se diferenças no tecido cerebral dos camundongos infectados em relação aos não infectados (Figura 20). A similaridade entre os tecidos pode ser explicada pela baixa carga fúngica utilizada na infecção (2×10^4 células de *C. neoformans*) e pela cepa pouco virulenta (B3501), que seria mais facilmente eliminada pelo organismo e após 15 dias o tecido já estaria recuperado.

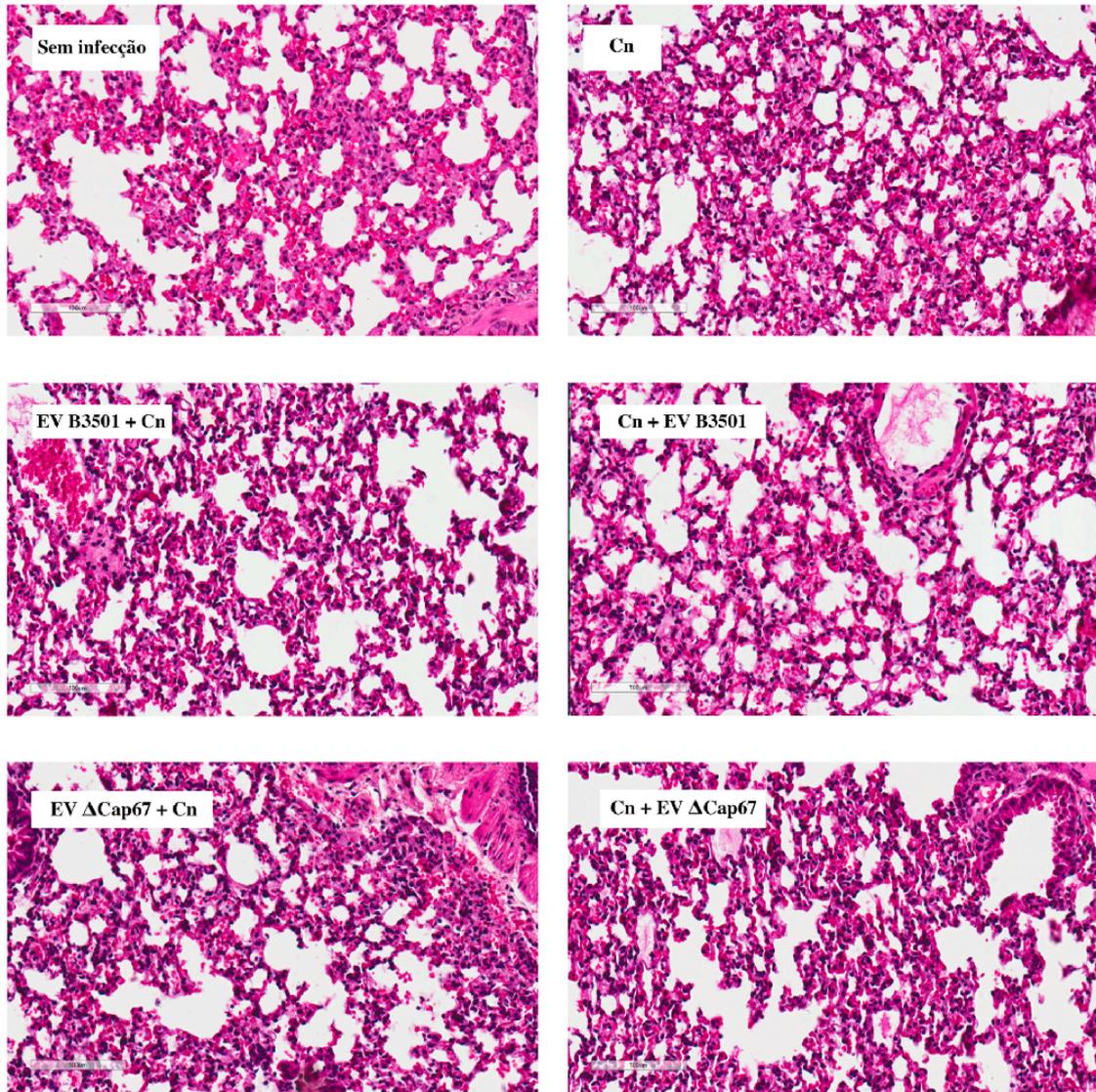


Figura 20. Histopatológico dos pulmões dos camundongos infectados e tratados ou não com as EVs de *C. neoformans* B3501 e Δ Cap67 2 e 4 dias antes da infecção (EV + Cn) ou após a infecção (Cn + EV) e sacrificados 15 dias após a infecção. A escala de tamanho está representando uma distância de 100 μ m.

Tabela 1. Aumento (azul) e supressão (vermelho) da expressão de genes nos pulmões de camundongos infectados com *C. neoformans* B3501 e tratados com EVs de B3501 ou Δ Cap67 antes (EV + Cn) ou depois da infecção (Cn + EV) e sacrificados 5 ou 15 dias pós infecção (dpi). Comparação feita em relação ao grupo controle, não infectado. Os espaços em branco representam que não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento.

Gene	Cn 5dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV Δ Cap67 5dpi	Cn 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV Δ Cap67 + Cn 15dpi
Casp1 (Caspase 1)	14.05	2.55	5.57	2.39	3.67	
Hsp90b1 (Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1)	12.68		5.76	6.70	8.58	
Bcl2l1 (Bcl2-like 1)	12.53		16.41	3.54	21.47	11.40
Ccl12 (Chemokine (C-C motif) ligand 12)	11.46	4.69	3.75	5.08	9.05	2.24
Birc3 (Baculoviral IAP repeat-containing 3)	10.25		8.20	3.47	6.39	2.44
Ccl7 (Chemokine (C-C motif) ligand 7)	10.14	3.17	2.32	3.17	15.74	
Chuk (Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase)	9.61	-10.38		-2.08		3.40
Actb (Actin, beta)	8.88					
Casp12 (Caspase 12)	7.98		5.84	2.72	4.88	
Txnip (Thioredoxin interacting protein)	7.55		2.20	4.07	10.70	2.07
Casp8 (Caspase 8)	7.30		4.13	4.15	6.14	
Cxcl1 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 1)	7.28			19.68	36.51	5.98
Nfkb1 (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1)	6.24	3.61	3.79		3.94	3.87
Birc2 (Baculoviral IAP repeat-containing 2)	5.84		7.74	5.33		
Irf1 (Interferon regulatory factor 1)	5.79		8.65	10.94	10.18	
Cflar (CASP8 and FADD-like apoptosis regulator)	5.28	-8.11		2.35		3.33
Tab2 (TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2)	5.03					2.05
Bcl2 (B-cell leukemia/lymphoma 2)	4.98			-4.94		
Ikbkb (Inhibitor of kappaB kinase beta)	4.92		2.50	4.24	4.09	3.44
Xiap (X-linked inhibitor of apoptosis)	4.86					

Gene	Cn 5dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV ΔCap67 5dpi	Cn 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV ΔCap67 + Cn 15dpi
Tnfsf14 (Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14)	4.81	2.06		3.11		
Il1b (Interleukin 1 beta)	4.72			6.15	4.97	
Il33 (Interleukin 33)	4.61		4.79	7.19	10.88	
Mok (Serine/threonine kinase 30)	4.61			-2.46		
Il18 (Interleukin 18)	4.48				3.28	-2.63
Myd88 (Myeloid differentiation primary response gene 88)	4.47		6.88	6.26	15.23	2.24
Mapk8 (Mitogen-activated protein kinase 8)	4.31		2.51	3.51	3.97	-2.18
Ctsb (Cathepsin B)	4.27		10.49	3.41	4.08	
Card6 (Caspase recruitment domain family, member 6)	4.03	-2.52	4.78	4.21	8.29	2.49
Il12a (Interleukin 12A)	3.89	-2.36			2.83	
Ciita (Class II transactivator)	3.85		8.87	3.92		
Sugt1 (SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae))	3.76					-2.16
Mapk1 (Mitogen-activated protein kinase 1)	3.69	-3.71				
Map3k7 (Mitogen-activated protein kinase kinase 7)	3.67		2.07		4.57	
Nfkbib (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta)	3.66			4.42	16.07	-4.79
Cd40lg (CD40 ligand)	3.66					2.07
Nlrp9b (NLR family, pyrin domain containing 9B)	3.66				-5.17	-6.43
Nlrp6 (NLR family, pyrin domain containing 6)	3.66				-3.18	-19.66
Ifnb1 (Interferon beta 1, fibroblast)	3.54			5.68	3.03	-6.79
Mapk3 (Mitogen-activated protein kinase 3)	3.52		4.68	8.15	12.53	
Nlrc4 (NLR family, CARD domain containing 4)	3.52		2.04			

