



**Universidade de Brasília**

**Instituto de Biologia**

**Departamento de Biologia Celular**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**Variabilidade na Expressão de Fatores de Virulência e  
Interação de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.  
com Macrófagos**

**Stefânia de Oliveira Frazão**

Orientadora: Prof. Dra Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola

Co-orientador: André Moraes Nicola

**Brasília  
2024**



**Universidade de Brasília**

**Instituto de Biologia**

**Departamento de Biologia Celular**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

# **Variabilidade na Expressão de Fatores de Virulência e Interação de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. com Macrófagos**

**Stefânia de Oliveira Frazão**

**Orientadora: Prof. Dra Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola**

**Co-orientador: André Moraes Nicola**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Microbiana.**

**Brasília**

**2024**

**STEFÂNIA DE OLIVEIRA FRAZÃO**

**Variabilidade na Expressão de Fatores de Virulência e Interação de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. com Macrófagos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Microbiana.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola**  
**Universidade de Brasília (Orientadora)**

**Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares**  
**Universidade de Brasília (Avaliador)**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Camila Guimarães de Freitas**  
**Instituto Federal de Brasília (Avaliadora)**

**Dr.<sup>a</sup> Amanda Pereira Rocha**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Avaliadora)**

**Prof. Dr. Jhones do Nascimento Dias**  
**Centro Universitário IESB (Suplente)**

## **Agradecimentos**

Primeiramente, a Deus pela oportunidade de chegar até aqui e por ter cuidado de mim nos detalhes sendo meu guia e fortaleza.

Ao esposo Suelliton, pela cumplicidade, pelo apoio emocional, pelo colinho nos momentos de desespero, por segurar as pontas para que eu finalizasse essa etapa, por me lembrar milhões de vezes que eu iria conseguir e por sempre estar. Você é incrível.

Aos meus filhos, Felipão e Leozinho. Sempre foi por vocês. Felipe, obrigada por me ensinar a ser forte. Leonardo, obrigada por me ajudar a me reencontrar e acalmar o coração da mamãe. Vocês me fazem melhor.

Mamãe e Papai, obrigada pelo apoio incondicional e incentivo de sempre para que eu voasse alto. Obrigada também pela ajuda com os meus pequenos para que eu conseguisse me dedicar ao doutorado, principalmente nessa reta final.

Patrícia e André, obrigada pela oportunidade de ter feito Iniciação Científica e esse primeiro passo me conduziu até aqui. Obrigada pelo conhecimento passado, pelas orientações, apoio e amizade.

Aos ICs, Mary, Matheus e Sara, foi uma honra trabalhar com vocês. Obrigada pela dedicação e por ter sido momentos leves. Cresci muito trabalhando com vocês.

Aos amigos e colegas do LBMFP e LabMib, obrigada pela convivência, por fazerem do nosso ambiente de trabalho um lugar tranquilo, pela ajuda sempre que necessárias e pelas boas conversas e risadas. A professora Ildinete por me acolher em seu laboratório e me ceder espaço e insumos para poder trabalhar.

As minhas amigas, obrigada pela torcida, pela presença, pelo carinho, pelos momentos bons,... serviram de combustível para essa fase. Só gratidão!

Aos professores Aldo Tavares, Camila Freitas, Amanda Rocha e Jhones Dias obrigada por aceitarem o convite e dedicarem um tempo para avaliar esse trabalho.

As agências de financiamento Capes, FAP-D e a Universidade de Brasília pelo auxílio financeiro e por viabilizarem esse projeto.

## Resumo

*Cryptococcus* spp é um fungo patogênico que pode causar doença em humanos e outros mamíferos. As duas principais espécies patogênicas humanas desse gênero são *C. neoformans* e *C. gattii*. É considerado um patógeno oportunista, pois acomete na maioria das vezes pacientes com sistema imunológico comprometido, principalmente indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Em ambas as espécies, a infecção se dá por meio da inalação de propágulos do agente disperso no ar como esporos ou leveduras desidratadas. Ao chegar no pulmão o fungo vai se instalar podendo ou não levar ao desenvolvimento da doença, ou pode se espalhar para outros sítios anatômicos apresentando tropismo pelo sistema nervoso central. Para se estabelecer no hospedeiro, *Cryptococcus* spp precisa escapar do sistema imunológico do hospedeiro. Para isso ele possui alguns mecanismos de virulência como a sua cápsula de polissacarídeo, a habilidade de crescer a 37°C, produção de melanina e enzimas como fosfolipases, urease e proteases. Esse fungo também é considerado um patógeno intracelular facultativo, uma vez que é capaz de parasitar e se reproduzir em macrófagos do hospedeiro, resistindo às atividades microbidas dessas células. Os macrófagos são as principais células imunes na resposta a infecção por *Cryptococcus* spp. Na sua interação com essas células, pode ocorrer a destruição do fungo, a ruptura do macrófago e liberação dos fungos que se replicaram no seu interior, ou o fenômeno de exocitose não-lítica. A partir da necessidade de se entender melhor a relação entre o patógeno e o hospedeiro, esse trabalho teve como objetivo avaliar a interação de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp com os macrófagos bem, como avaliar a expressão *in vitro* de alguns de seus fatores de virulência. Nossos resultados demonstraram bastante variabilidade na expressão dos fatores de virulência estudados (atividade de urease e fosfolipase), bem como na capacidade de sobreviver à interação com macrófagos. Observamos uma correlação positiva entre o índice fagocítico e a capacidade do isolado em sobreviver à interação com macrófagos. Também observamos uma possível correlação entre a taxa de replicação do fungo e o processo de exocitose não-lítica, no entanto não observamos uma correlação entre a sobrevivência dos pacientes e o processo de exocitose não-lítica. Conseguimos estabelecer um método mais quantitativo para avaliar a atividade de urease entre os isolados, em que podemos avaliar não só a capacidade do fungo de produzir essa enzima, mas também a cinética de produção dessa atividade. Observamos

que a maior parte dos isolados clínicos apresentou uma cinética de produção dessa atividade significativamente diferente e mais lenta que a da linhagem padrão *C. neoformans* H99, e que em algumas linhagens a produção dessa atividade foram bastante parecidas com de mutantes para urease. Nossos dados reforçam a necessidade de melhor caracterização de isolados clínicos, uma vez que a expressão de fatores de virulência e sua interação com o hospedeiro pode variar bastante em relação às linhagens padrão do fungo.

Palavras-chaves: *Cryptococcus*, Fatores de virulência, urease, fosfolipase, interação macrófago-fungo, Isolados Clínicos.

## **Abstract**

*Cryptococcus* spp is a pathogenic fungus that can cause disease in humans and other mammals. The two main human pathogenic species of this genus are *C. neoformans* and *C. gattii*. It is considered an opportunistic pathogen, as it most often affects patients with compromised immune systems, especially individuals with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). In both species, infection occurs through the inhalation of propagules of the agent dispersed in the air as spores or dehydrated yeasts. When it reaches the lungs, the fungus will settle in and may or may not lead to the development of the disease, or it may spread to other anatomical sites with tropism for the central nervous system. In order to establish itself in the host, *Cryptococcus* spp needs to escape the host's immune system. For this, it has some virulence mechanisms such as its polysaccharide capsule, the ability to grow at 37°C, melanin production and enzymes such as phospholipases, ureases and proteases. This fungus is also considered a facultative intracellular pathogen, since it is able to parasitize and reproduce in host macrophages, resisting the microbicide activities of these cells. Macrophages are the main immune cells in the response to infection by *Cryptococcus* spp. In their interaction with these cells, destruction of the fungus, rupture of the macrophage and release of the fungi that have replicated inside, or the phenomenon of non-lytic exocytosis can occur. Based on the need to better understand the relationship between the pathogen and the host, the aim of this study was to evaluate the interaction between clinical isolates of *Cryptococcus* spp. and macrophages and to assess the in vitro expression of some of their virulence factors. Our results demonstrated significant variability in the expression of the studied virulence

factors, as well as in the ability to survive interaction with macrophages. We observed a positive correlation between the phagocytic index and the ability of the isolate to survive interaction with macrophages. Additionally, we noted a potential correlation between the fungal replication rate and the process of non-lytic exocytosis. However, no correlation was observed between patient survival and the non-lytic exocytosis process. We successfully established a more quantitative method to evaluate urease activity among the isolates, allowing us to assess not only the fungus's ability to produce this activity but also the kinetics of its production. Most clinical isolates displayed a significantly different and slower kinetic profile for urease activity production compared to the standard *C. neoformans* H99 strain. In some isolates, the production of this activity closely resembled that of urease mutants. Our data highlight the need for better characterization of clinical isolates, as the expression of virulence factors and their interaction with the host can vary greatly compared to standard fungal strains.

Keywords: *Cryptococcus*, Virulence factors, urease, phospholipase, macrophage-fungus interaction, Clinical isolates.

## Lista de figuras

Figura 1:Esquema do Processo de Infecção por <i>Cryptococcus</i> spp.. .....	15
Figura 2:Fatores que contribuem para a infecção e o resultado da criptococose.....	16
Figura 3: PRRs presentes nas células imunes do hospedeiro e seus respectivos PAMPs fúngicos. ....	19
Figura 4: Morte criptocócica de células dendríticas e apresentação de antígeno. ....	21
Figura 5: Esquema de parasitismo do <i>Cryptococcus neoformans</i> em macrófago.....	23
Figura 6: Esquema de análise da videomicroscopia para avaliação de eventos de Exocitose não lítica.....	37
Figura 7: perfil dos pacientes com criptococose atendido pela rede pública do Distrito Federal .....	53
Figura 8: Ocorrência de exocitose não lítica dos isolados.....	56
Figura 9: Avaliação da atividade de Fosfolipase pelos isolados.....	63
Figura 10: Teste piloto para avaliação da atividade de urease.....	65
Figura 11: Correlação entre o tempo de crescimento dos isolados e a ocorrência de exocitose não lítica na interação de isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> e macrófagos. ....	70

## Lista de tabela

Tabela 1: Fatores de risco para Criptococcose .....	54
Tabela 2: Avaliação de exocitose não lítica por videomicroscopia .....	56
Tabela 3: Comparativo da videomicroscopia da cepa H99 no microscópio invertido Ziess x EVOS.....	58
Tabela 4: Correlação com a Sobrevivência de pacientes com Criptococcose do Distrito Federal .....	59
Tabela 5: Avaliação da interação Macrófagos- <i>Cryptococcus</i> .....	60
Tabela 6: Correlação da ocorrência de exocitose não lítica com fagocitose e sobrevivência do fungo após a interação .....	61
Tabela 7: Correlação da ocorrência de exocitose não lítica com produção de enzimas	64
Tabela 8: Avaliação da atividade de urease dos isolados clínicos .....	66
Tabela 9: Correlação da ocorrência de exocitose não lítica com produção de melanina e atividade de lacase.....	69
Tabela 10: Correlação da ocorrência de exocitose não lítica com crescimento fúngico	69

## Lista de abreviações

%: por cento	LAT: Teste de aglutinação em látex
µg: Micrograma	LBMFP: Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Patogênicos
µL: Microlitro	LFA: Exame imunocromatográfico de fluxo lateral
5-FC: Flucitosina	MC: meio condicionado
AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	MHC-II: Complexo Principal de Histocompatibilidade do tipo II
AmB: Anfotericina B	MI: mililitro
APCs: células apresentadoras de antígenos	mM: milimolar
CAP67: <i>Cryptococcus</i> mutante acapsular	MOI: índice de infecção
CD206: Grupo de diferenciação 206	MP: manoproteínas
CD4: Grupo de diferenciação 4	NKs: Natural Killers
CD80/86: Grupo de diferenciação 80/86	NO: Nitrogênio
CDs: Células dendríticas	°C: Graus Celsius
CFU: Unidade Formadora de Colônia.	OMS: Organização Mundial da Saúde
CLRs: Receptor de lectina do tipo C	PAMPs: Padrão molecular associado ao patógeno
CO <sub>2</sub> : Dióxido de Carbono	PBS: Solução Tampão Fosfato
CrAg: Antígeno criptocócica	pH: Potencial hidrogeniônico
DF: Distrito Federal	plb1Δ: <i>Cryptococcus</i> mutante para o gene da fosfolipase b1
DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco	PRR: Receptor de reconhecimento de padrão
DNA: Acido desoxido ribonucleico	Pz: índice de atividade de fosfolipase
EIA: Imunoensaio enzimático	RCB: Rede Criptococose Brasil
Erg11: enzima 1-4-α-demetilase	ROS: Espécies reativas de oxigênio
FTZ: Fluconazol	RPM: rotação por minuto
G: Força G	RPMI: Meio Roswell Park Memorial Institute
g: Grama	SFB: Soro Fetal Bovino
GXM: Glucuroxilomanano	SNC: sistema nervoso central
GXMGal: glucuronoxilomanogalactano	TLR2: Receptor do tipo Toll 2
HIV: Vírus da imunodeficiência Humana	TLR4: Receptor do tipo Toll 4
IL-12: Interleucina 12	TLR9: Receptor do tipo Toll 9
IL-13: Interleucina 13	TNF-α: Fator de necrose tumoral α
IL-4: Interleucina 4	UCB: Universidade Católica de Brasília
IL-8: Interleucina 8	UnB: Universidade de Brasília
iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzível	ure1Δ: <i>Cryptococcus</i> mutante para o gene da urease
ITZ: Intraconazol	UV: Ultravioleta
LabMIB: Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Biotecnologia	
Lacen-DF	

# Sumário

Introdução.....	12
<i>Cryptococcus</i> .....	12
Criptococose.....	14
Imunidade da Criptococose .....	18
Exocitose não lítica (Vomocitose) .....	24
Transferência lateral.....	26
Fatores de virulência interferindo na interação com o macrófago.....	27
Cápsula .....	27
Melanina.....	28
Termotolerância .....	29
Enzimas.....	30
Rede Criptococose Brasil .....	31
Justificativa .....	32
Objetivo .....	33
Geral .....	33
Específicos.....	33
Materiais e métodos .....	34
Meios e soluções .....	34
DMEM .....	34
Meio mínimo.....	34
Sabouraud.....	34
Emulsão de Gema de Ovo (EGO).....	34
Meio Agar Fosfolipase.....	35
Meio Ureia de Roberts 2x.....	35

PBS .....	35
Células .....	35
Isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> . .....	35
J774.A1 .....	36
Experimentos .....	37
Avaliação da interação de macrófagos com <i>Cryptococcus</i> .....	37
Taxa de fagocitose .....	38
Sobrevivência do <i>Cryptococcus</i> após interação .....	39
Avaliação da produção de enzimas .....	40
Resultados .....	43
Capítulo 1: .....	43
Laccase Affects the Rate of <i>Cryptococcus neoformans</i> Nonlytic Exocytosis from Macrophages .....	43
Capítulo 2: .....	52
Avaliação de exocitose não lítica do isolados clínicos de <i>Cryptococcus spp</i> .....	55
Correlação com a sobrevivência dos pacientes com criptococose do Distrito Federal .....	58
Correlação entre interações macrófago- <i>Cryptococcus</i> .....	59
Correlação entre fatores de virulência e demais fatores de virulência. ....	62
Discussão .....	70
Conclusão .....	74
Artigos publicados .....	76
Referências Bibliográficas .....	78

# Introdução

## *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* engloba mais de 30 espécies de leveduras pertencentes ao filo basidiomicota (MAZIARZ; PERFECT, 2016), entre essas encontramos os complexos *C. neoformans* e *C. gattii* sendo os principais fungos desse grupo envolvidos em doenças em seres humanos. Apesar dessas duas espécies serem frequentemente associadas à doença em seres humanos, existem relatos de infecções por outras espécies tais como *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. uniguttulatus* entre outras (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007). As doenças causadas pelas espécies *C. neoformans* e *C. gattii* diferem de maneira importante em relação à sua distribuição geográfica, epidemiologia e manifestações clínicas (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007). De maneira geral, os pacientes infectados por *C. neoformans* geralmente apresentam alguma imunodeficiência mais severa, sendo a principal delas a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (SPEED; DUNT, 1995) e a doença em geral se manifesta sob a forma de meningites e meningoencefalites, haja vista que essa espécie tem uma predileção pelo sistema nervoso central (SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014). Doenças causadas por *C. gattii*, por sua vez, são mais associadas a pacientes imunocompetentes e frequentemente resultam em pneumonias (BIELSKA; MAY, 2016).