Gene	Cn 5dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV ΔCap67 5dpi	Cn 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV ΔCap67 + Cn 15dpi
Nlrp5 (NLR family, pyrin domain containing 5)	3.51			-2.17	-21.14	-16.75
Ikbkg (Inhibitor of kappaB kinase gamma)	3.45	-15.86	-3.35	-3.99	-8.25	
Tnfsf4 (Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4)	3.41					-4.81
Aim2 (Absent in melanoma 2)	3.37			2.51	2.85	2.37
Pstpip1 (Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1)	3.35					-3.97
Irf3 (Interferon regulatory factor 3)	3.32		2.20	2.08	4.61	
Traf6 (Tnf receptor-associated factor 6)	3.31				2.73	
Panx1 (Pannexin 1)	3.30					-4.72
Fadd (Fas (TNFRSF6)-associated via death domain)	3.28		9.14	9.81	8.03	
Mapk13 (Mitogen-activated protein kinase 13)	3.25	-3.34	2.17	-2.62		-6.78
Pea15a (Phosphoprotein enriched in astrocytes 15A)	3.24			2.24	2.10	
Ripk2 (Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2)	3.14	-2.73		-4.25		
Hsp90aa1 (Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1)	2.96	-2.47		2.67	3.44	-2.18
Pycard (PYD and CARD domain containing)	2.90				2.13	-3.15
Nlrp12 (NLR family, pyrin domain containing 12)	2.90					-3.64
Mefv (Mediterranean fever)	2.88	-3.36		2.27	2.01	
Mapk9 (Mitogen-activated protein kinase 9)	2.84		2.74	4.47	5.46	
Nod1 (Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1)	2.81				2.12	
Tnf (Tumor necrosis factor)	2.76	-2.61				-2.62

Gene	Cn 5dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV ΔCap67 5dpi	Cn 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV ΔCap67 + Cn 15dpi
Mapk12 (Mitogen-activated protein kinase 12)	2.75		5.46	2.16	3.54	
Il12b (Interleukin 12b)	2.62	-2.86				-2.38
Nlrp3 (NLR family, pyrin domain containing 3)	2.62			3.71	6.24	
Naip1 (NLR family, apoptosis inhibitory protein 1)	2.56					-6.23
Cxcl3 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 3)	2.53			4.60	5.77	
Ifng (Interferon gamma)	2.44				4.68	-2.39
Tnfsf11 (Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11)	2.37	2.59		5.27		
Irf4 (Interferon regulatory factor 4)	2.32				2.58	-2.14
Ptgs2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	2.28	-2.77		3.89	10.45	
Nfkbia (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)	2.18				2.24	
Irak1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1)	2.17	-3.04	3.55	2.12	3.27	-2.07
Naip5 (NLR family, apoptosis inhibitory protein 5)	2.06			2.18	4.87	
P2rx7 (Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7)	2.04					-2.60
Ccl5 (Chemokine (C-C motif) ligand 5)		2.67	2.24		2.96	-2.01
Gapdh (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)			2.05		3.57	2.81
Actb (Actin, beta)		4.32		-7.14		
B2m (Beta-2 microglobulin)	-3.43	3.44				
Nlrp4e (NLR family, pyrin domain containing 4E)	-2.41	-16.76	-5.53		-475.53	-227.00
Il6 (Interleukin 6)		-8.08	-2.28		5.38	-2.38
Nlr1 (NLR family member X1)		-4.38				-2.41

Gene	Cn 5dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV ΔCap67 5dpi	Cn 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV ΔCap67 + Cn 15dpi
Rela (V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian))		-4.16	3.56		2.39	-2.37
Tab1 (TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1)		-4.03		-2.34		
Nlrp4b (NLR family, pyrin domain containing 4B)		-3.91		-20.27	-107.77	-4.81
Tirap (Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein)		-3.88				
Nod2 (Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2)		-2.58				
Nlrp1a (NLR family, pyrin domain containing 1A)		-2.41				-3.46
Mapk11 (Mitogen-activated protein kinase 11)				2.80	6.01	2.20
Nlrc5 (NLR family, CARD domain containing 5)						-3.18

Tabela 2. Superexpressão (azul) e subexpressão (vermelho) de genes nos pulmões de camundongos infectados com *C. neoformans* B3501 e tratados com EVs de B3501 ou ΔCap67 antes (EV + Cn) ou depois da infecção (Cn + EV) e sacrificados 5 ou 15 dias pós infecção (dpi). Comparação feita em relação ao grupo controle, infectado mas não tratado com EVs. Os espaços em branco representam que não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento.

Gene	Sem infecção 5 dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV ΔCap67 5dpi	Sem infecção 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV ΔCap67 + Cn 15dpi
Casp1 (Caspase 1)	-11.32	-3.22	-2.36	-2.28		-3.44
Hsp90b1 (Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1)	-10.21	-4.44	-2.06	-6.40		-3.57
Bcl2l1 (Bcl2-like 1)	-10.09	-9.21		-3.72	4.55	3.26
Ccl12 (Chemokine (C-C motif) ligand 12)	-9.22		-2.86	-3.27		
Birc3 (Baculoviral IAP repeat-containing 3)	-8.25	-5.44		-3.32		
Ccl7 (Chemokine (C-C motif) ligand 7)	-8.16		-4.09	-2.50	4.66	

Gene	Sem infecção 5 dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV ΔCap67 5dpi	Sem infecção 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV ΔCap67 + Cn 15dpi
Chuk (Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase)	-7.74	-58.34	-8.59			6.59
Actb (Actin, beta)	-7.15			3.16	5.03	7.20
Casp12 (Caspase 12)	-6.42	-2.34		-2.60		-2.33
Txnip (Thioredoxin interacting protein)	-6.08	-4.80	-3.22	-3.89	2.47	
Casp8 (Caspase 8)	-5.88	-2.72		-3.96		-2.36
Cxcl1 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 1)	-5.86	-8.09	-4.28	-4.49		-3.11
Nfkb1 (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1)	-5.02				2.99	3.97
Birc2 (Baculoviral IAP repeat-containing 2)	-4.70	-6.54		-5.09		-2.27
Irf1 (Interferon regulatory factor 1)	-4.66	-2.56		-10.45		-4.56
Cflar (CASP8 and FADD-like apoptosis regulator)	-4.25	-25.03	-4.98	-2.25		
Tab2 (TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2)	-4.05	-2.78	-2.62			
Bcl2 (B-cell leukemia/lymphoma 2)	-4.01	-5.54	-2.93		-2.68	
Ikbkb (Inhibitor of kappaB kinase beta)	-3.96	-2.45		-3.59		
Xiap (X-linked inhibitor of apoptosis)	-3.91	-2.90	-5.99		2.14	2.47
Tnfsf14 (Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14)	-3.87		-4.74	-2.97	-4.19	-3.81
Il1b (Interleukin 1 beta)	-3.80	-5.06	-2.33	-5.87		-4.38
Il33 (Interleukin 33)	-3.71	-3.56		-6.87		-3.66
Mok (Serine/threonine kinase 30)	-3.71	-2.72	-2.90			
Il18 (Interleukin 18)	-3.60	-6.09	-2.22		2.16	-2.95
Myd88 (Myeloid differentiation primary response gene 88)	-3.60	-5.29		-4.82		-3.08

Gene	Sem infecção 5 dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV ΔCap67 5dpi	Sem infecção 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV ΔCap67 + Cn 15dpi
Mapk8 (Mitogen-activated protein kinase 8)	-3.47	-2.78		-3.35		-6.01
Ctsb (Cathepsin B)	-3.44	-5.51	2.62	-3.26		
Card6 (Caspase recruitment domain family, member 6)	-3.24	-5.94		-2.36		-2.31
Il12a (Interleukin 12A)	-3.13	-5.37	-2.02			-2.53
Ciita (Class II transactivator)	-3.10	-4.41	2.46	-3.74	-2.41	-2.86
Sugt1 (SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae))	-3.03	-2.31	-5.64			
Mapk1 (Mitogen-activated protein kinase 1)	-2.97	-8.01	-2.04			
Map3k7 (Mitogen-activated protein kinase kinase 7)	-2.96	-2.15		-2.46		
Nfkbib (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta)	-2.95	-4.07			2.31	-3.33
Cd40lg (CD40 ligand)	-2.95	-4.07	-2.15		-2.22	-2.78
Nlrp9b (NLR family, pyrin domain containing 9B)	-2.95	-4.07	-2.15		-3.05	-2.81
Nlrp6 (NLR family, pyrin domain containing 6)	-2.95	-4.07	-2.15		-2.88	-3.38
Ifnb1 (Interferon beta 1, fibroblast)	-2.85	-4.07	-2.15	-2.05	-3.97	-3.66
Mapk3 (Mitogen-activated protein kinase 3)	-2.83	-2.32		-7.79		-4.32
Nlrc4 (NLR family, CARD domain containing 4)	-2.83	-3.99				
Nlrp5 (NLR family, pyrin domain containing 5)	-2.83	-4.07	-2.15		-3.38	-3.11
Ikbkg (Inhibitor of kappaB kinase gamma)	-2.78	-32.00	-10.81	2.92	-3.13	3.38
Tnfsf4 (Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4)	-2.74	-4.07	-2.15		-2.50	-2.81
Aim2 (Absent in melanoma 2)	-2.72	-2.97	-3.52			

Gene	Sem infecção 5 dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV ΔCap67 5dpi	Sem infecção 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV ΔCap67 + Cn 15dpi
Pstpip1 (Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1)	-2.69					-2.42
Irf3 (Interferon regulatory factor 3)	-2.68	-2.24			2.08	-3.08
Traf6 (Tnf receptor-associated factor 6)	-2.66	-2.25	-2.23		4.15	2.37
Panx1 (Pannexin 1)	-2.65					-2.96
Fadd (Fas (TNFRSF6)-associated via death domain)	-2.64	-2.30	2.98			-4.32
Mapk13 (Mitogen-activated protein kinase 13)	-2.62	-6.36		2.75	3.97	
Pea15a (Phosphoprotein enriched in astrocytes 15A)	-2.61	-3.13		-2.14		-2.58
Ripk2 (Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2)	-2.53	-5.00	-4.61	3.23		
Hsp90aa1 (Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1)	-2.38	-4.28		-2.55		-4.58
Pycard (PYD and CARD domain containing)	-2.34	-2.37			2.24	-2.22
Nlrp12 (NLR family, pyrin domain containing 12)	-2.33	-3.71	-2.22			-2.94
Mefv (Mediterranean fever)	-2.32	-5.65	-2.05	-2.17		-3.19
Mapk9 (Mitogen-activated protein kinase 9)	-2.29	-2.98		-4.27		-4.91
Nod1 (Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1)	-2.26	-2.04			2.74	
Tnf (Tumor necrosis factor)	-2.22	-4.21			-2.23	
Mapk12 (Mitogen-activated protein kinase 12)	-2.21	-3.51	2.12	-2.06		
Il12b (Interleukin 12b)	-2.11	-4.38	-2.17			-2.50
Nlrp3 (NLR family, pyrin domain containing 3)	-2.11	-3.31		-3.54		-2.38

Gene	Sem infecção 5 dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV ΔCap67 5dpi	Sem infecção 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV ΔCap67 + Cn 15dpi
Naip1 (NLR family, apoptosis inhibitory protein 1)	-2.06	-3.00	-2.15	-2.42	-2.59	-5.46
Cxcl3 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 3)	-2.04	-3.19	-2.13	-2.62		-4.38
Ifng (Interferon gamma)		-3.06	-2.15			-3.41
Tnfsf11 (Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11)			-2.77	-2.68	-4.52	-6.12
Irf4 (Interferon regulatory factor 4)		-2.64			2.47	
Ptgs2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2)		-3.68		-3.72	2.52	
Nfkbia (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)		-2.90			3.32	
Irak1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1)		-3.86		-2.03		-3.47
P2rx7 (Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7)		-2.17				
Ccl5 (Chemokine (C-C motif) ligand 5)		2.37				-2.47
Actb (Actin, beta)			-4.72			
B2m (Beta-2 microglobulin)	4.26	20.17	2.04			
Nlrp4e (NLR family, pyrin domain containing 4E)	2.99	-4.07	-2.15		-18.82	-17.32
Il6 (Interleukin 6)		-5.10	-2.31		3.11	-3.04
Nlrp1 (NLR family member X1)		-4.07				
Rela (V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian))		-3.03	3.06		2.05	-2.04
Tab1 (TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1)		-3.59				
Nlrp4b (NLR family, pyrin domain containing 4B)		-4.07	-2.15		-3.05	-2.81

Gene	Sem infecção 5 dpi	Cn + EV B3501 5dpi	Cn + EV ΔCap67 5dpi	Sem infecção 15 dpi	EV B3501 + Cn 15dpi	EV ΔCap67 + Cn 15dpi
Tirap (Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein)		-3.82				
Nod2 (Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2)		-2.13				-2.62
Nlrp1a (NLR family, pyrin domain containing 1A)		-2.19				-2.89
Naip5 (NLR family, apoptosis inhibitory protein 5)				-2.08	2.10	-2.69
Gapdh (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)				5.17	5.50	

DISCUSSÃO

Vesículas extracelulares já foram descritas como estratégia utilizada por diversos patógenos procariotos e eucariotos para secreção de compostos importantes para sua sobrevivência no organismo do hospedeiro (COELHO *et al.* 2018; ZAMITH-MIRANDA *et al.* 2018). No caso das EVs de *C. neoformans*, elas são compostas por lipídeos, proteínas, polissacarídeos e estruturas pigmentadas com funções importantes para a biologia do fungo, formação da cápsula lipoproteica e para sua interação com o hospedeiro. Entre estas funções relacionadas ao hospedeiro estão a evasão do sistema imune, modulação da atividade fagocítica de macrófagos e da secreção de citocinas por macrófagos e células dendríticas (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Neste trabalho, observou-se diferenças estruturais e imunomodulatórias em EVs produzidas em condições com muita ou pouca disponibilidade nutricional. Isso indica que o *C. neoformans* consegue modular a produção dessas EVs, bem como a composição de seu conteúdo (BROWN *et al.*, 2015) que descreveu/sugeriu alterações dinâmicas neste mecanismo de secreção de acordo com o ambiente encontrado pelo fungo.

Foi visto anteriormente que durante a infecção *in vivo* ou em situações de estresse como a limitação nutricional, limitação de CO₂ e de ferro ou a presença de soro de mamíferos, ocorre um maior desenvolvimento de mecanismos de virulência pelo *C. neoformans*. Alguns desses mecanismos afetados são o espessamento da cápsula polissacarídica, que dificulta o reconhecimento do fungo pelas células do sistema imune e maior produção de células titãs, o que favorece uma resposta não protetora pelo hospedeiro (ESHER, *et al.* 2018). Corroborando com estas informações, neste trabalho, foi visto que vesículas extracelulares produzidas em meio de cultura com baixa disponibilidade nutricional apresentam um diâmetro significativamente maior do que as produzidas em meio rico, além de apresentarem um conteúdo maior de fatores de virulência como GXM, fosfatase ácida, urease, lacase e proteínas de choque térmico, o que justificaria o aumento em seu tamanho. Já havia sido descrita a presença dessas moléculas no interior de vesículas extracelulares por RODRIGUES *et al.*, 2008, mas não sua relação com a disponibilidade nutricional.

Outro resultado interessante foi que EVs de B3501 foram maiores do que as de Δ Cap67, o que pode ser explicado pelo fato de as EVs de B3501 mas não as de Δ Cap67

apresentarem GXM. Da mesma forma, RODRIGUES *et al.* 2007 demonstrou por MET, que EVs da cepa acapsular são menores do que as da cepa capsular, apesar de serem bastante diversas em tamanho e conteúdo. Ademais, as imagens de microscopia apresentam EVs com um diâmetro hidrodinâmico de 100 a 200 nm em sua maioria, o que está de acordo com as EVs descritas na literatura secretadas pela maioria dos organismos vivos, que podem variar de 10 a 350 nm (KULP,A e KUEHN, 2010; COELHO *et al.* 2018; RODRIGUES, *et al.* 2008; YONEDA, *et al.* 2006). As imagens obtidas no MET demonstraram EVs eletrondensas, o que está de acordo com o que foi descrito anteriormente por RODRIGUES, *et al.* 2008, que demonstrou uma população de EVs de *C. neoformans* contendo 39% das EVs do tipo eletrondensas, 25% eletron-lúcidas, 21% com membrana eletrondensa e 15% contendo pigmentos no citoplasma.

A produção de EVs como estratégia de secreção de compostos de virulência já foi descrito também em bactérias gram-negativas e recentemente em gram-positivas. Até pouco tempo, acreditava-se que esse tipo de bactérias não secretavam EVs devido a presença da espessa parede celular de peptídeoglicano, similar à parede celular fúngica, que bloquearia sua secreção. Entretanto, assim como os fungos, as bactérias gram-positivas também são capazes de secretar EVs contendo fatores de virulência, compostos relacionados à resistência a antibióticos e à interação parasito-hospedeiro (COELHO *et al.* 2018).

Foi mostrado para bactérias gram-negativas, que as condições de crescimento como temperatura e disponibilidade de nutrientes no meio de cultura afetam diretamente a quantidade e características das EVs produzidas, variando de espécie para espécie. Foi mostrado que o aumento da temperatura durante o crescimento, leva a uma maior produção de EVs, já que favorece a proliferação dos microorganismos, mantendo-os em fase log de crescimento e conseqüentemente favorecendo a produção de EVs. Em relação à disponibilidade de nutrientes, *Lysobacter sp.* produz mais EVs quando submetido a uma baixa disponibilidade, enquanto *Pseudomonas fragi* apresenta menor produção nessas condições (KULP e KUEHN, 2010). Neste trabalho, foi mostrado que um meio rico em nutrientes estimula uma maior produção de EVs, embora sejam menores e com menor conteúdo proteico do que as produzidas no meio pobre.

Quando as EVs foram submetidas à interação com os macrófagos por 30 minutos, observou-se que, neste tempo, somente as EVs de Δ Cap67 foram internalizadas pelos macrófagos e as EVs produzidas no meio rico foram internalizadas em maior quantidade do que as produzidas no meio pobre. Pelas imagens obtidas, infere-se que provavelmente essas EVs estavam agregadas, o que teria facilitado o reconhecimento pelos macrófagos, já que na suspensão encontram-se poucos macrófagos contendo EVs, mas os encontrados apresentavam grande quantidade de conteúdo vesicular em seu interior. Isso pode ser explicado pela ausência de GXM nas EVs de Δ Cap67, molécula que dificulta o reconhecimento das cepas capsulares de *C. neoformans* e provavelmente também exerce esse papel nas vesículas secretadas por esse fungo (KOZEL *et al*, 1988).