No meio ambiente, *Cryptococcus* é facilmente encontrado em fezes de pombos (*Columba livia*) e outras aves, restos vegetais em decomposição e em cascas de árvores vivendo de maneira saprofítica (EMMONS, 1955). Fungos desse gênero são capazes de adaptar-se facilmente a diversas condições, o que favorece sua sobrevivência a diferentes adversidades ambientais -como temperatura, pouca disponibilidade de água e nutrientes, interação com predadores presentes no solo e também com o sistema imunológico de diferentes hospedeiros (BARNETT, 2010; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014). Essa adaptação se dá graças a uma gama de fatores de virulência como sua capacidade de sobreviver/crescer a 37°C, a presença de uma cápsula polissacarídica, produção de melanina, e enzimas como a fosfolipase e a urease entre outros. E acredita-se que a pressão seletiva desses fatores de virulências dá-se

pela interação do *Cryptococcus* com amebas e microrganismos presentes no solo e no meio ambiente (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

No hospedeiro, fungos desse gênero são extremamente eficientes em perceber o ambiente no qual está inserido e ativar mudanças fenotípicas que permitam a sua sobrevivência/proliferação nos tecidos do hospedeiro. Podendo causar desde infecções pulmonares assintomáticas até infecções graves no sistema nervoso central (BIELSKA; MAY, 2016; BUCHANAN; MURPHY, 1998). Acredita-se que a maioria dos indivíduos tenha entrado em contato com esse fungo, mas seja capaz de conter a infecção e dessa maneira não desenvolvam doença. Em um estudo feito com crianças em Nova York demonstrou que a maioria das crianças com 2 anos testadas apresentaram sorologia positiva para *Cryptococcus*, demonstrando que apesar da deficiência em diagnósticos a sorologia para *Cryptococcus* é prevalente na população em geral. Esses achados apoiam a hipótese de que as pessoas são infectadas na infância e o fungo permanece latente no organismo, e quando há uma imunossupressão o fungo seja capaz de se reativar e causa a doença (GOLDMAN et al., 2001). Outro dado que corrobora com essa hipótese é, por exemplo, de um estudo de pacientes europeus e expatriados africanos que estavam vivendo na França em média 110 meses sem contato com o continente de origem e foram diagnosticados com criptococose. Foram feitos testes moleculares dos isolados provenientes desses pacientes que demonstraram que os isolados advindos dos pacientes africanos eram semelhantes entre si e diferentes dos europeus concluindo que os isolados eram provenientes de uma primo-infecção que provavelmente aconteceu muito tempo antes da manifestação da doença (GARCIA-HERMOSO; JANBON; DROMER, 1999). Além disso, possuir anticorpos anti-Cn independente de uma imunossupressão é bem comum (DESHAW; PIROFSKI, 1995; DROMER et al., 1988).

Dessa maneira, especialmente os fungos da espécie *C. neoformans* são frequentemente considerados patógenos oportunistas porque o maior número de casos dessa doença acontece em indivíduos imunocomprometidos. O principal grupo de risco são pacientes positivos para o vírus da imunodeficiência humana (em sua sigla em inglês HIV) (COGLIATI, 2013; KON et al., 2008; LIMA; KLAFKE; XAVIER, 2016; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014), sendo o diagnóstico de criptococose um dos critérios definidores de AIDS (COGLIATI, 2013). Outros grupos de risco incluem pacientes em tratamento com imunossupressores, como os transplantados, e em

tratamento com quimioterápico antineoplásicos. Todos esses quadros resultam em uma deficiência importante da imunidade celular desses pacientes, a qual é crucial para a proteção do organismo frente ao agente, explicando por que indivíduos imunocomprometidos são mais susceptíveis e apresentam quadros clínicos mais severos (DROMER et al., 2014).

De acordo com Rajasinghan e colaboradores (2022), estima-se que mundialmente, a criptococose é responsável por 19% das mortes relacionadas à AIDS. A prevalência global de antigenemia positiva para criptococose seria de 4,4% entre das pessoas HIV+ com contagem de CD4 abaixo de 200 células/ $\mu$ l, correspondendo a 179.000 casos de antigenemia positiva para esse fungo globalmente em 2020. Segundo as estimativas desse grupo seriam cerca de 152.000 casos de meningite criptocócica anualmente resultando em 112.000 mortes relacionadas a criptococose (RAJASINGHAM et al., 2022). De acordo com esse grupo, esses números provavelmente ainda são um reflexo da falta de diagnóstico e tratamento eficiente em muitos países, pois geralmente os pacientes com criptococose demoram para receber um diagnóstico definitivo, o que por sua vez atrasa o início de um tratamento adequado prejudicando o êxito da terapêutica e muitas vezes resultando no óbito desses indivíduos (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; LEOPOLD WAGER et al., 2016).

Uma das principais características desses fungos é a presença de uma cápsula de polissacarídeo. A presença dessa cápsula ajuda na sua identificação, pois pode ser vista facilmente com auxílio de um microscópio usando a coloração com tinta nanquim. Também é considerada um de seus principais fatores de virulência, pois desempenha um papel importantíssimo evitando o reconhecimento desse patógeno pelo sistema imunológico do hospedeiro e desempenhando diferentes papéis imunomodulatórios (MCFADDEN et al., 2007).

## **Criptococose**

A infecção se dá pela inalação de leveduras ou esporos de *Cryptococcus* que estão dispersos no ar. Quando esses chegam ao pulmão, eles assumem sua forma leveduriforme e se instalam nesse sítio anatômico, podendo ou não resultar no

desenvolvimento da enfermidade (BIELSKA; MAY, 2016; COGLIATI, 2013; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014). Para a manifestação da patologia há uma série de fatores relacionados tanto com o hospedeiro quanto com o agente (Figura 2) (MONTROYA; MAGWENE; PERFECT, 2021). O pulmão é o órgão primário de infecção do *Cryptococcus*, mas a partir dele pode se disseminar para diversos outros órgãos. *Cryptococcus neoformans* tem predileção ao sistema nervoso central, por isso tem uma tendência de seguir para uma infecção disseminada com fungemia e meningoencefalites. Por outro lado, as infecções por *C. gattii* não tentem a espalhar e geralmente resultam em quadro de pneumonia (BIELSKA; MAY, 2016).

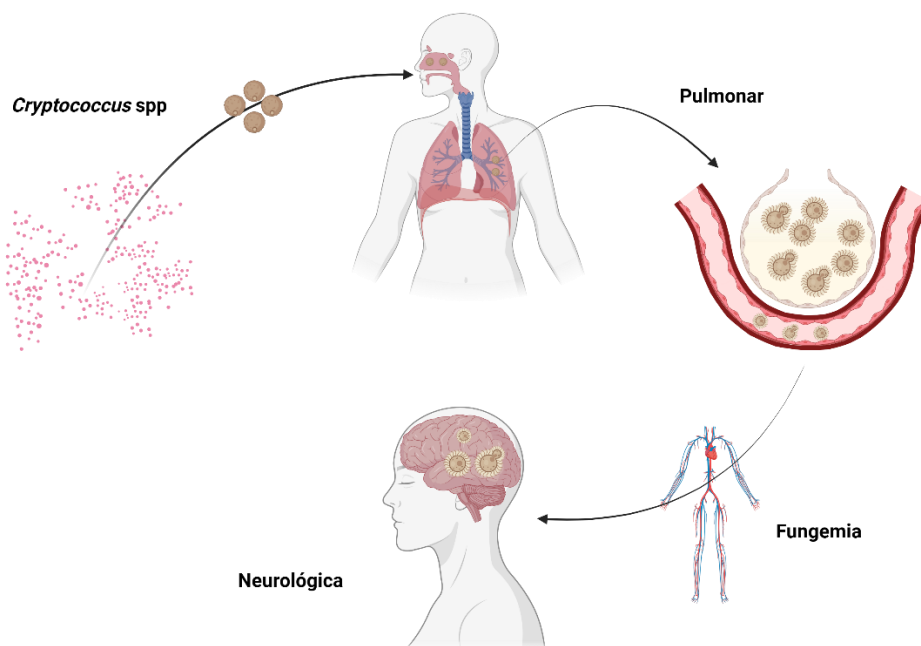


Figura 1: Esquema do Processo de Infecção por *Cryptococcus* spp. A infecção se dá pela inalação de propágulos do agente permitindo que o fungo se instale no pulmão, a infecção pode se limitar ao pulmão ou atingir a corrente sanguínea e alcançar outros tecidos, principalmente do Sistema Nervoso.

Para que se estabeleça a infecção, características do sistema imunológico do hospedeiro, a interação do *Cryptococcus* com macrófagos, bem como características fenotípicas dos isolados que permitam sua sobrevivência e proliferação nos tecidos do hospedeiro são fatores importantes nos possíveis resultados da infecção por esse fungo. Podendo ocorrer 3 desfechos: 1. Eliminação do patógeno; 2. Formação de granulomas que irão conter o fungo que permanecerá latente ou 3. O fungo ficará em sua forma ativa

podendo levar a manifestações clínicas e desenvolvimento da doença (SABIITI et al., 2014).



Figura 2: Fatores que contribuem para a infecção e o resultado da criptococose. Adaptado de (MONTROYA; MAGWENE; PERFECT, 2021)

As manifestações clínicas podem ser classificadas em neurológicas e pulmonares. Os sintomas pulmonares mais comuns são tosse, dispneia e febre. Os sintomas neurológicos incluem aumento da pressão intracraniana, vômito, convulsões, cefaleia, rigor motriz, fotofobia, alteração da acuidade visual, alterações auditivas, e alterações no estado mental. Alguns pacientes podem ter uma infecção pulmonar em curso, mas não desenvolvem sintomas. Nesses pacientes a doença geralmente cursa com uma fungemia e disseminação para o sistema nervoso central, local onde vão aparecer os sintomas. Exames de imagem podem revelar a presença de nódulos pulmonares ou abscessos cerebrais contendo o fungo nesses pacientes. O aumento da carga fúngica, bem como a resposta a ativação do sistema imunológico e o dano tecidual podem levar o aumento da pressão intracraniana resultando nos sintomas acima

mencionados (BICANIC et al., 2009; DENNING et al., 1991; MONTOYA; MAGWENE; PERFECT, 2021). Além dessas têm as manifestações clínicas cutâneas, sendo rara e geralmente uma infecção causada por inoculação direta das leveduras apresentando lesões limitadas. A infecção de próstata geralmente é assintomática sendo considerado um reservatório para recidiva da doença. As infecções oculares podem resultar em paralisia ocular e papiledema podendo levar a cegueira irreversível (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou diretrizes que preconizam um diagnóstico precoce e rápido para um tratamento mais eficaz. Desde 2011 passou-se a utilizar o exame imunocromatográfico de fluxo lateral (LFA) que utiliza o antígeno criptocócico (CrAg). Trata-se de um teste rápido que detecta antígeno capsular do *Cryptococcus* presente na amostra do paciente, que podem ser líquido, plasma, sangue, soro. Possui a vantagem de não haver necessidade de uma ampla infraestrutura laboratorial com pessoal altamente qualificado, ser rápido e de baixo custo e possuir alta sensibilidade e especificidade (KABANDA et al., 2014; KIM, 2016; PRATTES et al., 2016). Para diagnóstico de meningites criptocócicas a detecção de CrAg LFA no líquido é altamente sensível e específica, além de ser possível correlacionar a titulação do ensaio com a carga fúngica e o prognóstico do paciente (KABANDA et al., 2014; TRACHTENBERG et al., 2007). Além do LFA, têm o teste de aglutinação em látex (LAT) e Imunoensaio enzimático (EIA), que também detectam CrAg (SONG; LIANG; LIU, 2020).

Segundo a OMS, o tratamento é realizado em três fases: indução, consolidação e manutenção, utilizando os fármacos Anfotericina B (AmB), Fluconazol (FTZ), Intraconazol (ITZ) e a Flucitosina (5-FC) que podem ser utilizados sozinhos ou em combinações. Porém a Flucitosina só mais recentemente tem sido incorporada aos tratamentos aqui no Brasil (LOFGREN et al., 2017; VAIDHYA et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). A AmB é o antifúngico de primeira escolha no tratamento, mas é altamente nefrotóxico e hepatotóxico o que leva à necessidade de internação hospitalar para os pacientes em tratamento. Existem duas apresentações farmacêuticas da AMB, a AmB deoxicolato, mais barata e com maiores chances de efeitos colaterais e uma forma lipossomal que reduz esses efeitos tóxicos, mas que é ainda de alto custo. Como mecanismos de ação, a AmB interage com ergosterol, que é

uma molécula específica da membrana plasmática de fungos, culminando na formação de poros na membrana fúngica (GROSSMAN; CASADEVALL, 2017; HENAO-MARTÍNEZ; CHASTAIN; FRANCO-PAREDES, 2018; NEMATOLLAHI; DIOVERTI-PRONO, 2020). O FCZ e ITZ são da classe dos azóis. Eles atuam na enzima 1-4- $\alpha$ -demetilase (Erg11), que pertence a via de biossíntese de ergosterol, gerando o acúmulo de precursores tóxicos e reduzindo a biodisponibilidade do ergosterol (ANDES, 2013). A baixa disponibilidade de fármacos para o tratamento da criptococose e outras doenças fúngicas tem levado ao aumento no número de falhas terapêuticas, evoluir para óbito do paciente, além da dificuldade do tratamento de cepas resistentes (ARASTEHFAR et al., 2020; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

## Imunidade da Criptococose

Quando *Cryptococcus* invade o organismo humano, o sistema imunológico é responsável por identificá-lo e por montar uma resposta protetora efetiva, a qual é principalmente mediada por células. Haja vista que pacientes cuja imunidade celular esteja comprometida apresentam uma predisposição para desenvolver a criptococose. As principais células efetoras em uma resposta imune protetora contra o fungo são as células dendríticas, os macrófagos e os neutrófilos (VOELZ; MAY, 2010).

Para que ocorra uma resposta pelo sistema imunológico, primeiramente o patógeno tem que ser reconhecido como não próprio. *Cryptococcus* possui diversos Padrões Moleculares Relacionados ao Patógenos (PAMPs), que poderiam ser reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão (PRR) das células imunológicas do hospedeiro, porém ele possui uma cápsula de polissacarídeos que esconde esses PAMPs dificultando a ligação deles com os receptores PRR. Como exemplo desses PAMPs, temos a  $\beta$ -glucana, um carboidrato presente na parede celular do fungo é reconhecido pelo receptor de lectina do tipo c (CLRs) - Dectin-1 (GILES et al., 2009). Os resíduos de manana presentes na cápsula são reconhecidos pelos receptores Dectina-2, DC-SIGN e o receptor de manose CD206 (HARDISON; BROWN, 2012; MANSOUR; LATZ; LEVITZ, 2006). O GXM que está presente na cápsula do *Cryptococcus* é reconhecido por dois receptores do tipo Toll, o TLR2 e TLR4, e Dectina-3 (SHOHAM et al., 2001; YAUCH et al., 2004; YAUCH; MANSOUR; LEVITZ, 2005

HUANG et al., 2018). O DNA fúngico é reconhecido principalmente pelo receptor endossomal TLR9, também um receptor do tipo Toll (KASPERKOVITZ et al., 2011; LEOPOLD WAGER et al., 2016).

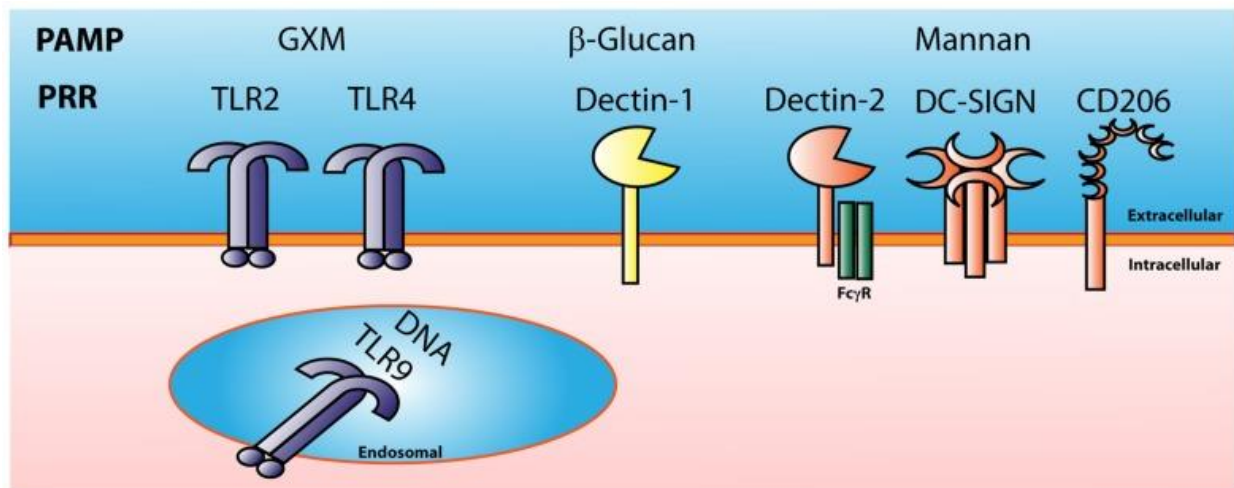


Figura 3: PRRs presentes nas células imunes do hospedeiro e seus respectivos PAMPs fúngicos. Fonte:(LEOPOLD WAGER et al., 2016)

Apesar do fungo poder ser reconhecido por meio de seus PAMPs, a cápsula desempenha um importante papel evitando esse reconhecimento. Dessa maneira, *in vitro* a fagocitose de células de *Cryptococcus* só acontece de maneira eficiente na presença de opsoninas. Normalmente são usadas moléculas do sistema complemento, ou anticorpos específicos para a cápsula de *Cryptococcus*. Quando o fungo é opsonizado por moléculas do sistema complemento, essas moléculas são reconhecidas por receptores do CR na superfície do fagócito que vão induzir sua internalização. Por sua vez a internalização do fungo quando mediada por anticorpo pode acontecer tanto por meio de receptores Fc na superfície do fagócito quando por meio de alterações estruturais na superfície do fungo que permitem a exposição de moléculas que podem ser reconhecidas pelos receptores de complemento CR3 ou CR4 mesmo na ausência de moléculas do complemento (LEOPOLD WAGER et al., 2016; TABORDA; CASADEVALL, 2002; VOELZ; MAY, 2010).

As células dendríticas (CDs) são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs), elas estão distribuídas em todos os tecidos no organismo e ficam como sentinelas do sistema imunológico. Na criptococose, elas fagocitam o fungo, processam diferentes antígenos e apresentam esses componentes via Complexo

Principal de Histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) e expressão de moléculas coestimuladoras como CD80/86 e secreção de IL-12 e TNF- $\alpha$  para Linfócitos T, ativando-os e induzindo uma resposta adaptativa (BAUMAN; HUFFNAGLE; MURPHY, 2003; BAUMAN; NICHOLS; MURPHY, 2000; WOZNIAK; LEVITZ, 2008; WOZNIAK; VYAS; LEVITZ, 2006). A fagocitose pelas CDs é iniciada pela opsonização por anticorpos anticapsulares ou complemento, uma vez que a cápsula criptocócica esconde os PAMPs evitando a fagocitose (KELLY et al., 2005). Assim como os macrófagos, as CDs são as principais iniciadoras da resposta celular protetora (BAUMAN; NICHOLS; MURPHY, 2000; OSTERHOLZER et al., 2009).

CCR2 é um receptor de quimiocinas inflamatórias e desempenha um papel importante na maturação de células dendríticas e na posterior geração de uma resposta protetora para *C. neoformans*. Em camundongos mutantes para o gene CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>) o recrutamento de DCs para os pulmões é prejudicado, a migração de outras células do sistema imunitário para os pulmões é diminuída e o camundongo desenvolve uma resposta imune do tipo Th2 que não é protetora contra a infecção por esse fungo (OSTERHOLZER et al., 2008). Uma resposta adaptativa protetora para o fungo normalmente envolve uma resposta com polarização Th1 que induz o recrutamento e ativação de linfócitos e fagócitos para uma resposta imune anti-criptocócica eficaz (WOZNIAK et al., 2012). Por sua vez pacientes com uma polarização Th2 tendem a apresentar sintomas mais intensos (DECKEN et al., 1998).

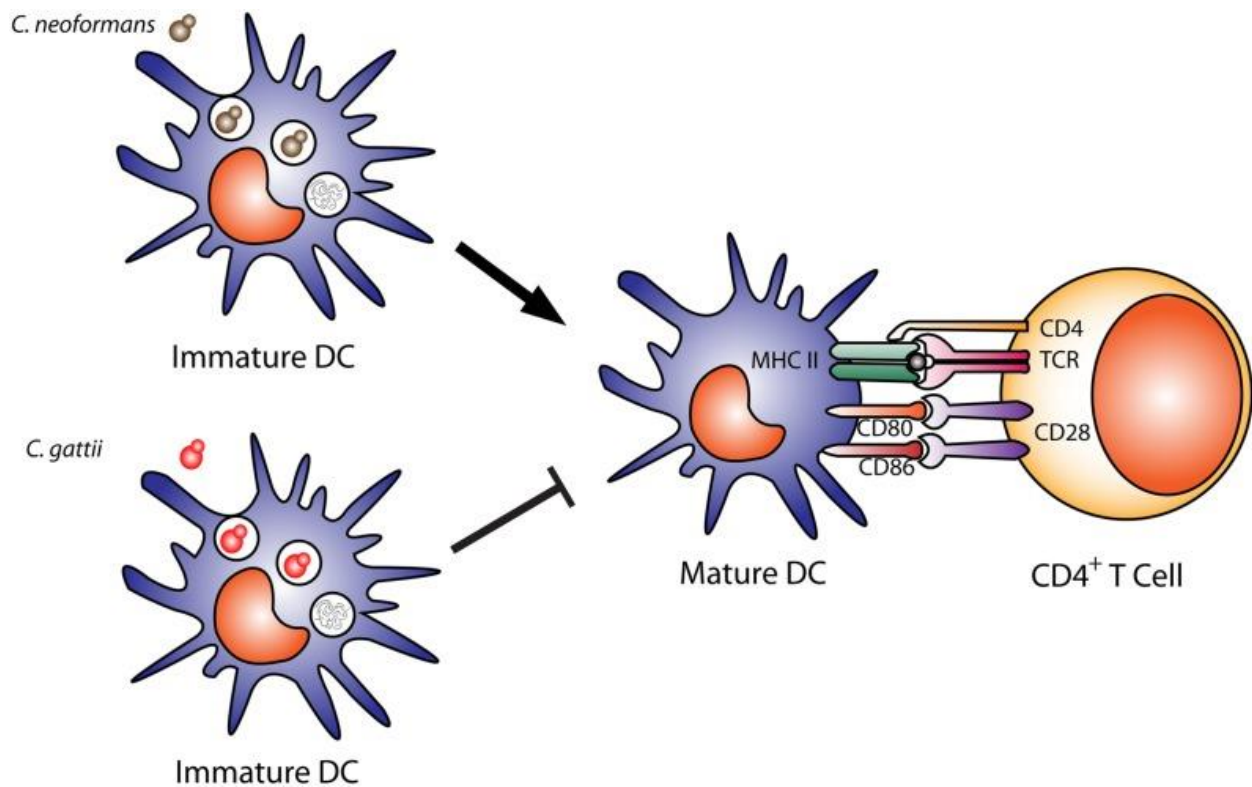
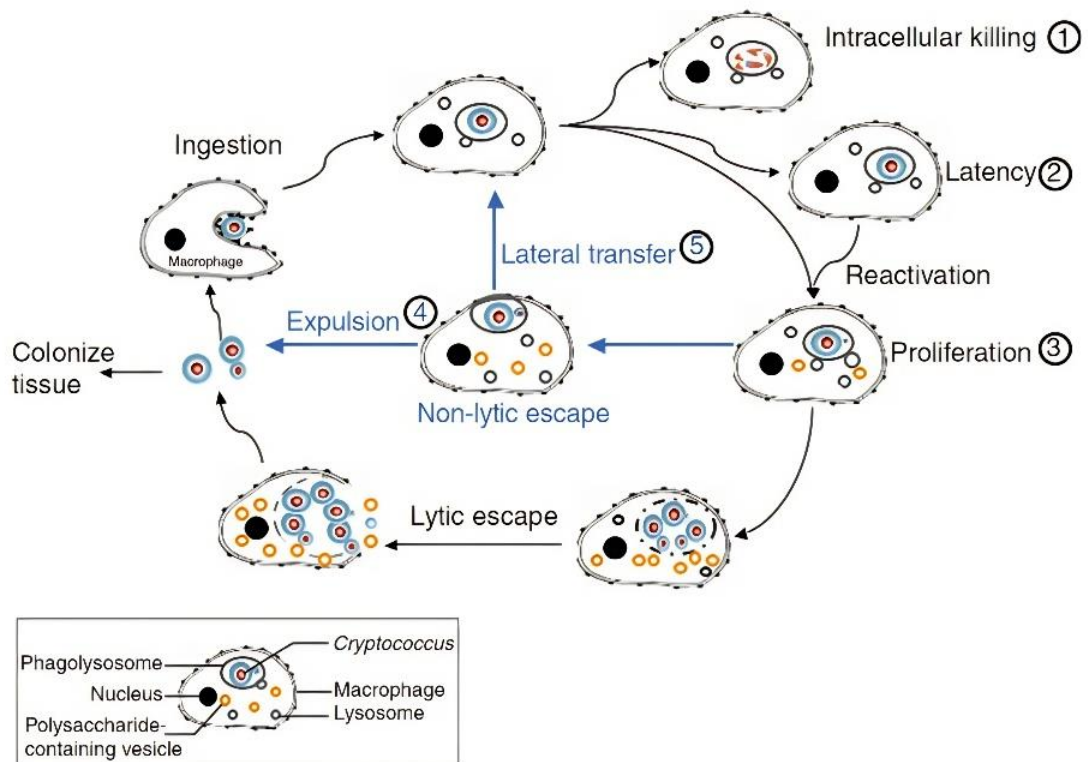


Figura 4: Morte criptocócica de células dendríticas e apresentação de antígeno. Células dendríticas imaturas fagocitam e matam eficientemente células opsonizadas de *Cryptococcus neoformans*, levando à maturação das DCs, demonstrada pela regulação positiva de moléculas coestimuladoras (MHC II, CD80, CD86) e apresentação de antígeno às células T CD4<sup>+</sup>. Em contraste, *C. gattii* também pode ser fagocitado e morto por DCs, mas leva a uma regulação negativa da maturação das DC e da expressão de moléculas coestimuladoras MHC II, CD80, CD86 e reduz a apresentação de antígeno às células T. Fonte (LEOPOLD WAGER et al., 2016)

Entre as células mais importantes na imunidade tanto inata quanto adaptativa contra esse fungo encontramos os macrófagos. Na criptococose, eles estão na linha de frente e são umas das primeiras células a responder e se iniciar uma resposta frente ao patógeno. Quando os macrófagos alveolares reconhecem o *Cryptococcus*, eles o fagocitam e são capazes de apresentar o antígeno para linfócitos T e ativá-los induzindo assim uma resposta adaptativa (GILES et al., 2009). Diversos estudos demonstram a importância dos macrófagos para o controle da infecção, tanto com dados clínicos, *in vitro* e *in vivo* e deficiências na ativação, proliferação e sinalização dos macrófagos aumentam os riscos para o desenvolvimento de uma infecção criptocócica disseminada (CAMPUZANO et al., 2020; LEOPOLD WAGER et al., 2014; VIOLA et al., 2021; WAGER et al., 2015).