Oliveira e colaboradores (2010) mostraram que EVs de cepas capsulares (HEC3393 e B3501) e acapsulares (Cap 67) de *C. neoformans* são ativamente incorporadas por macrófagos, modulando suas funções sem gerar toxicidade aguda a essas células. As vesículas de ambas as linhagens foram capazes de modular a produção de óxido nítrico e de citocinas. Contudo as EVs do mutante acapsular induziram uma maior produção de óxido nítrico e de TNF- α pelos macrófagos e uma menor produção de TGF- β e IL-10 do que as EVs da cepa encapsulada. Além disso, quando esses macrófagos pré-tratados com as EVs secretadas foram incubados com *C. neoformans* encapsulados e não opsonizados, o conteúdo vesicular foi capaz de ativar a fagocitose e as atividades microbicidas dos macrófagos, fazendo com que esses fossem capazes de matar mais eficientemente as células do fungo. Tal ativação foi mais eficiente no caso do tratamento com as EVs do mutante acapsular, o que pode ser explicado novamente pela ausência de GXM em suas EVs.

Neste trabalho, as EVs do mutante acapsular também foram mais eficientes em modular a resposta inflamatória do hospedeiro, causando aumento na produção de TNF- α nos primeiros cinco dias pós infecção, seguida por uma maior inibição na expressão gênica de genes relacionados ao inflamassoma e tecido pulmonar com menos sinais de inflamação e infiltrado celular do que os animais que receberam o tratamento com as EVs da cepa encapsulada. Outra relação interessante com os resultados obtidos por OLIVEIRA *et al*, 2010, foi que em seu trabalho, as EVs foram produzidas em um meio nutricionalmente pobre (meio mínimo) e foram efetivas em ativar o sistema imune de

forma geral. Da mesma forma, mostramos que as EVs produzidas no meio pobre estimularam mais o inflamassoma em relação ao meio rico.

Em um trabalho realizado com EVs de *C. albicans* cultivado em Meio Mínimo, VARGAS *et al.*, 2015 mostrou que o tratamento de macrófagos M0 com as EV permitiu a internalização das mesmas, levando a uma maior produção de óxido nítrico, IL-12, TGF- β e IL-10. Além disso, o tratamento de células dendríticas levou a uma maior produção de IL-12p40, IL-10 e TGF- α e a uma maior expressão de MHC II. O tratamento de larvas de *G. mellonella* com as EVs, seguido pela infecção com *C. albicans* levou novamente a uma resposta protetora pelo hospedeiro, sendo encontrada uma quantidade menor de fungos do que no grupo não tratado. Tal resultado também está de acordo com o que foi descrito neste trabalho, que mostrou EVs estimulando o sistema imune, quando o fungo é cultivado em um meio pobre em nutrientes.

A secreção de moléculas de virulência com função imunomodulatória já foi descrita em outras espécies de fungos, como *H. capsulatum* (ALBUQUERQUE *et al.* 2008), *P. brasiliensis* (VALLEJO *et al.* 2011) e *C. albicans* (VARGAS *et al.* 2015), sendo secretadas de forma livre ou associadas a vesículas extracelulares. Em *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *C. albicans*, as EVs secretadas apresentam epítomos antigênicos reconhecidos no soro de pacientes infectados, indicando provável influência dessas EVs na resposta adaptativa a essas infecções. Uma evidência da relação de EVs com sistema imune em *H. capsulatum* é que o cultivo do fungo com o anticorpo monoclonal anti-HSP60 modifica as características das EVs secretadas por ele em tamanho, abundância e conteúdo de moléculas de virulência (BALTAZAR *et al.* 2016).

Já em *P. brasiliensis*, foi mostrado que suas EVs são capazes de ativar um perfil inflamatório nos macrófagos, ativando a secreção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-12p70 e induzindo os macrófagos a mudarem de um perfil antiinflamatório M2 para um perfil inflamatório do tipo M1 (DA SILVA *et al.*, 2016). Diferente das EVs de *P. brasiliensis*, as de *C. albicans* induzem um perfil menos inflamatório, induzindo a secreção das citocinas anti-inflamatórias TGF- β e IL-10 por células dendríticas e macrófagos, respectivamente e de TNF- α por ambas. Esse perfil faz sentido, já que *C. albicans* é um organismo comensal e sua presença não estimula uma resposta imune exacerbada (VARGAS *et al.* 2015 e ZAMITH-MIRANDA *et al.* 2018).

Assim, muitos patógenos intra ou extracelulares apresentam diversas estratégias para sobreviver no organismo do hospedeiro, sendo evadindo o sistema imune ou modulando-o ativamente. Uma das estratégias utilizadas pelo *C. neoformans* para isso, é promovendo dano celular e tecidual no hospedeiro, interferindo na resposta imune celular efetora. Para isso, ele pode realizar um processo de exocitose lítica ao sair dos macrófagos para o meio extracelular, pode causar alterações em organelas celulares, no citoesqueleto e na membrana do fagolisossoma, o que acaba provocando uma resposta inflamatória exacerbada e ativando incorretamente o sistema imune (CASADEVALL *et al* 2018). Além disso, foi mostrado por BAKER, *et al*, 2007 que essa espécie é capaz de induzir uma resposta do tipo Th2 não protetora pelo hospedeiro a partir de modificações nos padrões moleculares de quitina e quitosana em sua parede celular. O aumento de quitina na constituição capsular também é uma modificação presente nas células títãs de *C. neoformans*, responsável pela indução de uma resposta Th2 em detrimento de uma resposta protetora do tipo Th1, o que favorece a sobrevivência do fungo no organismo do hospedeiro (BAKER, *et al*, 2007).

Em trabalhos anteriores realizados pelo grupo (BÜRCEL, 2018), foi mostrado que o *C. neoformans* é capaz de inibir a ativação do inflamassoma e consequentemente a liberação da interleucina IL-1 β por meio da secreção de moléculas menores que 1KDa, sendo o ácido 3-indol lático - (ILA), uma dessas moléculas, estando presente no meio condicionado da cepa B3501 (CM35). Foi mostrado também que o tratamento de macrófagos com o CM35 previamente à infecção com uma cepa virulenta H99 reduz a capacidade fagocítica dos macrófagos, aumenta a carga fúngica e aumenta a vomocitose, o que favorece a sobrevivência do fungo no organismo. Neste trabalho foi mostrado que EVs de *C. neoformans* cultivado em um meio nutricionalmente rico, quando incubadas junto com nigericina com macrófagos e células dendríticas, são capazes de reduzir a secreção de IL-1 β , enquanto as EVs produzidas durante um cultivo em meio pobre são capazes de estimular a secreção dessa citocina. Este resultado pode indicar a presença da molécula ativa do CM35 no interior das EVs, mas são necessários mais experimentos para comprovar tal hipótese.

A variação nos níveis de citocinas produzidos pelos macrófagos e células dendríticas ao interagir com EVs produzidas em meios de cultura com diferentes disponibili-

dades nutricionais pode indicar uma adaptação do *C. neoformans* para sobreviver em órgãos ou regiões específicas do organismo do hospedeiro. Alvéolos pulmonares e regiões inflamatórias são regiões com baixa disponibilidade nutricional, maior concentração de CO₂ e menor concentração de O₂ do que o meio ambiente externo. Para sobreviver bem em tais condições, espécies fúngicas como *C. albicans* e *C. neoformans* induzem a expressão de genes relacionados a vias alternativas para obtenção de carbono, que retiram esse nutriente de fontes pobres em carbono, como acetato e ácidos graxos. A principal via ativada por esses patógenos é o ciclo do glioxilato, que permite a síntese de glicose e de intermediários do Ciclo de Krebs a partir de Acetil-CoA e a principal molécula indutora deste ciclo é a isocitrato liase (ICL). Tal molécula também é superexpressa nos fagossomas pobres em nutrientes das células imunes (BARELLE *et al.*, 2006) e inibida em regiões ricas em nutrientes, como o sangue.

Esses patógenos também necessitam se adaptar às diferentes disponibilidades de CO₂ e O₂ no organismo, que são opostas às concentrações ambientais. No organismo, encontra-se predominantemente uma maior concentração de CO₂ e menor de O₂ em relação às concentrações ambientais. Para se adaptar, *C. albicans* e *C. neoformans* utilizam anidrase carbônica (CA) e adenilil ciclase (AC) para converter CO₂ em bicarbonato, utilizado para a biossíntese de ácidos graxos por meio do Ciclo do Ácido Cítrico (CAC). A ativação do CAC, por sua vez, ativa a via do cAMP, que é responsável por processos de filamentação fúngica e expressão de fatores de virulência (BAHN, Y. S., *et al.* 2006). Tais adaptações são interessantes também porque processos inflamatórios, trombose e necrose associada a infecções costumam aumentar a ocorrência de hipóxia nos tecidos. Outra enzima importante na regulação pós-transcricional durante o crescimento em situações de hipóxia é a histidina quinase Tco1 e o fator transcricional Sre1, responsável pela regulação da biossíntese de esterol (CHUN *et al.* 2007).