A polarização do macrófago é crucial para uma resposta eficaz. Quando os macrófagos são estimulados por citocinas inflamatórias, como Interferon- $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ) produzido por células Th1, células Natural Killers (NKs) e APCs, ocorre sua polarização para um perfil M1. A polarização dos macrófagos para um perfil M1 tem efeito fungicida com uma robusta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO) por meio da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que atua no substrato L-arginina (HARDISON et al., 2010, 2012). Esses produtos têm ação antifúngica. Essas moléculas ajudam a controlar a infecção por *Cryptococcus*. Camundongos deficientes para a iNOS ou tratados com inibidores para esta enzima não conseguem inibir o crescimento intracelular de *C. neoformans*, mesmo que haja uma produção de ROS normal. Demonstrando que durante a infecção, quem tem o papel fungicida central no interior dos macrófagos M1 é a atividade NO e não do ROS (WAGER et al., 2015). De maneira contrária os macrófagos com perfil M2 são relacionados a uma resposta anti-inflamatória e a persistência e replicação intracelular do fungo nessas células (BASSO et al., 2020; WOZNIAK et al., 2012). A polarização deles é induzida por interleucinas IL-4 e IL-13, que são anti-inflamatórias. Os macrófagos M2 ajudam na supressão e regulação da resposta inflamatória importante para cicatrização. Na criptococose, apesar de os macrófagos M2 fagocitarem as leveduras de forma eficiente, não são capazes de eliminá-los levando a uma maior susceptibilidade a infecção (ARORA et al., 2011).

Após a internalização das leveduras, a depender das condições fisiológicas do hospedeiro e do seu perfil de ativação dos macrófagos, podemos observar cinco desfechos diferentes para essa interação: 1) a morte do fungo pelo macrófago, 2) a sobrevivência do fungo dentro do macrófago em um estado latente cujo crescimento poderá ser reativado posteriormente, 3) a proliferação do fungo no interior do macrófago levando à lise da célula hospedeira, 4) a expulsão da(s) célula(s) fúngica(s) para o meio extracelular sem que ocorra morte nem do fungo, nem da célula hospedeira por meio do processo de exocitose não lítica ou 5) a transferência lateral da célula fúngica para outro macrófago (MA; MAY, 2009).



2009. Virulence in Cryptococcus Species. Hansong Ma and Robin C. May

Figura 5: **Esquema de parasitismo do *Cryptococcus neoformans* em macrófago.** Após a internalização das células do fungo pelo macrófago podem acontecer: 1) a morte do fungo pelo macrófago, 2) o fungo pode permanecer latente no interior dessa célula podendo posteriormente reativar seu crescimento intracelular, 3) o fungo pode proliferar no interior do macrófago levando à lise do macrófago, ou 4) ser expulso do macrófago para o meio extracelular sem que ocorra morte de nenhuma das células pelo mecanismo de Exocitose não-lítica, ou 5) ser transferido lateralmente para outro macrófago. (MA; MAY, 2009)

Diferente de diversos patógenos, o *Cryptococcus* spp é capaz de sobreviver no fagolisossomo e se replicar (LEVITZ et al., 1997, 1999; SHOHAM; LEVITZ, 2005) e essa capacidade advém também de fatores de virulências que o *Cryptococcus* possui que podem interferir na maturação do fagolisossomo, na atividade proteolítica, perturbação da membrana do fagolisossomo, neutralização de ROS e NO (DAVIS et al., 2015; FU et al., 2018; SMITH; DIXON; MAY, 2015). E essa interação macrófago-*Cryptococcus* é essencial para a latência da infecção criptocócica e para que o patógeno consiga disseminar para além dos pulmões. Como já mencionado anteriormente, esse fungo tem um tropismo pelo sistema nervoso central, que conta com a barreira hematoencefalica que dificulta de forma significativa a entrada de patógenos nesse sistema. O ambiente dentro do macrófago é benéfico para o *Cryptococcus*, ele consegue se esconder do sistema imunológico e se reproduzir com segurança. Há um modelo chamado “cavalo de Tróia” que diz sobre a replicação do *Cryptococcus* no interior de macrófagos onde ele é

transportado pelo organismo sem causar ativação do sistema imunológico, podendo inclusive atravessar a barreira hematoencefálica e quando já está no sistema nervoso central ocorre transferência lateral ou exocitose não lítica (VOELZ; MAY, 2010).

### **Exocitose não lítica (Vomocitose)**

A exocitose não lítica é definida pela saída do *Cryptococcus* do interior do macrófago, de forma que ambas as células continuam viáveis após o evento. Essa observação foi descrita por dois grupos independentes em 2006. Embora o escape de patógenos de dentro dos fagócitos após a lise de células hospedeiras já fosse conhecido, esses trabalhos demonstraram pela primeira vez a saída de um patógeno de dentro do fagócito vivo sem que esse processo afetasse a viabilidade da célula hospedeira (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; MA et al., 2006). Esse processo foi descrito inicialmente em *Cryptococcus neoformans*, *C. gatti* e *C. grubii*, mas posteriormente foi demonstrado também durante a interação de fagócitos com outros fungos tais como *Candida krusei* (GARCÍA-RODAS et al., 2011) e *Candida albicans* (BAIN et al., 2012).

A ocorrência de exocitose não lítica foi observada pela primeira vez em linhagens imortalizadas de macrófagos murinos, J774 e RAW246.7 (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; MA et al., 2006), mas também foi observada em macrófagos primários de camundongos, humanos, aves e peixes (BOJARCZUK et al., 2016; JOHNSTON; VOELZ; MAY, 2016) e em hemócitos de *Galleria mellonella* (TREVIJANO-CONTADOR et al., 2015) e células S2 de *Drosophila melanogaster* (QIN et al., 2011). Demonstrando que o evento não é exclusivo de um tipo celular. De acordo com a hipótese de que a virulência de fungos de solo pode ter sido favorecida pela interação desses fungos com predadores como amebas, também se observa o processo de exocitose não-lítica na interação de amebas com *C. neoformans* (CHRISMAN; ALVAREZ; CASADEVALL, 2010), porém, diferente de macrófagos, as amebas possuem uma via de exocitose constitutiva para a liberação de materiais fagocitados que não são digeríveis (WATKINS et al., 2018).

Por ser um processo descoberto há razoavelmente pouco tempo, ainda existem várias dúvidas sobre a exocitose não lítica que precisam ser elucidadas, entre estas o

papel dos fagócitos e dos fungos nesse processo. E se esse processo seria mais vantajoso ou benéfico para o fungo ou para a célula hospedeira.

Para que ocorra a exocitose não lítica, é necessário que as células fúngicas estejam vivas, pois quando essas são substituídas por esferas de látex ou quando são usadas células fúngicas mortas ocorre o processo de fagocitose, mas a exocitose não-lítica não é observada, sugerindo que a célula fúngica viável desencadeie algum sinal que seja importante para que esse processo aconteça (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; MA et al., 2006). A presença de cápsula do fungo parece também ser importante. Células acapsulares de *C. neoformans* tem uma exocitose não lítica diminuída quando comparadas a células com cápsula (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006). Outros fatores fúngicos que parecem importantes são a presença da atividade de urease e a secreção de fosfolipase. Linhagens mutantes para fosfolipases (*plb1Δ*) e urease (*ure1Δ*) são hipovirulentas em murinos (COX et al., 2000, 2001) e apresentaram uma diminuição da ocorrência de exocitose não lítica *in vitro* (CHAYAKULKEEREE et al., 2011; FU et al., 2018). Assim como a falta de urease em células VBNC (Células viáveis, mas não cultiváveis) também levam a diminuição da ocorrência de exocitose não lítica (DE CASTRO et al., 2023). Recentemente nosso grupo também demonstrou que a presença da lacase, enzima essencial para a produção de melanina, desempenha um papel importante para o evento de exocitose não lítica em um processo que é independente da produção de melanina por esse fungo (FRAZÃO et al., 2020).

Em relação ao macrófago, a integridade da membrana do macrófago é necessária para que ocorra os eventos de exocitose não lítica. Quando há um aumento na permeabilidade da membrana, há uma diminuição da exocitose não lítica (SEOANE; MAY, 2020). Ainda sobre estrutura, macrófagos deficientes do receptor scavenger MACrophage Receptor with COLLagenous domain (MARCO) tem um aumento considerável na exocitose não lítica (ONYISHI et al., 2024). Outro processo relacionado a célula hospedeira que parece importante na exocitose não-lítica é o processo de autofagia de macrófagos. A autofagia é importante na reciclagem de organelas e componentes citoplasmáticos e também na imunidade a patógenos intracelulares. Camundongos nocautes para o gene *ATG5* demonstram uma diminuição na autofagia e também de exocitose não lítica, sugerindo haver uma relação entre esses processos (NICOLA et al., 2012). Além disso, macrófagos deficientes para a proteína anexina A2

apresentam uma diminuição importante tanto no processo de fagocitose quanto de exocitose não-lítica (STUKES et al., 2016). As anexinas são uma família de proteínas que se ligam a íons de cálcio que atuam na fusão de membranas celulares, atuando em diversos processos como tráfego de membranas, fagocitose, vias de endocitose e na exocitose de vesículas secretórias (STUKES et al., 2016).

A polarização de macrófagos para um perfil M2, além de levar a um aumento no crescimento das leveduras no interior dos macrófagos, induz uma diminuição nas taxas de exocitose não lítica (VOELZ; LAMMAS; MAY, 2009). De maneira contrária, um estudo mais recente demonstrou que macrófagos expostos a Interferons do tipo 1 demonstraram um aumento em eventos de exocitose não lítica (SEOANE et al., 2019). Interferon também participa da sinalização para exocitose não líticas em células coinfectadas com Vírus HIV levando a um aumento de exocitose não lítica (SEOANE et al., 2020).

Além dos macrófagos, foi relatado a ocorrência de exocitose não lítica de *Cryptococcus* em neutrófilos aderidos a células endoteliais do cérebro e camundongo. E que esses eventos eram influenciados pela cápsula e viabilidade do fungo, pH fagossômico e polimerização de actina dos neutrófilos (YANG et al., 2019). Recentemente foi descrito a ocorrência de exocitose não lítica por células dendríticas e esses eventos são semelhantes aos observados em macrófagos (PACIFICI et al., 2023).

Quanto a via de complemento ativada para o processo de fagocitose, a ocorrência de exocitose não lítica independe da via, porém as células que foram opsonizadas com anticorpos tendem a sair aglomeradas e se replicam no meio formando biofilmes, enquanto as células opsonizadas por complemento são liberadas individualmente (ALVAREZ; SAYLOR; CASADEVALL, 2008).

### **Transferência lateral**

Esse fenômeno ocorre quando uma ou mais células criptocócicas que estavam internalizadas em um fagócito são transferidas para um outro. Assim como na exocitose não lítica, esse processo também não afeta a viabilidade das células envolvidas (ALVAREZ; CASADEVALL, 2007; SHARIF et al., 2007). A transferência lateral já foi descrita na interação de macrófagos com outros patógenos como *Scedosporium apiospermum* e *Lomentospora prolificans*, porém nesses casos com morte de um dos

fagócitos. Após a transferência de esporos desses fungos de um macrófago para outro ocorreria a germinação desses levando a lise do macrófago receptor (TRZASKA et al., 2019). Já em *Aspergillus fumigatus* a transferência de esporos entre macrófagos foi associada a necrose do macrófago doador (SHAH et al., 2016). Diferente da exocitose não lítica que não depende da actina, a transferência lateral depende, uma vez que células tratadas com despolimerizante de actina, a citocalasina D, tem o processo de transferência lateral interrompido (MA et al., 2007).

## **Fatores de virulência interferindo na interação com o macrófago**

Como já descrito anteriormente, o macrófago desempenha um papel muito importante para o controle da infecção criptocócica. Apesar do sistema imunológico ter um papel crucial para que ocorra ou não a instalação da doença, o fungo também tem uma variada maquinaria para escapar do sistema imunitário e conseguir sobreviver e se estabelecer no organismo, são os chamados “Fatores de virulência”.

### **Cápsula**

A cápsula do *Cryptococcus* é considerada como um dos principais fatores de virulência. É constituída por ~88% de Glucuroxilomanano (GXM), ~10% de glucuronoxilomanogalactano (GXMGal) e ~2% de manoproteínas (MP) (MCFADDEN et al., 2007). No meio ambiente, a cápsula protege *Cryptococcus* de diferentes agentes estressores e da desidratação. Já foi descrito que os componentes da cápsula tem uma função imunomodulatória e auxiliam em uma melhor sobrevivência fúngica, a evasão das respostas imunes do hospedeiro e esconder fisicamente os PAMPs (LU; SUN; SHEN, 2005; VECCHIARELLI et al., 2011).

A GXM desempenha um papel importante para o parasitismo intracelular de *Cryptococcus*. Por exemplo, o mutante acapsular CAP67 não é capaz de se replicar no interior do macrófago (FELDMESSER et al., 2000). Além de esconder os PAMPs de parede celular, por se tratar de uma molécula polianiónica, a GXM pode causar uma repulsão eletrostática e isso também poderia impedir que macrófagos internalizassem *Cryptococcus* (NOSANCHUK; CASADEVALL, 1997). Além disso a presença de uma

lactonohidrolase secretada de *C. neoformans* atua no remodelamento na cápsula impedindo a deposição do sistema complemento e assim inibindo a formação do complexo e ataque a membrana e a formação de iC3b (PARK et al., 2014).

A GXM desregula a secreção de citocinas pro-inflamatórias por células do sistema imunitário, contribuindo para a imunossupressão. Ela induz a secreção de IL-10 e IL-8 em monócitos e neutrófilos humanos (RETINI et al., 1996; WALENKAMP et al., 1999). A IL-10 tem o papel de suprimir as citocinas pro-inflamatória e resposta protetora do tipo Th1 (BLACKSTOCK et al., 1999; RETINI et al., 2001; VECCHIARELLI et al., 1996). Além disso, a GXM também é capaz de estimular a apoptose, via regulação positiva do receptor Fasq-FasL (receptor de morte celular) (CHIAPELLO et al., 2003, 2004; GOUGEON; MONTAGNIER, 1999; MONARI et al., 2005, 2008). Dessa forma em geral os polissacarídeos da cápsula possuem várias atividades imunossupressoras (CHIAPELLO et al., 2001), assim como o GXMGal, porém a GXM tem um efeito em células do sistema imune inato, enquanto a GXMGal efeitos maiores no sistema imunitário adaptativo.

## **Melanina**

A melanina é um pigmento hidrofóbico, geralmente de coloração marrom ou preta. Esse pigmento é carregado negativamente e tem um alto peso molecular. A capacidade de *Cryptococcus* de produzir melanina foi descoberta na década de 1960, quando observaram a capacidade desse fungo de produzir colônias marrons quando cultivadas em Bird Seed Agar (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; POLACHECK, 1991). Quando cultivados na presença de compostos difenólicos como 3-4 diidroxifenilalanina (L-dopa) as células de *Cryptococcus* escurecem formando colônias de coloração escura (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995). Em *Cryptococcus* a síntese da melanina é feita necessariamente a partir de um substrato exógeno, e é catalisada pela lacase, produzida a partir de dois genes, Lac 1 e Lac2, localizados na parede celular e citoplasma respectivamente (WILLIAMSON; WAKAMATSU; ITO, 1998). Esse pigmento após produzido, geralmente, se deposita na parede celular do Fungo e confere a ele proteção a danos oxidativos entre outros (KWON CHUNG; TOM; COSTA, 1983). Além disso, tanto a lacase, quanto a melanina também pode estar presente em vesículas secretadas pelo

fungo. Melanina produzida a partir de o-difenois estão predominantemente associados a parede celular, já os p-difenois são solúveis e se difundem no meio.

A melanina confere em *Cryptococcus* uma resistência a compostos oxidativos (EMERY et al., 1994; WANG' AND; CASADEVALL', 1994) e a peptídeos antimicrobianos (DOERING et al., 1999) e Anfotericina B, menor susceptibilidade a fagocitose (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995), e também às atividades fungicidas dos macrófagos alveolares (LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999). Nos macrófagos alveolares, acredita-se que a lacase reduz Fe II em Fe III fazendo com que haja uma menor formação de radicais hidroxila com atividade antimicrobiana, possibilitando assim que o fungo sobreviva ao macrófago (LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999). No meio ambiente a melanina protege os *Cryptococcus* contra raios UV (Ultravioleta) (WANG; CASADEVALL, 1994), temperaturas extremas (ROSAS; CASADEVALL, 1997), e possivelmente também da predação.

Apesar da lacase estar fortemente associada a produção de melanina essa não é sua única função. Já foi demonstrado que lacase medeia funções que afetam a explosão oxidativa, a oxidação lipídica, síntese de prostaglandinas e mais recentemente demonstramos o envolvimento da lacase no processo de exocitose não lítica (ERB-DOWNWARD et al., 2008; FRAZÃO et al., 2020; LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999).

### **Termotolerância**

O organismo humano tem uma temperatura basal de 37°C, esse fato confere aos mamíferos uma resistência natural a diversos microrganismos, pois vários destes não possuem a capacidade de crescer a temperatura mais altas (ABBAS et al., 2015). Um estudo em 2009, avaliou a capacidade de 4802 cepas fúngicas pertencentes a 144 gêneros de crescer em diferentes temperaturas. Foram testadas temperaturas entre 4°C e 45°C. A maioria das linhagens cresceram bem em temperaturas entre 12°C e 30°C, mas foi observada uma diminuição significativa no crescimento em temperaturas acima de 35°C. Na faixa de 30°C a 40°C, a cada grau aumentado, houve uma diminuição de 6% das cepas fúngicas testadas que eram capazes de crescer, sugerindo que a febre pode ser um processo importante na diminuição da capacidade de sobrevivência de fungos no organismo humano (ROBERT; CASADEVALL, 2009).

Alguns fungos do gênero *Cryptococcus*, como o *C. neoformans* e *C. gattii*, não só conseguem sobreviver a 37°C, mas também conseguem se replicar. E assim são capazes de se estabelecer no organismo humano podendo infectar diversos sítios anatômicos (BUCHANAN; MURPHY, 1998; KRAUS et al., 2004). Desse mesmo gênero, tem o *Cryptococcus liquefaciens* que apesar de crescer a 37°C há um atraso no crescimento, fazendo essa espécie não patogênica. Demonstrando que a termo tolerância é uma característica importante para a virulência (ARAÚJO et al., 2017).

Sobre a interferência da temperatura na relação macrófago-*Cryptococcus*, um estudo com macrófagos aviários demonstrou que quando infectados e incubados a 42°C, temperatura corporal de aves, há uma redução de 80% do número de *Cryptococcus*. Em uma temperatura de 39°C os *Cryptococcus* são capazes de sobreviver a interação, já a 37°C o fungo volta a ser capaz de proliferar dentro dos macrófagos. Essa capacidade de reduzir a proliferação de *Cryptococcus* por macrófagos aviários, se dá pelo melhor desempenho desses macrófagos a temperaturas maiores (JOHNSTON; VOELZ; MAY, 2016).

## **Enzimas**

### ***Fosfolipase B***

As fosfolipases são enzimas hidrolíticas que causam instabilidade da membrana das células levando a lise celular através da clivagem de ligações éster dos glicofosfolipídeos. Elas são classificadas em 5 grupos: A, A2, B, C e D (COX et al., 2001; MA; MAY, 2009). Dessas a B quem desempenha um papel importante para a virulência do *Cryptococcus* por sua capacidade de modificar os fosfolipídeos auxiliam na invasão e na evasão de macrófagos (DJORDJEVIC et al., 2005). Acredita-se que a fosfolipase B auxilia na virulência do *Cryptococcus* lisando a célula hospedeira. Foi demonstrado que a fosfolipase B diminui a atividade dos macrófagos através da incorporação de ácido araquidônico. O ácido Araquidônico serve como reservatório para a produção de eicosanoides, que são lipídios que influenciam na resposta inflamatória principalmente para macrófagos diminuindo sua atividade fagocítica (NOVERR et al., 2003; WRIGHT et al., 2007)- A falta da fosfolipase B1 em *Cryptococcus* leva a uma menor virulência desse fungo, dificuldade para crescer a 37°C, menor proliferação no interior dos macrófagos,

dificuldade na modulação da cápsula durante a interação com macrófagos e amebas, produção de melanina diminuída, redução na taxa de exocitose não lítica (CHEN et al., 1997; CHRISMAN et al., 2011; COX et al., 2001; JOHNSTON; MAY, 2013). Em resumo, a fosfolipase tem um papel importante em diversos fatores de virulência do *Cryptococcus*.

### **Urease**

A urease é uma enzima que catalisa a hidrólise da amônia, levando a alcalinização do meio. Essa ação favorece o crescimento do *Cryptococcus*, possibilitando uma posterior evasão de células do hospedeiro para infecção de novas células e tecidos (FEDER et al., 2015; SINGH et al., 2013). A presença da urease interfere na interação macrófagos-*Cryptococcus* afetando taxa de exocitose não lítica de macrófagos, interfere no crescimento intracelular desse fungo e confere a levedura a possibilidade de utilizar ureia como fonte de nitrogênio (FU et al., 2018). Além disso, os camundongos infectados com a cepa mutante para o gene de urease apresentavam uma menor disseminação para o sistema nervoso central quando comparado com a linhagem selvagem, sugerindo que a urease é importante para a disseminação do *Cryptococcus* para o SNC (OLSZEWSKI et al., 2004; SHI et al., 2010).

## **Rede Criptococose Brasil**

A Rede Criptococose Brasil (RCB) abrange vários grupos de pesquisadores e profissionais da área da saúde que trabalham para a caracterização dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. de todo o Brasil. É uma equipe multidisciplinar onde diversos profissionais trabalham com o objetivo de reunir dados, tanto clínicos como experimentais, para finalmente poder traçar o perfil de *Cryptococcus* spp e da criptococose no Brasil. Essa equipe surgiu a partir da necessidade de ter mais informações sobre essa enfermidade e assim poder oferecer uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Visto que essa é uma doença que em geral apresenta uma demora maior no seu diagnóstico, esse atraso compromete o início e sucesso do tratamento por muitos pacientes já estarem em um estágio avançado da doença antes de terem acesso ao tratamento.

A RCB está presente em vários estados brasileiros tais como: Rio de Janeiro, Paraná, São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Bahia, Ceará, Piauí, Pará, Roraima, Minas Gerais e Distrito Federal. A RCB foi implantada no Brasil em 2009 e no Distrito Federal (DF) em 2014. No DF foi coordenada inicialmente pelo Dr. Vitor Laerte que era Professor da Universidade Católica de Brasília (UCB) e pesquisador da Fiocruz Brasília, atualmente é coordenada pelo Dr. André Nicola professor e pesquisador da Universidade de Brasília (UnB). Integram a Rede Universidade, Institutos de pesquisa, Laboratórios e hospitais públicos.

A nossa equipe na UnB é coordenada pelos professores André Nicola e Patrícia Albuquerque e atualmente conta com mais de 10 pesquisadores entre alunos de PIBIC, mestrado, doutorado, pós-doutores e professores que se dividem em realizar experimentos no Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Biotecnologia (LabMIB) do Núcleo de Medicina Tropical da UnB e no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Patogênicos (LBMFP) do Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da UnB. Nos últimos anos temos feito a coleta e caracterização de isolados clínicos de *Cryptococcus* do Distrito Federal que estão sendo submetidos a análises experimentais e coleta de informações clínicas dos pacientes dos quais foram isolados. As análises experimentais envolvem a avaliação fenotípica de diferentes fatores de virulência do fungo, bem como da sua interação com hospedeiros realizadas por diferentes colaboradores. E o objetivo maior é que possamos avaliar possíveis correlações entre esses fatores com os perfis clínicos da criptococose no Brasil.

## **Justificativa**

A criptococose tem uma distribuição mundial ampla e a letalidade associada a essa doença ainda é bastante significativa. Além disso o Brasil apresenta um número razoavelmente alto de casos da enfermidade, e em muitos locais o número de mortes por essa micose se assemelham as taxas apresentadas em países subdesenvolvidos do continente Africano. Os dados do Distrito Federal mostram que a criptococose na região está associada a pacientes soropositivos para HIV e idade economicamente ativa apresentando uma alta letalidade. Sendo *C. neoformans* o mais predominante, enquanto

*C. gattii* está mais associado a pacientes soronegativos. E o acometimento do SNC é bem comum. Os dados epidemiológicos demonstram a necessidade de estudos para melhor elucidar essa enfermidade e auxiliar em um manejo mais eficiente com os pacientes.

Apesar dos grandes avanços no conhecimento da interação fungo-hospedeiro, ainda existem muitas perguntas a cerca dessa enfermidade. Esse estudo faz parte de um projeto mais amplo que busca avaliar uma possível correlação de dados laboratoriais sobre os mecanismos de virulência já conhecidos desses fungos e dados dos pacientes de onde os isolados clínicos foram obtidos. Acreditamos que possa existir uma relação entre uma maior ou menor ocorrência de exocitose não lítica de macrófagos infectados por esse fungo e o prognóstico clínico do paciente. Além disso, esse estudo pode ajudar a esclarecer outros fatores desse processo celular, bem como da interação fungo-macrófago que ainda não são completamente entendidos.

## **Objetivo**

### **Geral**

Avaliar a interação de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp do Distrito Federal com macrófagos J774 e correlacionar esses dados com a expressão de fatores de virulência dos isolados e dados clínicos dos pacientes.

### **Específicos**

1. Observar a ocorrência e características fenotípicas do processo de exocitose não-lítica dos isolados por meio de videomicroscopia.
2. Analisar a interação macrófago-fungo (fagocitose e sobrevivência fúngica).
3. Padronizar um método quantitativo para quantificação da urease produzida por *Cryptococcus*.
4. Quantificar a produção de urease e fosfolipase pelos isolados.
5. Correlacionar os dados dos fatores de virulência estudados pelo nosso grupo com dados clínicos dos pacientes dos quais esses isolados foram obtidos.

# **Materiais e métodos**

## **Meios e soluções**

### **DMEM**

Utilizamos o meio DMEM (Sigma D5796) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco 12657) e Aminoácidos não essenciais 1X (Sigma M7145), para cultivo das células J774 e em experimentos com elas.

### **Meio mínimo.**

Preparamos o meio mínimo dissolvendo 15mM de glicose, 29mM de Fosfato de Potássio Monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 10mM de sulfato de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e 13mM de glicina. O pH era ajustado para 5.4 e a solução era esterilizada por autoclavagem e armazenados em temperatura ambiente. No momento do uso acrescentávamos uma solução de tiamina filtrada para uma concentração de 3µM.

### **Sabouraud**

De modo geral, utilizamos meio Sabouraud para o cultivo das células fúngicas para os experimentos de rotina.

### ***Caldo Sabouraud***

Para o preparo do meio líquido dissolvemos 4% de Dextrose (Vetec: V000221) e 1% de Peptona Bacteriologia (Kasvi: K25-611701) em água destilada para um volume final de 1000 ml. O meio era esterilizado por autoclavagem e armazenados em temperatura ambiente.