Sabe-se que a resposta inflamatória à agentes infecciosos como *C. neoformans* pode levar a quadros de fibrose pulmonar causados pelo grande recrutamento de monócitos e neutrófilos, seguido pela secreção de fatores de crescimento (PDGF, TGF, TGF-β), citocinas fibrinogênicas, fatores de angiogênese (FGF) e collagenases de remodelamento (ROBBINS e COTRAN, 2005). Além disso, tecidos fibróticos apresentam altas concentrações de NO₃, baixas concentrações de NO (importante componente da ação

antimicrobiana secretado pelas células imunes) e baixa disponibilidade de O₂ em relação a pacientes sem essa condição. Para sobreviver em tais condições, *Pseudomonas aeruginosa* inibe a expressão do regulador transcricional *lasR*, favorecendo uma maior utilização de NO₃ e menor de O₂ em relação ao organismo não mutado. Tal adaptação também gera uma série de alterações fenotípicas, incluindo uma maior resistência a antibióticos (HOFFMAN *et al.* 2010).

Em situações normais, os pulmões são tecidos com grande disponibilidade de nutrientes, devido principalmente à secreção de muco rico em compostos nitrogenados e glicose, responsáveis pela umidificação das vias aéreas e retenção da entrada de microrganismos estranhos. Entretanto, o epitélio deste órgão é composto por transportadores de aminoácidos responsáveis por manter baixa a concentração de nutrientes no lúmen, dificultando a sobrevivência de microrganismos patogênicos (MAGER e SLOAN 2003) Além disso, quando algum patógeno como o *C. neoformans* consegue entrar no tecido, ocorre uma grande ativação da resposta inflamatória, induzindo a internalização dos microrganismos por macrófagos residentes ou recém migrados. O ambiente inflamatório e o interior dos fagolisossomos apresentam disponibilidade de nutrientes ainda mais reduzida (BARELLE *et al.*, 2006).

Como mostrado aqui, as EVs produzidas em um meio pobre em nutrientes tendem a estimular a resposta inflamatória e é provavelmente neste cenário inicial de infecção que elas induzem essa resposta, favorecendo a fagocitose das leveduras. Tal estímulo é favorável ao *C. neoformans*, já que essa espécie sobrevive bem no interior de fagócitos e os utiliza como meio para se disseminar para outros órgãos, principalmente o SNC. Não se sabe exatamente como o *C. neoformans* faz para atravessar a barreira hemato-encefálica, mas sabe-se que ele é reconhecido pelos receptores CD44 presentes na barreira, que facilitam sua passagem (JONG *et al.*, 2008). Então, provavelmente, os macrófagos chegam até próximo da barreira, onde as partículas de *C. neoformans* são liberadas e conseguem atravessá-la. Já foi visto também que a presença de IL-6 está relacionada à integridade da barreira hemato-encefálica. Camundongos IL-6^{-/-} infectados com *C. neoformans* apresentam uma maior permeabilidade da barreira hemato-encefálica, seguido por uma maior carga fúngica cerebral e maior mortalidade em relação aos camundongos selvagens para IL-6 (LI *et al.*, 2015).

O tecido cerebral, por sua vez, é um tecido com grande disponibilidade de glicose, menos estressante e com maior disponibilidade de nutrientes do que o ambiente inflamatório do pulmão, já que o bom funcionamento das células nervosas depende de uma grande disponibilidade de nutrientes (GARCÍA-CÁCERES *et al.*, 2016). Acredita-se que, ao alcançar o SNC, as altas concentrações de glicose e nitrogênio induzem *C. neoformans* a produzir EVs com função inibitória do sistema imune, como foi mostrado aqui em modelos *in vitro* e *in vivo*. Essa mudança no tipo de EV produzida é interessante, pois já no tecido cerebral, é importante que não haja tanta resposta imune para que o *C. neoformans* possa consolidar seu processo infeccioso nas meninges. Concordando com essa hipótese, já havia sido mostrado anteriormente por Sheng-He Huang e colaboradores, que o tratamento utilizando EVs de *C. neoformans*, favorece o cruzamento da barreira hemato-encefálica e aumenta a carga fúngica cerebral em modelos *in vitro* e *in vivo*, o que reforça a importância das EVs no processo de migração e colonização do fungo no tecido cerebral (HUANG *et al.*, 2012).

Com esse trabalho podemos notar mais uma vez a importância das EVs para o processo de infecção da criptococose, bem como para a migração do fungo dos pulmões até o SNC e consolidação da doença. Aparentemente, a produção e características das EVs estão relacionados à concentração nutricional no tecido em que o fungo se encontra e apresentam funções imunomodulatórias variadas dependendo das características do tecido, influenciando a migração celular e resposta inflamatória de forma favorável ao fungo. Aparentemente, as EVs conseguem inibir a expressão de genes relacionados à ativação do inflamassoma, durante o processo infectivo, quando o fungo se encontra em um ambiente nutricionalmente favorável. No entanto, são necessários mais experimentos que mostrem como isso ocorre e quais são os mecanismos utilizados para causar tal inibição. O maior entendimento das características e funções das EVs de *C. neoformans* é de suma importância para conhecer melhor a biologia dessa espécie, facilitando então o desenvolvimento de novos mecanismos de combate à criptococose.

CONCLUSÃO

Dessa forma, podemos concluir que dependendo da disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio como glicose e nitrato presentes no meio de cultura, o *C. neoformans* modula a secreção de suas moléculas de virulência encapsuladas em vesículas extracelulares. Tais EVs, que variam em tamanho e concentração de compostos de virulência, modulam a ativação do inflamassoma, o que pode interferir na sua interação com o tecido infectado especificamente com as células da resposta imune.

BIBLIOGRAFIA

1. Albuquerque, P. C.; Nakayasu, E. S.; Rodrigues, M. L.; S. Frases, Casadevall, A. R.; Zancoppe-Oliveira, M.; Almeida, I. C. and Nosanchuk, J. D. (2008). "Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes." *Cellular Microbiology* 10(8): 1695-1710.
2. Almeida, G. M., Andrade, R. M., & Bento, C. A. M. (2001). The Capsular Polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* Activate Normal CD4+ T Cells in a Dominant Th2 Pattern. *The Journal of Immunology*, 167(10), 5845–5851.
3. Altfeld, M., Addo, M.M., Kreuzer, K.A., Rockstroh, J.K., Dumoulin, F.L., Schliefer, K., Leifeld, L., Sauerbruch, T., Spengler, U. (2000). "T(H)1 to T(H)2 shift of cytokines in peripheral blood of HIV-infected patients is detectable by reverse transcriptase polymerase chain reaction but not by enzyme-linked immunosorbent assay under nonstimulated conditions." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 23(4): 287-94.
4. Allen, I. C., Scull, M. A., Moore, C. B., Holl, E. K., McElvania-TeKippe E., *et al.* (2009). "The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA." *Immunity* 30: 556-65
5. Augusto, M., Ikeda, K., Roberto, J., Almeida, F. De, Jannuzzi, G. P., Cronemberger-andrade, A., ... Miranda, D. Z. (2018). Extracellular Vesicles From *Sporothrix brasiliensis* Are an Important Virulence Factor That Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis, 9(October), 1–11.
6. Bahn, Y. S., Muhlschlegel, F. A. (2006). "CO2 sensing in fungi and beyond". *Current Opinion in Microbiology*, 9:572-578.
7. Baltazar, L. M., Zamith-Miranda, D., Burnet, M. C., Choi, H., Nimrichter, L., Nakayasu, E. S., Nosanchuk, J. D. (2018) "Concentration-dependent protein loading of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum* after antibody treatment and its modulatory action upon macrophages". *Scientific Reports*. 8:8065.
8. Barelle, C. J., Priest, C. L., Maccallum, D. M., Gow, N. A., Odds, F. C., Brown, A. J. (2006) "Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen". *Cellular Microbiology*. 8:961-971
9. Bauernfeind, F., Ablasser, A., Bartok, E., Kim, S., Schmid-Burgk, J., *et al.* (2011). "Inflammasomes: current understanding and open questions". *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 765-83
10. Bain, J. M., Lewis, L. E., Blessing Okai, Janet Quinn, Neil A. R. Gow, Lars-Peter Erwig. (2012) "Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages". *Fungal Genetics and Biology*. 49: 677–678
11. Benjamin J. Parka, Kathleen A. Wannemuehlerb, Barbara J. Marstonc, Nelesh Govenderd, Peter G. Pappase and Tom M. Chiller. (2009) "Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS". *AIDS*. 23:525–530.
12. Bekondi, C., Bernede, C., Passone, N., Minssart, P., Kamalo, C., Mbolidi, D., Germani, Y. (2006) "Primary and opportunistic pathogens associated with meningitis in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus sero- tatus". *International Journal of Infectious Diseases*. 10:387–395.
13. Bergsbaken, T., Fink, S. L., Cookson, B. T. (1989) "Pyroptosis: host cell death and inflammation". *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(2):99–109.
14. Bolanos B. e Mitchell T. G. (1989) "Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages". *Journal of medical and veterinary mycology*; 27(4): 203-17
15. Bonnett, C. R., Cornish, E. J., Harmsen, A.G., Burritt, J.B. (2006). "Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia." *Infection and Immunity* 74: 6528-39
16. Bose, I., Reese, A. J., Ory, J. J., Janbon, G., Doering, T.L. (2003) A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*; 2(4): 655-63.
17. Bourgeois, C., Majer, O., Frohner, I. E., Tierney, L. & Kuchler, K. (2010) "Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting". *Current Opinion in Microbiology*. 13, 401–408.

18. Brown, G. D. (2011). "Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes". *Annu Rev Immunol* 29: 1-21
19. Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 620–630.
20. Bulmer, G. S.; Sans, M. D.; Gunn, C. M. (1967) "Cryptococcus neoformans. I. Nonencapsulated mutants". *Journal of Bacteriology*, v. 94, n. 5, p. 1475–1479.
21. Bürgel, Pedro Henrique Miranda. Moléculas pequenas secretadas pelo fungo *Cryptococcus neoformans* interferem na ativação do inflamassoma NLRP3. 2018. 109f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Microbiana, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
22. Calich, V. L., Pina, A., Felonato, M., Bernardino, S., Costa, T. A., Loures, F. V. (2008). "Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis." *FEMS Immunol Med Microbiol* 53: 1-7.
23. Callejas, A., Ordonez, N., Rodriguez, M. C., Castaneda E. (1998) "First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia". *Medical Mycology*, 36:341– 44.
24. Carvalho, A., Cunha, C., Pasqualotto, A. C., Pitzurra, L., Denning, D.W., Romani, L. (2010). "Genetic variability of innate immunity impacts human susceptibility to fungal diseases". *International Journal of Infectious Diseases* 14: e460-8
25. Casadevall, A., Pirofski, L. A. (2007) "Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes". *Eukaryot Cell*; 6(12): 2169-74.
26. Casadevall, A. (2010). Cryptococci at the brain gate: Break and enter or use a Trojan horse? *Journal of Clinical Investigation*, 120(5), 1389–1392. <https://doi.org/10.1172/JCI42949>
27. Casadevall, A., Coelho, C., & Alanio, A. (2018). Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-mediated host damage. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 1–8.
28. Chakrabarti, A., Jatana, M., Kumar, P., Chatha, L., Kaushal, A., Padhye, A.A. (1997). Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *J. Clin. Microbiol.* 35:3340–42.
29. Chen, Y., Toffaletti, D.L., Tenor, J.L., Litvintseva, A.P., Fang, C., Mitchell, T.G., et al. (2014) "The *Cryptococcus neoformans* transcriptome at the site of human meningitis". *MBio*; 5(1): 1-10.
30. CHEN, M. et al. (2015) "Internalized *Cryptococcus neoformans* Activates the Canonical Caspase-1 and the Noncanonical Caspase-8 Inflammasomes". *The Journal of Immunology*, v. 195, n. 10, p. 4962–4972.
31. Chrisman CJ, Alvarez M, Casadevall A. (2010). "Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and nonlytic exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*". *Applied Environmental Microbiology*, 76: 6056-62.
32. Chun, C.D., Liu, O.W., Madhani, H.D. (2007). "A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*". *PLoS Pathogens*, 3:e22.
33. Clarke, S. C., Dumesic, P. A., Homer, C. M., Donoghue, A. J. O., Greca, F. La, Pallova, L., Craik, C. S. (2016). Integrated Activity and Genetic Profiling of Secreted Peptidases in *Cryptococcus neoformans* Reveals an Aspartyl Peptidase Required for Low pH Survival and Virulence, 1–30.
34. Coelho, C., Brown, L., Maryam, M., Burnet, M. C., Kyle, J. E., Heyman, H. M., ... Casadevall, A. (2018). *Listeria monocytogenes* virulence factors are secreted in biologically active Extracellular Vesicles. *BioRxiv*, (5), 210906.
35. Cox, G. M., J. Mukherjee, G. T. Cole, A. Casadevall, and J. R. Perfect. (2000). "Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis". *Infect. Immun.* 68:443–448.
36. Cunha, C.; Romani, L.; Carvalho, A. (2010) Cracking the Toll-like receptor code in fungal infections. Expert review of anti-infective therapy, v. 8, n. 10, p. 1121–37.
37. Da Silva, T. A., Roque-Barreira, M. C., Casadevall, A., & Almeida, F. (2016). "Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro". *Scientific Reports*, 1–10.
38. Davis, M.J., Eastman, A.J., Qiu, Y., Gregorka, B., Kozel, T.R., Osterholzer, J.J., et al. (2015) "*Cryptococcus neoformans* - induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence". *Journal of Immunology*; 194(5): 2219-31

39. Del Valle, L., Pina-Oviedo, S. (2006). "HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis". *Front. Biosci.* 11:718–32;
40. Denning, D. W. (2016). Minimizing fungal disease deaths will allow the UNAIDS target of reducing annual AIDS deaths below 500 000 by 2020 to be realized. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709).
41. Diamond, R. D., J. E. May, M. Kane, M. M. Frank, and J. E. Bennett. (1973). The role of late complement components and the alternate complement pathway in experimental cryptococcosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144: 312–315.
42. Feldmesser, M., Kress, Y., Casadevall, A. (2001). "Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection". *Microbiology* 147: 2355-65
43. Franchi, L., Munoz-Planillo, R., Nunez, G. (2012). "Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes". *Nat Immunol* 13: 325-32
44. Fromtling, R.A., Shadomy, H.J., Jacobson, E.S. (1982) "Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*". *Mycopathology*; 79(1): 23-9.
45. Fu, M. S., Coelho, C., De Leon-Rodriguez, C. M., Rossi, D. C. P., Camacho, E., Jung, E. H., Casadevall, A. (2018). *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. *PLoS Pathogens* (Vol. 14).
46. Fulurija, A., Ashman, R. B. and Papadimitriou, J. M. (1996) "Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance". *Microbiology*. 142: 3487–3496.
47. Garcia, C., Varela, L., Go, M., Horvath, T. L., Tscho, M. H., Quarta, C., ... Torres-alema, I. (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability Article Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability, 867–880.
48. Garcia-Hermoso D, Janbon G, Dromer F. (1999). Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Clin. Microbiol.* 37(10):3204–9.
49. Gilbert, A. S., Seoane, P. I., Sephton-Clark, P., Bojarczuk, A., Hotham, R., Giurisato, E., ... May, R. C. (2017). Vomocytosis of live pathogens from macrophages is regulated by the atypical MAP kinase ERK5. *Science Advances*, 3(8).
50. Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschlager, N., et al. (2009). "Syk kinase signaling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence". *Nature* 459: 433-6
51. Guo, C., Chen, M., Fa, Z., Lu, A., Fang, W., Sun, B., Chen, C., Liao, W., Meng, G. (2014) Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Microbes Infect.* Sep 2. pii: S1286-4579(14)00128-2.
52. Hagen, F.; Khayhan, K.; Theelen, B.; Kolecka, A.; Polacheck, I.; Sionov E., Falk R.; Parmen S., Lumbsch, H. T.; Boekhout, T. (2015) Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 78:16–48.
53. Hardison, S.E., Brown, G.D. (2012). "C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity". *Nat Immunol* 13: 817-22
54. Hawkins, R. A., Mans, A. M., Davis, D. W., Hibbard, L. S., & Lu, D. M. (1983). Glucose Availability to Individual Cerebral Structures Is Correlated to Glucose Metabolism. *Journal of Neurochemistry*, 40(4), 1013–1018.
55. Hise, A.G., Tomalka, J., Ganesan, S., Patel, K., Hall, B.A., et al. (2009). "An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*". *Cell Host Microbe* 5: 487-97.
56. Hoffman, L. R., Richardson, A. R., Houston, L. S., Kulasekara, H. D., Martens-Habbena, W., Klausen, M., ... Miller, S. I. (2010). Nutrient availability as a mechanism for selection of antibiotic tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF airway. *PLoS Pathogens*, 6(1).
57. Hommel B, Mukaremera L, Cordero RJB, Coelho C, Desjardins CA, Sturny-Leclere A, et al. Identification of environmental and genetic factors important for *Cryptococcus neoformans* titan cell formation using new in vitro inducing conditions. *PLOS Pathogens*; 14(5):e1006982.
58. Huang, S.H., Wu, C.H., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J., Brown, R.J., et al. (2012) *Cryptococcus neoformans*- derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. *PLoS One* 7: e48570.