### ***Agar Sabouraud***

Para o preparo do meio sólido dissolvemos 4% de Dextrose (Vetec: V000221), 1% de Peptona Bacteriologia (Kasvi: K25-611701) e 1,8% de Ágar Bacteriológico (Vetec: V000006) em água destilada para um volume final de 1000 ml. O meio era esterilizado por autoclavagem e armazenados em placas de petri entre 2 e 8°C.

### **Emulsão de Gema de Ovo (EGO)**

Para o preparo da EGO, utilizado para suplementar o meio dos ensaios de fosfolipase, colocamos um ovo caipira dentro de um Becker e o cobrimos com álcool

70% por 1 hora dentro do fluxo laminar. Após esse tempo, quebramos o ovo de forma estéril, sem romper a película da gema. Coletamos o máximo de gema, sem pegar a película e clara. Colocamos a gema em um tubo cônico de 50ml e acrescentamos PBS 1 x estéril na proporção de 1:1 e homogeneizamos a mistura.

### **Meio Agar Fosfolipase**

Produzimos esse meio, diluindo 1,2% de Peptona, 4% de glicose, 6,85% de Cloreto de Sódio, 0,9% de cloreto de Cálcio e 1,8% de ágar em água destilada para um volume final de 200ml e esterilizado por autoclavagem.

Acrescentamos 40ml de EGO de ovo caipira no meio estéril e distribuíamos o meio em placas de 6 poços, colocando 3ml em cada poço. Esperamos solidificar e levamos para uma câmara úmida onde ficava a 30°C por 24 horas.

### **Meio Ureia de Roberts 2x**

Nos ensaios para a avaliação da atividade de urease, utilizamos um Meio Ureia de Roberts 2X adaptado (FU et al., 2018; KWON-CHUNG et al., 2014) seguindo a seguinte formulação: 4% de Ureia, 0,02% de extrato de levedura, 0,002% de vermelho de fenol, 0,273% de fosfato monopotássico e 0,285% de fosfato dissódico diluídos em água destilada para um volume final de 100ml.

### **PBS**

Preparamos uma solução estoque 5x e a partir dela, fazíamos o PBS 1X para uso diluindo com água destilada estéril. Para a produção do estoque diluíamos 4% de cloreto de Sódio (NaCl), 0,1% de Cloreto de Potássio (KCl), 0,1% de Fosfato de Potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 0,6% de Fosfato Dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) em 1000 ml de água destilada. O pH era ajustado para 7,4 e a solução esterilizado por autoclavagem e armazenada em temperatura ambiente.

### **Células**

#### **Isolados clínicos de *Cryptococcus*.**

Linhagens padrão de *Cryptococcus* (*C. neoformans* H99 e *C. gatti* R265) foram usadas como controle para os diferentes experimentos. Essas linhagens são

amplamente utilizadas em laboratório para experimentação científica, além de terem seus genomas sequenciados e já serem bem caracterizados. Para o capítulo 1, utilizamos isolados clínicos recebidos da Fiocruz do Rio de Janeiro, dos quais não temos dados clínicos dos pacientes. Para o capítulo 2, utilizamos 54 isolados clínicos provenientes do Lacen-DF pela Rede Criptococcose Brasil. Nossa micoteca tem mais de 100 isolados clínicos coletados em 2016. Alguns pacientes foram isolados *Cryptococcus* de mais de uma amostra. Para nossos experimentos elegemos utilizar apenas a primeira amostra do paciente. Esses isolados são armazenados em freezer -80°C. Antes de cada experimento as células eram semeadas em meio Sabouraud e incubadas em estufa a 30°C por 48 horas. Dessas placas preparamos o pré-inoculo, semeando uma colônia isolada em 5mL de Caldo Sabouraud e incubados a 37°C sob agitação de 200 RPM *overnight*. Para o experimento, as células eram lavadas com PBS para a remoção do meio e contadas com auxílio de um hemocitômetro e as culturas foram posteriormente diluídas para as densidades apropriadas para cada experimento.

#### **J774.A1**

J774.A1 são macrófagos imortalizados derivados de células reticulares de fêmea de camundongo BALB/c. Elas foram cedidas gentilmente pelo professor Hugo Costa Paes da Universidade de Brasília. As células foram cultivadas em meio DMEM em placas para cultivo não tratadas da Corning (#430591).

Os repiques foram realizados 2 vezes por semana em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e aminoácidos não essenciais 1x, em uma placa de cultura nova e estéril. A placa era encubada em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para os experimentos as células eram contadas, usando a coloração com azul de tripano e contadas com auxílio de um hemocitômetro e posteriormente diluídas em densidades apropriadas para os experimentos.

## Experimentos

### Avaliação da interação de macrófagos com *Cryptococcus*

#### Exocitose não lítica por videomicroscopia

Utilizamos o protocolo descrito por Stukes e Casadevall (STUKES; CASADEVALL, 2014), com modificações. Utilizamos placas de 24 poços. Preparamos uma suspensão de J774.A1 de  $2 \times 10^5$  células por ml. Foram colocados 500 $\mu$ L dessa suspensão de células em cada poço, levados para incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> para a aderência das células durante a noite. No dia seguinte foram preparadas uma suspensão de células fúngicas na densidade de  $2 \times 10^6$ /ml em DMEM com 10 $\mu$ L/ml do anticorpo anticapsular 18B7 para a opsonização das células fúngicas. A seguir, 500 $\mu$ L dos fungos eram adicionados aos poços contendo J774.A1 e levados a estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas para a fagocitose. Após esse tempo os poços foram lavados gentilmente com PBS, para a remoção das células não fagocitadas. Depois foram adicionados 1mL de meio DMEM e a placa era levada para o EVOS e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Durante esse período, foram feitas imagens a cada 4 minutos na objetiva de 10x. Fazemos uma interação com MOI 5.

Para análise, foram escolhidos 100 macrófagos que tinham fagocitado células fúngicas de cada isolado e os acompanhamos durante as 24 horas de experimento. Avaliamos a porcentagem dos eventos seguindo os seguintes critérios:

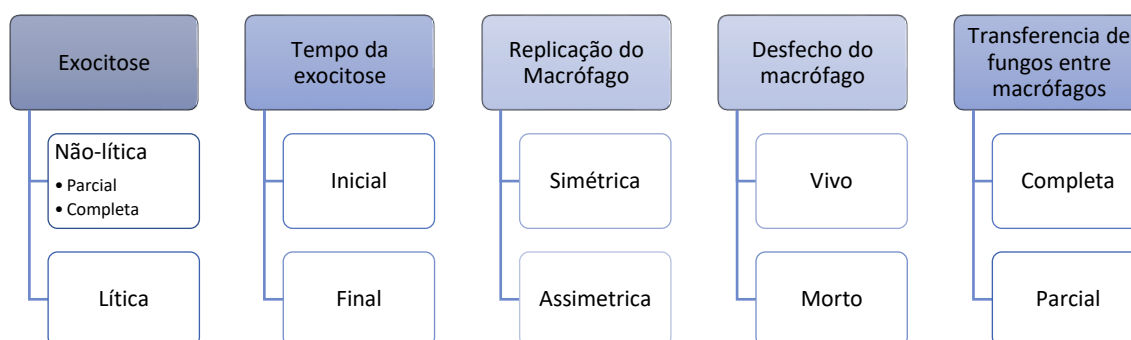


Figura 6: Esquema de análise da videomicroscopia para avaliação de eventos de Exocitose não lítica.

1. Exocitose não-lítica: quando alguns ou todos os fungos que estavam dentro do macrófago foram exocitados e os macrófagos continuavam vivos.
  - a) Completa: se todos os fungos internalizados eram exocitados.
  - b) Parcial: quanto apenas parte dos fungos eram exocitados.
2. Exocitose lítica: quando os fungos internalizados eram liberados dos macrófagos e esse macrófago parava de se movimentar, observamos se o macrófago continuava imóvel por pelo menos mais 2 horas para certificar que ele estava morto.
3. Divisão simétrica: o macrófago se dividia e as células filhas apresentavam tamanhos iguais e quantidade de células fúngicas internalizadas semelhante.
4. Divisão a assimétrica as células filhas apresentavam tamanho e quantidade de células internas significativamente diferentes.
5. Macrófago vivo quando ele continuava se movimentando até o final das 24 horas e morto quando ele parava de se mexer e não se mexia mais até o fim das 24 horas.
6. Transferência de fungo completa quando um macrófago se aproximava da membrana celular do outro e transferia todas as células fúngicas de dentro dele para o outro macrófago adjacente.
7. Transferência parcial quando o macrófago transferia pelo menos um fungo para o outro macrófago, mas não todos os fungos internalizados.

### **Taxa de fagocitose**

Utilizamos placas de 96 poços. Preparamos uma suspensão de J774.A1 de  $5 \times 10^4$  células por ml. Dessa suspensão de células foram colocados 100  $\mu$ L em cada poço, a placa era levada para incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> para a aderência das células durante a noite. No dia seguinte foram preparadas uma suspensão de células fúngicas na densidade de  $5 \times 10^5$  células/ml em DMEM com 10 $\mu$ L/ml do anticorpo anticapsular 18B7 e eram incubadas por 30 minutos para a opsonização das células fúngicas. A seguir, retirávamos delicadamente todo líquido que estava nos poços e 200 $\mu$ L das suspensões dos fungos eram adicionados aos poços contendo J774.A1 e as placas eram

incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas para a fagocitose em um MOI 2. Após esse tempo os poços são lavados gentilmente com PBS, para a remoção das células não fagocitadas. A seguir os poços foram corados com o kit panótico Instant Prov (NewProv, PA205). E as placas eram levadas ao microscópio invertido Primo Vert (Zeiss) para fotografia e posterior análise do percentual de fagocitose e do índice fagocítico usando o programa Zen 3.3 (Zeiss). Foram contadas 100 células de cada amostra em cada experimento. O experimento foi repetido pelo menos 3 vezes em dias diferentes. A porcentagem de fagocitose foi obtida pela quantidade de macrófagos que tinham fungos internalizados em um total de 100 macrófagos analisados. Contabilizamos a quantidade de fungos internalizados por cada macrófago para o cálculo do índice fagocítico, utilizando o cálculo abaixo.

$$\text{Índice Fagocítico} = \frac{\text{soma de fungos fagocitados pelo macrófagos}}{\text{quantidade de macrófagos que fagocitaram fungos}}$$

### **Sobrevivência do *Cryptococcus* após interação**

Utilizamos placas de 96 poços. Preparamos uma suspensão de J774.A1 de 5 X 10<sup>4</sup> células/ml. Dessa suspensão de células foram colocados 100µL em cada poço, a placa era levada para incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> para a aderência das células durante a noite. No dia seguinte foram preparadas uma suspensão de células fúngicas na densidade de 2 x 10<sup>5</sup> células/ml em DMEM com 10µL/ml do anticorpo anticapsular 18B7 e eram incubadas por 30 minutos a 37°C para a opsonização das células fúngicas. A seguir, retirávamos delicadamente todo líquido que estava nos poços e 200µL dos fungos eram adicionados aos poços contendo J774.A1 e levados a estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para a interação. Após esse período coletamos todo o conteúdo do poço (200µl) que era transferido para um tubo cônico devidamente rotulado (fungos não internalizados). Em seguida adicionávamos 200µl de água destilada estéril gelada e a placa era levada a geladeira por 20 minutos para a lise dos macrófagos. Coletávamos esse lisado no mesmo tubo previamente rotulado contendo os fungos não internalizados, e em seguida fizemos 3 lavagens com 200µl de água para cada poço, para a remoção completa de células fúngicas presentes. O volume dessas lavagens era sempre coletado no mesmo eppendorf dando origem a um volume final de 1 ml. Cada suspensão de

células fúngicas foi então submetida a diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 e 10µl de cada diluição eram plaqueadas em um dos campos de placas tripartidas com auxílios de pérolas de vidro. As placas eram incubadas por 48 horas, a 30°C. Após esse período o contamos o número de unidades formadoras de colônia para cada amostra. Para estimarmos a sobrevivência fúngica, fizemos o cálculo da razão de sobrevivência por meio da divisão do número de unidades formadoras de colônia após as 24h de interação pelo número de unidades formadoras de colônia do inóculo inicial. Consideramos valores maior que 1,2 indicam capacidade de sobrevivência e replicação dos isolados após interação, valores abaixo de 1 indicam baixa capacidade de sobrevivência/replicação dos fungos após a interação. Classificamos os isolados em três grupos, aqueles com índices de sobrevivência maior que 1,2, como isolados com alta capacidade de sobrevivência/replicação. Isolados com índices de sobrevivência entre 0,7 e 1,2 como isolados capazes de sobreviver, mas não proliferar dentro dos macrófagos. E isolados com índices abaixo de 0,7 como isolados com baixa capacidade de sobrevivência/proliferação dentro dos macrófagos.