59. Idnurm, A, Bahn, Y.S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J.A., Heitman, J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:753–64
60. Joly, S., Ma, N., Sadler, J.J., Soll, D.R., Cassel, S.L., Sutterwala, F.S. (2009). "Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome". *J Immunol* 183: 3578-81.
61. Johnston, S. A., Voelz, K., and May, R. C. (2016). *Cryptococcus neoformans* Thermotolerance to Avian Body Temperature Is Sufficient for Extracellular Growth but Not Intracellular Survival in Macrophages. *Scientific Reports*, 6(January), 1–9.
62. Jong, A., Wu, C. H., Prasadarao, N. V., Kwon-Chung, K. J., Chang, Y. C., Ouyang, Y., Huang, S. H. (2008). Invasion of *Cryptococcus neoformans* into human brain microvascular endothelial cells requires protein kinase C- α activation. *Cellular Microbiology*, 10(9), 1854–1865. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01172.x>
63. Karnovsky, M. J. (1965) "A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27:137-8A.
64. Kechichian, T. B., Shea, J., & Del Poeta, M. (2007). Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infection and Immunity*, 75(10), 4792–4798.
65. Keller, M. *et al.* (2008) "Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion". *Cell*; 132(5):818–31.
66. Kozel, T. R., Pfrommer, G. S., Guerlain, a S., Highison, B. a, & Highison, G. J. (1988). "Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Reviews of Infectious Diseases*". 10 Suppl 2(August), S436-9.
67. Kozubowski, L., Lee, S.C., Heitman J. (2009). "Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*". *Cell Microbiol* 11: 370-80.
68. Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 163–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>
69. Kwon-Chung, K. J., & Varma, A. (2006). Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*, 6(4), 574–87. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00088.x
70. Lamkanfi M, Dixit VM. (2012). "Inflammasomes and their roles in health and disease". *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 137-61.
71. Leal, I. S., Appelberg, R. and Silva, M. T. (1996) "Neutrophils are involved in the non-specific resistance to listeriosis induced by mycobacterial infections". *Immunology*. 89: 442–448.
72. Lei, G., Chen, M., Li, H., Niu, J.L., Wu, S., Mao, L., Lu, A., Wang, H., Chen, W., Xu, B., Leng, Q., Xu, C., Yang, G., An, L., Zhu, L.P., Meng, G. (2013) "Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome". *Cell Res.* Jul;23(7):965-8.
73. Leone F, Bellani L, Mucciflora S, Giorgetti L, Bongioanni P, Simili M, et al. Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*. *J Cell Physiol.* 2017;
74. Levitz, S. M., DiBenedetto DJ. Paradoxical role of capsule in murine bronchoalveolar macrophage-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol.* 1989; 142(2): 659-65.
75. Levitz, S. M., Nong, S. H., Seetoo, K. F., Harrison, T. S., Speizer, R. A., Simons, E. R. (1999). "*Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages". *Infect Immun* 67: 885-90
76. Li, X., Liu, G., Ma, J., Zhou, L. Z. Q. e G. L. (2015). Brief communication Lack of IL-6 increases blood – brain barrier permeability in fungal meningitis, 40(February), 7–12.
77. Lin, X. (2009). "*Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol* 9: 401-16
78. Lin, X., Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 60: 69-105
79. Liu, O.W., Chun, C.D., Chow, E.D., Chen, C., Madhani, H.D., Noble, S.M. (2008). "Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*". *Cell* 135: 174-88
80. Littman M.L., Borok, R. (1968) Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol Mycol Appl*; 35(3): 329-45.

81. Litvintseva, A.P., Carbone, I., Rossouw, J., Thakur, R., Govender, N.P., Mitchell, T.G. (2011) "Evidence that the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* may have evolved in Africa". *PLoS One*. 6(5): e19688;
82. Mager, S. e Sloan, J. (2003) "Possible role of amino acids, peptides, and sugar transporter in protein removal and innate lung defense. *European Journal of Pharmacology*" 479. 263–267.
83. Matos, B. L., Nakayasu, E.S., Sobreira, T.J., Choi, H., Casadevall, A., Nimrichter, L., et al. (2016) "Antibody binding alters the characteristics and contents of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum*". *mSphere* 1: e00085-15.
84. Meara, T. R. O., Holmer, S. M., Selvig, K., Dietrich, F., & Alspaugh, J. A. (2013). *Cryptococcus neoformans* Rim101 Is Associated with Cell Wall. *MBio*, 4(1), 1–13.
85. Mukherjee, J., G. Nussbaum, M. D. Scharff, and A. Casadevall. (1995) "Protective and nonprotective monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* originating from one B cell". *J. Exp. Med.* 181:405–409.
86. Murdock, B. J., Teitz-Tennenbaum, S., Chen, G.-H., Dils, A. J., Malachowski, A. N., Curtis, J. L., ... Osterholzer, J. J. (2014). "Early or Late IL-10 Blockade Enhances Th1 and Th17 Effector Responses and Promotes Fungal Clearance in Mice with Cryptococcal Lung Infection". *The Journal of Immunology*, 193(8), 4107–4116.
87. Nakamura, K. et al. (2007) "Dectin-1 is not required for the host defense to *Cryptococcus neoformans*". *Microbiology and Immunology*, v. 51, n. 11, p. 1115–1119.
88. Nakamura, K. et al. (2008) "Deoxynucleic Acids from *Cryptococcus neoformans* Activate Myeloid Dendritic Cells via a TLR9-Dependent Pathway". *The Journal of Immunology*, v. 180, p. 4067–4074.
89. Nicola, A. M., Frases, S., Casadevall, A. (2009) "Lipophilic Dye Staining of *Cryptococcus neoformans* Extracellular Vesicles and Capsule". *Eukaryotic Cell Sep*; 8(9): 1373–1380.
90. Nicola, A. M., Robertson, E. J., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Casadevall, A. (2011) "Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH". *MBio* 2
91. Nosanchuk, J. D., L. Nimrichter, A. Casadevall and M. L. Rodrigues (2008). "A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis." *Commun Integr Biol* 1(1): 37-39.
92. Noverr, M. C., G. M. Cox, J. R. Perfect, and G. B. Huffnagle. (2003) "Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production". *Infect. Immun.* 71:1538–1547.
93. Oliveira, D. L., E. S. Nakayasu, L. S. Joffe, A. J. Guimaraes, T. J. Sobreira, J. D. Nosanchuk, R. J. Cordero, S. Frases, A. Casadevall, I. C. Almeida, L. Nimrichter and M. L. Rodrigues (2010). "Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis." *PLoS One* 5(6): e11113
94. Oliveira D. L., Freire-de-Lima C. G., Nosanchuk J. D., Casadevall A., Rodrigues M. L., et al. (2010) "Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions". *Infect Immun* 78: 1601–1609.
95. Oliveira, D. L. et al. Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS ONE* 5, e11113 (2010)
96. Osterholzer, J.J., Curtis, J.L., Polak, T., Ames, T., Chen, G.H., et al. (2008) "CCR2 mediates conventional dendritic cell recruitment and the formation of bronchovascular mononuclear cell infiltrates in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*". *J Immunol* 181: 610-20.
97. Panepinto, J. C., K. W. Komperda, M. Hacham, S. Shin, X. Liu, and P. R. Williamson. (2007) "Binding of serum mannan binding lectin to a cell integrity-defective *Cryptococcus neoformans* ccr4& mutant". *Infect. Immun.* 75: 4769–4779.
98. Pappas, P. G. Cryptococcal Infections in Non-Hiv-Infected Patients. (2013). *Transactions of the American Clinical Climatological Association.*; 124: 61–79.
99. Pedrosa, J., Saunders, B. M., Appelberg, R., Orme, I. M., Silva, M. T. and Cooper, A. M., Neutrophils play a protective non-phagocytic role in systemic Mycobacterium tuberculosis infection in mice (2000). *Infect. Immun.* 68: 577–583.
100. Pfeiffer, T. J., Ellis, D. H., (1992) "Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*". *J. Med. Vet. Mycol.* 30:407–8.

101. Pietrella D, Corbucci C, Perito S, Bistoni G, Vecchiarelli A. (2005) "Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation". *Infect Immun* 73: 820-7.
102. Qin, Q. M., Luo, J., Lin, X., Pei, J., Li, L., Ficht, T.A., et al. (2011) "Functional analysis of host factors that mediate the intracellular lifestyle of *Cryptococcus neoformans*". *PLoS Pathog.* 7(6): e1002078.
103. Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, J. B., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., Denning, D. W., Loyse, A. and Boulware, D. R. (2017) "Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis Radha". *Lancet Infect Dis.* 17(8): 873–881.
104. Rhodes, J. C. (1985). "Contribution of complement component C5 to the pathogenesis of experimental murine cryptococcosis. *Sabouraudia*" 23:225– 234.
105. Robbins e Cotran - Patologia - Bases Patológicas Das Doenças - 7ª Ed. 2005
106. Rodrigues, M. L., E. S. Nakayasu, D. L. Oliveira, L. Nimrichter, J. D. Nosanchuk, I. C. Almeida and A. Casadevall (2008). "Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence." *Eukaryot Cell* 7(1): 58-67
107. Rodrigues, M. L., L. Nimrichter, D. L. Oliveira, S. Frases, K. Miranda, O. Zaragoza, M. Alvarez, A. Nakouzi, M. Feldmesser and A. Casadevall (2007). "Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport." *Eukaryot Cell* 6(1): 48-59
108. Rodrigues, M. L., L. Nimrichter, D. L. Oliveira, J. D. Nosanchuk and A. Casadevall (2008). "Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules?" *Lipid Insights* 2: 27-40
109. Said-Sadier N, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM. (2010). "Aspergillus fumigatus stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase". *PLoS One* 5: e10008
110. Schroder K, Tschopp J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140: 821-32
111. Shoham S., Huang, C., Chen J.M., Golenbock, D.T., Levitz, S.M. (2001) "Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule." *J Immunol* 166: 4620-6
112. Smith, L. M., Dixon, E. F. and May, R. C. (2015) "The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. *Cellular Microbiology*". 17(5), 702–713.
113. Silva BM, Prados-Rosales R, Espadas-Moreno J, Wolf JM, Luque- Garcia JL, Goncalves T, et al. Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. *Med Mycol.* 2014;52(2):202–10.
114. Sorrell, T.C., Ellis, D.H. (1997). "Ecology of *Cryptococcus neoformans*". *Rev Iberoam Micol* 14: 42-3
115. Steenbergenm, J. N., Casadevall, A. (2003) "The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*". *Microbes Infect.* 2003; 5(7): 667-75.
116. Szymczak, W. A., Deepe, G. S. Jr. (2009) "The CCL7-CCL2-CCR2 axis regulates IL-4 production in lungs and fungal immunity". *J Immunol* 183: 1964-74.
117. Taylor-Smith, L. M., & May, R. C. (2016) "New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit". *Current Opinion in Microbiology.* 67–74.
118. Tavares, A. H., Magalhães, K. G., Almeida, R. D., Correa, R., Burgel, P. H., Bocca, A.L. (2013) "NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*". *PLoS Negl Trop Dis.* Dec 5;7(12):e2595.
119. Taborda, C. P., and A. Casadevall. (2001) "Immunoglobulin M efficacy against *Cryptococcus neoformans*: mechanism, dose dependence, and pro- zone-like effects in passive protection experiments". *J. Immunol.* 166:2100– 2107
120. Tian, X., Pascal, G., Monget, P. (2009). "Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems". *BMC Evol Biol* 9: 202
121. Vallejo MC, Matsuo AL, Ganiko L, Medeiros LC, Miranda K, Silva LS, et al. (2011) "The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic alpha-Galactosyl epitopes". *Eukaryot Cell* 10:343-51.
122. Tucker, S. C. and A. Casadevall (2002). "Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 3165-3170