## **Avaliação da produção de enzimas**

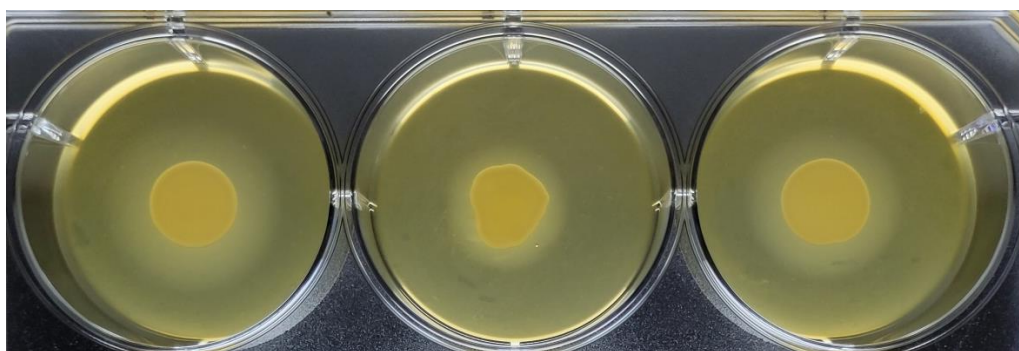
### ***Fosfolipase***

Para a análise da atividade de fosfolipase foram utilizados como controle as linhagens celulares H99 e R265 e fizemos duplicata técnica e triplicata biológica do crescimento dos fungos em meio ágar gema de ovo. Esse meio era colocado em poços de placas de 6 poços e posteriormente inoculados com 5µl de uma suspensão de células fúngicas numa densidade de 10<sup>7</sup> células/ml. As placas eram a seguir incubadas a 30°C em uma câmara úmida por 5 dias. No 5º dia, os poços de cada placa em fotografados para a observação e mensuração do tamanho da colônia e do halo de precipitação ao redor da mesma. Esses dados foram utilizados para o cálculo do índice de atividade de fosfolipase (Pz) utilizando a seguinte fórmula:

$$Pz = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{(\text{diâmetro da colônia} + \text{zona de precipitação})}$$

A partir disso, definimos os seguintes critérios para classificação dos diferentes isolados:

$Pz = 1$	Atividade enzimática negativa
$0,64 < Pz < 1$	Positiva
$Pz \leq 0,64$	Fortemente positiva



### ***Urease***

Para a análise da atividade de urease, utilizamos H99 e R265 como controle positivo e uma mutante para urease, *Ure1* $\Delta$ , como controle negativo. Os experimentos foram feitos com triplicata técnica e triplicata biológica. Utilizávamos placas de 96 poços, onde eram adicionados 100 $\mu$ l de meio ureia de Christensen 2X e 100 $\mu$ l da suspensão de células em água em uma concentração de  $5 \times 10^7$  células/mL. A seguir as placas eram incubadas em um espectrofotômetro de placa (EON Biotek) e incubadas a 37°C, sob agitação por 8 horas. Eram feitas leituras de 5 em 5 minutos nos comprimentos de onda 560 e 600, e os dados eram apresentados no software GEN5 2.04. O meio possui um indicador de pH, cuja coloração inicial é amarela com um pH neutro e à medida que ocorre a produção de urease basicando o meio, a coloração muda para rosa. A proposta desse método é avaliar a atividade da urease ao longo do tempo, podendo avaliar a cinética de produção. Dessa forma o resultado não se limita em positivo ou negativo, podemos avaliar também a intensidade da atividade nos positivos e compará-las em relação aos controles. Diferentemente os testes normalmente utilizados para avaliação da atividade de urease em criptococose são feitos em meio sólido e apenas indicam se a atividade está presente ou (DE SOUSA et al., 2022)ausente (teste qualitativo).

## **Lacase**

Os testes para a avaliação da atividade da lacase e da produção de melanina foram realizados pelos estudantes Herdson, Getúlio e Kaio e a metodologia está melhor descrita no artigos publicado pelo nosso grupo (DE SOUSA et al., 2022).

Cultivamos os isolados em 5mL de YPD (2% glicose, 2% extrato de levedura) e incubadas a 30°C, 200 RPM por 24h. As células foram concentradas por centrifugação e ressuspensas em 5mL de meio de sais de asparagina e glicose (0,3% glicose, 0,1% L-asparagina, 0,05% MgSO<sub>4</sub>, 1% da solução 1 M (pH6,5) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 µM tiamina, 0,001% da solução 0,5 M CuSO<sub>4</sub>) e incubadas por 5 dias a 30°C. As células foram novamente coletadas por centrifugação e lavadas com 5mL de 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0 e em seguida lavadas com meio de sais asparagina sem glicose. A partir dessas células preparamos uma suspensão de células com 10<sup>8</sup> células/mL 1mL dessa suspensão colocamos em 5mL do meio sem glicose e incubado a 30°C por 72h para indução da expressão de lacase. Após esse período, contamos o número de células para normalização da atividade de lacase secretada no meio pelo número de células no final da cultura. Coletamos o sobrenadante da cultura e medimos a atividade da lacase em placa de 96 poços adicionando 180µL do sobrenadante de isolado e 20µL de 10mM L-DOPA. Medimos também a atividade de lacase em células inteiras. Preparamos suspensões de células de 10<sup>8</sup> células/mL de cada isolado. Usamos placas de 96 poços e 24 poços. Na placa de 96 poços colocamos 180µL da suspensão de células e 20 µL de L-DOPA e para a leitura utilizamos 200 células como branco, já na placa de 24 poços colocamos 450 µL de suspensão de células e 50 µL de 10mM de L-DOPA e para leitura fizemos um branco com 500 células vivas. As leituras foram feitas por espectrofotometria em um comprimento de onda de 480nm com leitura a cada 6 horas durante 48 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata e utilizamos a equação abaixo para o cálculo da atividade de lacase.

$$\text{Atividade de lacase} = \frac{\text{média de OD}}{(9,7 \times \text{número de células de levedura no final da cultura})}$$

## **Melanina**

Para avaliação da produção de melanina, utilizamos Agar Meio Mínimo suplementado com 1mM de L-DOPA e tiamina. Preparamos placas de 12 poços com o meio e inoculamos 5µL de cada isolado contendo  $10^5$  células no centro de cada poço. Cada isolado foi feito em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C, protegidas da luz e monitoradas por 7 dias. Após 24 horas de incubação as colônias eram fotografadas de 12 em 12 horas. As fotografias eram tiradas sempre com parâmetros padronizados. As colônias foram avaliadas e classificadas como heterogenia, quando bordas ou centro estavam pigmentados, ou homogenia.

Agrupamos os isolados em 1 grupos ordenados de 1 a 7, onde 1 eram de isolados com coloração menos intensa e tempo de melanização mais lento e o grupo 7 eram os isolados de coloração mais intensa e mais rápida. A melanina foi quantificada em escala de cinza através de um protocolo implementado por Herdson e colaboradores (DE SOUSA et al., 2022).

## **Resultados**

### **Capítulo 1:**

Com parte dos dados gerados no projeto de mestrado, onde utilizamos oito isolados clínicos de *Cryptococcus* spp recebidos da Fiocruz do Rio de Janeiro, observamos uma possível correlação entre exocitose não lítica e a melanização com isolados. A partir dessa informação, no doutorado, fizemos testes para confirmar essa correlação, que está descrito no artigo abaixo, publicado na revista mBio em setembro 2020. Doi: <https://doi.org/10.1128/mbio.02085-20>.

**Laccase Affects the Rate of *Cryptococcus neoformans* Nonlytic Exocytosis from Macrophages**

## **ABSTRACT**

Nonlytic exocytosis is a process in which previously ingested microbes are expelled from host phagocytes with the concomitant survival of both cell types. This process has been observed in the interaction of *Cryptococcus* spp. and other fungal cells with phagocytes as distant as mammalian, bird, and fish macrophages and ameboid predators. Despite a great amount of research dedicated to unraveling this process, there are still many questions about its regulation and its final benefits for host or fungal cells. During a study to characterize the virulence attributes of Brazilian clinical isolates of *C. neoformans*, we observed great variability in their rates of nonlytic exocytosis and noted a correlation between this process and fungal melanin production/laccase activity. Flow cytometry experiments using melanized cells, non-melanized cells, and *lac1*Δ mutants revealed that laccase has a role in the process of nonlytic exocytosis that seems to be independent of melanin production. These results identify a role for laccase in virulence, independent of its role in pigment production, that represents a new variable in the regulation of nonlytic exocytosis.

**IMPORTANCE** *Cryptococcus neoformans* is a yeast that causes severe disease, primarily in immunosuppressed people. It has many attributes that allow it to survive and cause disease, such as a polysaccharide capsule and the dark pigment melanin produced by the laccase enzyme. Upon infection, the yeast is ingested by cells called macrophages, whose function is to kill them. Instead, these fungal cells can exit from macrophages in a process called nonlytic exocytosis. We know that this process is controlled by both host and fungal factors, only some of which are known. As part of an ongoing study, we observed that *C. neoformans* isolates that produce melanin faster are more-frequent targets of nonlytic exocytosis. Further experiments showed that this is probably due to higher production of laccase, because fungi lacking this enzyme are nonlytically exocytosed less often. This shows that laccase is an important signal/regulator of nonlytic exocytosis of *C. neoformans* from macrophages.

**KEYWORDS** *Cryptococcus neoformans*, laccase, macrophages, nonlytic exocytosis

## **OBSERVATION**

*Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast that causes cryptococcosis, a globally distributed disease whose most frequent manifestation is a severe meningoencephalitis in immunosuppressed people. Infection normally occurs by inhalation, which leads to fungal killing or containment within granulomas in immunocompetent hosts. Macrophages are considered the main effector cells in the immune response against *C. neoformans* but also provide a site for intracellular replication and a vehicle for systemic dispersion of this fungus. The interaction of *C. neoformans* cells with macrophages after phagocytosis can lead to a number of outcomes, both for the fungi (death, latency, intracellular proliferation) and for the phagocyte (cell lysis, cell division, transfer of the phagocytosed cargo to another macrophage) (1). An additional outcome is nonlytic exocytosis, also called vomocytosis, a process in which previously ingested microbes are expelled from host cells without compromising the viability of either (2, 3). Several studies have provided evidence that both fungal and host factors can influence nonlytic exocytosis. For *C. neoformans*, these include fungal viability, the acid-base properties of the capsule, or urease activity inhibiting macrophage phagosome maturation. On the host side, immunity status, macrophage polarization by different cytokines, and viral coinfections are known to affect this process (2, 4–7).

For a few years, our team has been phenotypically characterizing virulence-related features of *C. neoformans* VNI clinical isolates obtained from patients with cryptococcosis studied by the Cryptococcosis Brazil Network. Among several different features, we have been analyzing the rates of nonlytic exocytosis of the different isolates, their phagocytosis and survival after interaction with macrophages, and their melanization. Nonlytic exocytosis was analyzed using time-lapse microscopy as described previously with some modifications (8). Fungal phagocytosis and survival were analyzed after 2 or 24 h of interaction with BALB/c bone marrow-derived macrophages (BMDM), respectively, as described previously (9, 10). Experiments with mice were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Brasilia (UnB DOC 52657/2011). Melanization kinetics was assessed by spotting cultures of each isolate in L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) minimal medium and performing densitometry on images collected every 12 h (see Fig. S1 in the supplemental material). We also established a subjective melanization score for each isolate based on how fast its melanization happened and how much darker

the colony was at the end of the analysis; both methodologies are described in detail elsewhere (11).

The main strategy of our ongoing study involved evaluating virulence and host-pathogen attributes in different strains and correlating these data with clinical outcomes in order to understand their role in human disease. We have not yet measured nonlytic exocytosis in a sufficient number of isolates to draw clinically relevant conclusions, but the experiments with the first batch of clinical isolates led to several interesting observations that could not have been made with the limited number of laboratory-adapted fungal strains used in previous studies. Macrophages underwent nonlytic exocytosis beginning around 2 h after the start of image collection and continuing during the 24 h of observation for all isolates (Fig. 1A). The rates ranged from 14% to 74%, and all the clinical isolates presented lower rates of nonlytic exocytosis than the control strain, H99 (Fig. 1B). Lytic events were also observed in all the interactions but were considerably less frequent than nonlytic exocytosis.

We correlated the percentage of nonlytic exocytosis events after macrophage interaction with the different isolates with several virulence phenotypes. We found no significant correlation with the basal capsule size in Sabouraud medium (Fig. S2A) or the isolate's ability to modulate capsule size after growth in minimal medium (Fig. S2B) or Sabouraud-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Fig. S2C). However, we did observe interesting results with survival rates for each isolate and their melanization kinetics and scores. We observed a positive correlation ( $r = 0.7211$ ;  $P = 0.0186$ ) between the rate of nonlytic exocytosis and an isolate's survival after interaction with macrophages (Fig. 2A) but no correlation between nonlytic exocytosis and the percentage of phagocytosis (Fig. S2D). This suggests a possible link between the ability of the fungus to survive/grow within the macrophages and its ability to trigger nonlytic exocytosis, in agreement with previous work showing that fungal proliferation rates can affect nonlytic exocytosis (3, 7).

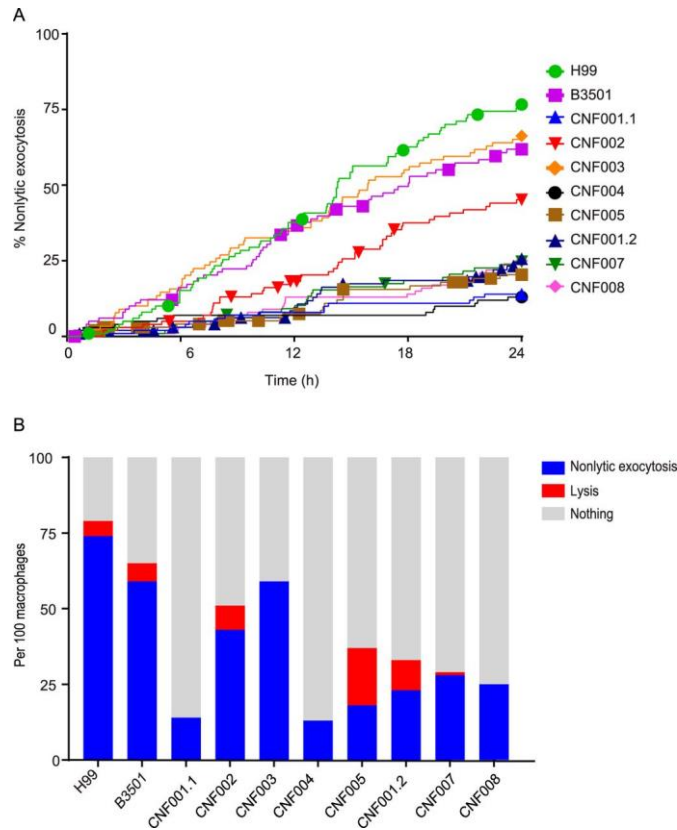
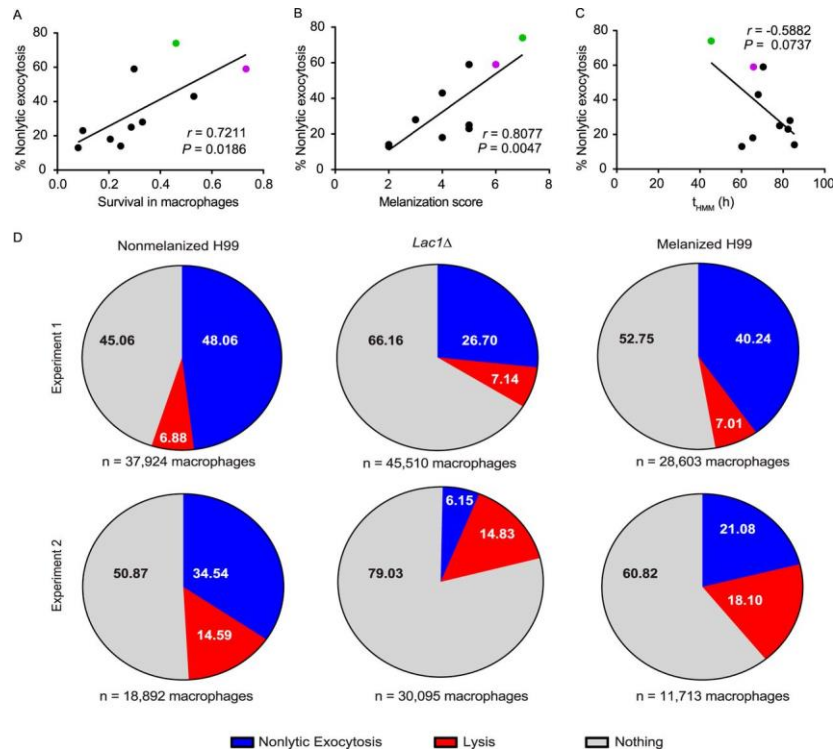


FIG 1 Outcomes of macrophage interaction with different *C. neoformans* isolates. (A) Kinetics of events of macrophages undergoing nonlytic exocytosis or macrophage lysis after interaction with different *C. neoformans* isolates for 24 h. Kaplan-Meier curves were generated to follow the macrophages after the interaction with each isolate. Nonlytic exocytosis events are represented by stepwise changes in the curves, whereas each corresponding symbol (circle, square, triangle, etc.) along the curves represents a macrophage lysis event. (B) Outcome of macrophages with internalized *C. neoformans* after 24 h. One hundred macrophages were followed for each isolate, and each bar displays the proportions of events of nonlytic exocytosis (blue), macrophage lysis (red), or no observed event (gray).