123. Vallejo, M. C., E. S. Nakayasu, L. V. Longo, L. Ganiko, F. G. Lopes, A. L. Matsuo, I. C. Almeida and R. Puccia (2012). "Lipidomic analysis of extracellular vesicles from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis*." *PLoS One* 7(6): e39463
124. Vallejo, M. C., E. S. Nakayasu, A. L. Matsuo, T. J. Sobreira, L. V. Longo, L. et al. (2012). "Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi." *J Proteome Res* 11(3): 1676-1685.
125. van de Veerdonk, F. L., Kullberg, B. J., van der Meer, J. W., Gow, N. A. & Netea, M. G. (2008) "Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens". *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 305-312.
126. Vanaja, S., Rathinam, V., Fitzgerald, K. (2015) "Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights". *Trends Cell Biol.* 25: 308-315.
127. Vargas, G., Rocha, J. D., Oliveira, D. L., Albuquerque, P. C., Frases, S., et al. (2015) "Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*". *Cell Microbiol* 17: 389-407.
128. Voelz, K., May, R. C. (2010). "Cryptococcal interactions with the host immune system". *Eukaryot Cell* 9: 835-46
129. Walsh, N. M. et al. (2017) "Characterization of C-type lectins reveals an unexpectedly limited interaction between *Cryptococcus neoformans* spores and Dectin-1". *PLOS ONE*, v. 12, n. 3, p. e0173866, 10 mar.
130. Wang, J. P. et al. (2011) "Contributions of the MyD88-dependent receptors IL-18R, IL-1R, and TLR9 to host defenses following pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*". *PloS one*, v. 6, n. 10, p. e26232.
131. Williamson, P. R. (1997). "Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*". *Frontiers in Bioscience*, 2(19), E99-E107.
132. Wolf, J. M., Rivera, J., Casadevall, A. (2012) "Serum albumin disrupts *Cryptococcus neoformans* and *Bacillus anthracis* extracellular vesicles". *Cell Microbiol* 14: 762-773.
133. Wolf, J. M. and A. Casadevall (2014). "Challenges posed by extracellular vesicles from eukaryotic microbes." *Curr Opin Microbiol* Volume 22: 73-78.
134. Wozniak, K. L., Vyas, J. M., Levitz, S. M. (2006). "In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis". *Infect Immun* 74: 3817-24;
135. Yoneda, A. and T. L. Doering (2006). "A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis." *Mol Biol Cell* 17(12): 5131-5140.
136. Zaragoza, O.; Fries, B. C.; Casadevall, A. (2003) "Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂". *Infect Immun.* 71(11):6155-64
137. Zaragoza, O., A. Telzak, R. A. Bryan, E. Dadachova, and A. Casadevall. (2006) "The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding". *Mol. Microbiol.* 59:67-83.
138. Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., de Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., Casadevall, A. (2009) "The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*". *Adv Appl Microbiol.* 68: 133-216.
139. Zaragoza, O. and Nielsen, K. (2013) "Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: Cells with a giant impact". *Curr Opin Microbiol.* 16(4): 409-413.

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Incidência anual da criptococose por país.....	7
Figura 2. Microscopia óptica de <i>Cryptococcus neoformans</i>	8
Figura 3. Ativação do inflamassoma por patógenos fúngicos.....	20
Figura 4. Conteúdo proteico e de ergosterol nas suspensões de EVs.....	36
Figura 5. Diâmetro hidrodinâmico das EVs de <i>C. neoformans</i> B3501.....	37
Figura 6. Diâmetro hidrodinâmico de EVs de <i>C. neoformans</i> Δ Cap 67.....	38
Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de vesículas extracelulares de <i>C. neoformans</i>	40
Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas extracelulares de <i>C. neoformans</i>	41
Figura 9. Atividade enzimática nas EVs.....	42
Figura 10. Microscopia confocal da interação de macrófagos com as EVs	45
Figura 11. Concentração de citocinas no sobrenadante da cocultura de células dendríticas ou macrófagos com as EVs de B3501.....	46
Figura 12. Concentração de citocinas no sobrenadante da cocultura de células dendríticas ou macrófagos com as EVs de Δ Cap67.....	47
Figura 13. Quantificação da carga fúngica nos pulmões 5 dias pós infecção	48
Figura 14. Concentração de citocinas no sobrenadante dos macerados dos pulmões dos camundongos infectados com B3501 e tratados 1 e 3 dias pós infecção. Sacrifício 5 dias pós infecção.....	49
Figura 15. Relação entre os genes expressos nos pulmões dos camundongos infectados com <i>C. neoformans</i> , sacrificados 5 dias pós infecção em relação aos não infectados...	49
Figura 16. Relação entre os genes expressos nos pulmões dos camundongos infectados com <i>C. neoformans</i> , sacrificados 5 dias pós infecção em relação aos infectados que não receberam tratamento	51
Figura 17. Histopatológico dos pulmões dos camundongos infectados e tratados ou não com as EVs de <i>C. neoformans</i> 1 e 3 dias após a infecção e sacrificados no quinto dia..	52
Figura 18. Concentração de citocinas no sobrenadante dos macerados dos pulmões dos camundongos infectados com B3501 e tratados 2 e 4 dias pós infecção. Sacrifício 15 dias pós infecção.....	53
Figura 19. Relação entre os genes expressos nos pulmões dos camundongos infectados com <i>C. neoformans</i> em relação aos não infectados ou em relação aos infectados que não	

receberam tratamento, sacrificados 15 dias pós infecção em relação aos não infectados.....54

Figura 20. Histopatológico dos cérebros dos camundongos infectados e tratados ou não com as EVs de *C. neoformans* B3501 e Δ Cap67 2 e 4 dias antes ou após a infecção e sacrificados 15 dias depois.....55

Tabela 1. Expressão gênica nos pulmões de camundongos infectados com *C. neoformans* B3501 e tratados com as EVs antes ou depois da infecção e sacrificados 5 ou 15 dias pós infecção (dpi). Comparação feita em relação ao grupo controle, não infectado.....56

Tabela 2. Expressão gênica nos pulmões de camundongos infectados com *C. neoformans* B3501 e tratados com as EVs antes ou depois da infecção e sacrificados 5 ou 15 dias pós infecção (dpi). Comparação feita em relação ao grupo controle, infectado mas não tratado com EVs.....60

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALR	Receptores do tipo AIM2
ASC	Proteína do tipo SPECK associada a apoptose que contém CARD
ATP	Adenosina Trifosfato
BM	Célula de Medula Óssea
BMDC	Célula Dendrítica Derivada de Medula Óssea
BMDM	Macrófago Diferenciado por GM-CSF Derivado de Medula Óssea
BSA	Albumina Bovina Sérica
cDNA	DNA Cíclico
CLR	Receptores de Tipo Lecitina
CO ₂	Dióxido de Carbono
CM35	Meio Condicionado Derivado de B3501
DAMP	Padrão Molecular Associados a Dano
Dil	Percloroeto de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Ligação Imunoenzimático
EV	Vesícula Extracelular
<i>g</i>	Força Centrífuga Relativa
GalXM	Galactoxilomanana
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GXM	Glucoronoxilomanana
HBMEC	Células Endoteliais Microvasculares do Cérebro Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

HSP	Proteína de Choque Térmico
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de Citocinas da Família IL-1
ILA	Ácido 3-indol lático
kDa	Kilodalton
LCCM	Meio Condicionado Célula L
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeos
m	Metro
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitros
MM	Meio Mínimo
mM	Milimolar
mm	milimetro
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NLR	Receptor de Tipo NOD
NLRC	Receptor do Tipo NOD que contém CARD
NLRP	Receptor do Tipo NOD que contém Pirina
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO ₃	Nitrato
NOD	Domínio de Oligomerização de Nucleotídeos
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pdi	Índice de Polidispersividade

PGN	peptidoglicano
pH	Potencial Hidrogeniônico
PK	Proteína Quinase
PRR	Receptor de Reconhecimento Padrão
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Reativos de Oxigênio
RPM	Rotações por Minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SyK	Tirosina Quinase Esplênica
TGF	Fator de Transformação do Crescimento
Th	Linfócito T Auxiliar
TLR	Receptor do Tipo <i>toll</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
O ₂	Oxigênio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UnB	Universidade de Brasília