Another interesting correlation was observed between nonlytic exocytosis and each isolate's melanization score. Those with the highest melanization scores also manifested the highest ability to escape the macrophage by nonlytic exocytosis ( $r = 0.8077$ ;  $P = 0.0047$ ) (Fig. 2B). A similar correlation was observed regarding the kinetics of melanization: isolates that melanized faster (presenting a lower time for half-maximum melanization [tHMM]) also manifested the highest rates of nonlytic exocytosis ( $r = -0.5882$ ;  $P = 0.0737$ ) (Fig. 2C).

These correlations suggested that melanin and/or laccase could be involved in nonlytic exocytosis. To test these hypotheses, we performed two flow cytometry experiments using a modification of a previously described protocol (12): a gain-of-function assay with premelanized cells, in which we should observe more nonlytic

exocytosis if melanin is involved, and a loss-of-function assay, in which a laccase knockout mutant would be exocytosed less often if laccase played a role in this process. Briefly, DDAO-SE [9-H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one-7-yl)-succinimidyl ester]-labeled J774.16 macrophages were incubated for 2 h with fungal cells previously labeled with CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate). After the interaction, extra-cellular yeasts were stained with Uvitex 2B, a fungal cell wall dye that is unable to permeate intact macrophage membranes. Following that, macrophages containing ingested *C. neoformans* were selected using fluorescence-activated cell sorter gating for events positive for DDAO-SE and CMFDA but negative for Uvitex 2B (for the gating strategy, see Fig. S3). Those cells were plated and 24 h later were analyzed by flow cytometry in the presence of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) to evaluate if the macrophages had undergone lysis or were still alive but no longer harbored *C. neoformans* cells, corresponding to macrophages that had undergone nonlytic exocytosis (DDAO-SE positive, CMFDA negative). As shown in Fig. 2D, there was little variation among the macrophage lytic events among the three different samples (red regions in the pie charts). In the gain-of-function assay, we actually observed a decrease in nonlytic exocytosis of premelanized cells in comparison to nonmelanized cells in both experiments, from 48.06% to 40.24% ( $P < 0.0001$  by the chi-square test) and from 34.54% to 21.08% ( $P < 0.0001$  by the chi-square test), respectively. On the other hand, the loss-of-function assay showed a decrease in the proportion of nonlytic exocytosis events in both experiments, from 48.06% to 26.7% ( $P < 0.0001$  by the chi-square test) and from 34.54% to 6.15% ( $P < 0.0001$  by the chi-square test), respectively (Fig. 2D). These results suggest that laccase itself, rather than melanization, has a major role in the process of nonlytic exocytosis. This dissociation between melanization and laccase is not surprising given that the enzyme mediates other functions apart from pigment production, including affecting the oxidative burst, lipid oxidation, and prostaglandin synthesis (13, 14). Furthermore, these results establish a role for laccase independently of any aspect of melanization substrate oxidation, since the nonlytic exocytosis experiments were performed in the absence of L-DOPA or other substrates for melanin synthesis.



**FIG 2** Correlations and hypothesis testing. (A) Correlation between the percentage of macrophages undergoing nonlytic exocytosis and the survival of different *C. neoformans* isolates after interaction with BMDM for 24 h. (B) Correlation between the percentage of macrophages undergoing nonlytic exocytosis and the melanization score for each *C. neoformans* isolate. (C) Correlation between the percentage of macrophages undergoing nonlytic exocytosis and the time for half-maximum melanization ( $t_{HMM}$ ) for each isolate. Pearson's correlation coefficient ( $r$ ) and  $P$  values are shown in each separate graph. Each point corresponds to one *C. neoformans* isolate, and the points corresponding to control strains H99 and B3501 are colored green and purple, respectively. The solid lines exhibit the best lines fitted to the data based on a simple regression model. (D) Percentages of macrophages that underwent nonlytic exocytosis and lysis after the interaction of macrophages with nonmelanized H99, melanized H99, and a *lac1Δ* mutant as determined by two independent flow cytometry experiments, performed on different days.

Our results indicate that the frequency of nonlytic exocytosis can differ a great deal depending on the fungal isolate. The discovery that laccase could affect nonlytic exocytosis adds one more melanin-independent role for this crucial enzyme in *C. neoformans* virulence. Finally, our results corroborate the hypothesis that fungal attributes play a major role in nonlytic exocytosis regulation, as proposed previously (3), and that laccase can be added to the list of fungal attributes involved in this process, such as viability, the capsule, and production of phospholipase B and urease (2, 6, 15).

## ACKNOWLEDGMENTS

P.A., A.M.N., I.S.-P., and M.S.S.F. were supported by grants from the Brazilian funding agencies CNPq and FAP-DF. A.C. is supported by National Institutes of Health grants AI052733, AI15207, and HL059842. S.O.F., H.R.S., L.G.S., J.S.F., K.M.G., and

G.P.O. were supported by scholarships from CNPq and Capes/Brazil (Capes-Brazil, finance code 001). We acknowledge the Genomic Sciences and Biotechnology facility at the Catholic University of Brasília and the Immunology Core at Johns Hopkins University for technical support. We also acknowledge Hao Zhang from the JHBSPH flow cytometry facility, as well as Márcia Lazera and Luciana Trilles from Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

## REFERENCES

1. Ma H, May RC. 2009. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol* 67:131–190. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)01005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)01005-8).
2. Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. 2006. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* 16:2156–2160. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.032>.
3. Alvarez M, Casadevall A. 2006. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 16:2161–2165. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.061>.
4. Chayakulkeeree M, Johnston SA, Oei JB, Lev S, Williamson PR, Wilson CF, Zuo X, Leal AL, Vainstein MH, Meyer W, Sorrell TC, May RC, Djordjevic JT. 2011. SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 80: 1088–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07632.x>.
5. Voelz K, Lammas DA, May RC. 2009. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77:3450–3457. <https://doi.org/10.1128/IAI.00297-09>.
6. De Leon-Rodriguez CM, Fu MS, Çorbali MO, Cordero RJB, Casadevall A. 2018. The capsule of *Cryptococcus neoformans* modulates phagosomal pH through its acid-base properties. *mSphere* 3:e00437-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00437-18>.
7. Garelnabi M, Taylor-Smith LM, Bielska E, Hall RA, Stones D, May RC. 2018. Quantifying donor-to-donor variation in macrophage responses to the human fungal

pathogen *Cryptococcus neoformans*. PLoS One 13: e0194615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194615>.

8. Stukes S, Casadevall A. 2014. Visualizing non-lytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages using digital light microscopy. J Vis Exp 2014:e52084. <https://doi.org/10.3791/52084>.

9. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods 223:77–92. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00204-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00204-x).

10. Nicola AM, Casadevall A. 2012. In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. Methods Mol Biol 844:189 –197. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-527-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-527-5_14).

11. de Sousa HR, de Oliveira Júnior GP, Frazão SDO, Gorgonha KCDM, Rosa CP, Garcez EM, Lucas Júnior J, Correia AF, de Freitas WF, Paes HC, Trilles L, Lazera MDS, Pinto Júnior VL, Felipe MSS, Casadevall A, Silva-Pereira I, Albuquerque P, Nicola AM. 2020. Faster *Cryptococcus* melanization increases virulence in experimental and human cryptococcosis. bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.07.29.222794>.

12. Nicola AM, Robertson EJ, Albuquerque P, Derengowski LDS, Casadevall A. 2011. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. mBio 2:e00167-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00167-11>.

13. Erb-Downward JR, Noggle RM, Williamson PR, Huffnagle GB. 2008. The role of laccase in prostaglandin production by *Cryptococcus neoformans*. Mol Microbiol 68:1428 –1437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06245.x>.

14. Liu L, Tewari RP, Williamson PR. 1999. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. Infect Immun 67:6034 –6039. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.11.6034-6039.1999>.

15. Fu MS, Coelho C, De Leon-Rodriguez CM, Rossi DCP, Camacho E, Jung EH, Kulkarni M, Casadevall A. 2018. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. PLoS Pathog 14:e1007144. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007144>.

## **Capítulo 2:**

*Cryptococcus* é estudado a décadas e diversos fatores de virulência estão descritos na literatura como importantes para que esse fungo se estabeleça e cause doença em humanos. Na tentativa de confirmar a importância desses fatores de virulência durante a criptococose e traçar o perfil dessa doença no DF, nosso grupo analisa diversos fatores de virulência de isolados clínicos do DF e vem tentando fazer correlações entre a expressão desses fatores de virulência com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes dos quais os isolados clínicos foram obtidos.

Recebemos amostras de isolados clínicos advindos de pacientes diagnosticados e tratados em hospitais da rede pública do DF, contabilizando ao estudo 54 pacientes. Desses pacientes tivemos dados clínicos de 48. Dos quais coletamos dados demográficos, fatores de risco, informações clínicas e desfecho da enfermidade. É importante ressaltar que esses mesmos isolados já foram utilizados por outros alunos do nosso grupo (Herdson Renney e Joaquim) e os dados clínicos também já foram descritos em seus trabalhos, inclusive no artigo publicado pelo nosso grupo em 2022 (DE SOUSA et al., 2022).

### ***Dados demográficos***

Os pacientes eram em sua maioria do sexo masculino (68,75%) e a idade média foi de 40,95 anos, onde o paciente mais novo tinha 4 anos e o mais velho 85 anos, e a maioria tinha entre 20 e 59 anos.

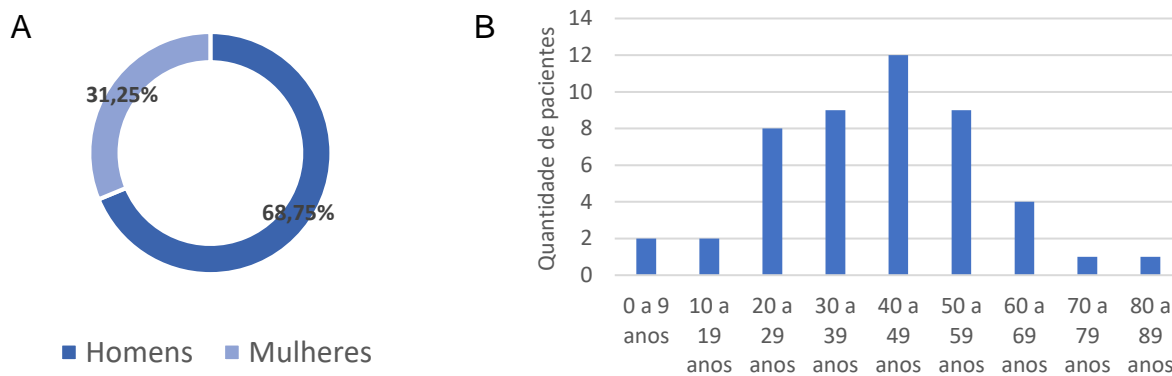


Figura 7: perfil dos pacientes com criptococose atendido pela rede pública do Distrito Federal-dados demográficos: (A) sexo dos pacientes, (B) idade dos pacientes: as colunas indicam quantidade de pacientes em cada faixa de idade.

### **Fatores de risco**

O curso da infecção por *Cryptococcus* depende de fatores de virulência do fungo, mas o status fisiológico do paciente também é muito importante, pois pode conferir vantagens, fazendo com que o paciente não desenvolva a doença, ou riscos para o paciente, que culminando em infecções severas e morte. Nos nossos pacientes, avaliamos como fatores de risco a presença de infecção pelo HIV, diabetes, insuficiência hepática e imunodeficiência primária e o uso de imunomoduladores. 72,92% dos pacientes eram HIV positivos. Três dos pacientes tinham diabetes, 1 tinha imunodeficiência primária e 5 faziam uso de corticoides, 1 usava inibidor de TNF-alfa e 1 outro imunomodulador (Tabela 1).

<b>Tabela 1: Fatores de risco para Criptococose</b>	
<b>Fator de risco</b>	Quantidade de pacientes (%)
<b>Infecção por HIV</b>	Positivo: 35 (72,92%) Negativo: 12 (25%) Sem informação: 1 (2,08%)
<b>Diabetes</b>	Sim: 3 (6,25%) Não: 40 (83,33%) Sem informação: 5 (10,42%)
<b>Imunodeficiência primária</b>	1 (2,08%)
<b>Uso de imunomoduladores</b>	7 (14,58)

### ***Informações clínicas***

Quando a infecção se estabelece ela pode se limitar ao pulmão ou disseminar para outros sítios anatômicos. A partir do local afetado pela infecção, avaliamos o tipo de criptococose. 91,66% dos pacientes tiveram comprometimento do SNC, 1 (2,08%) paciente apresentou criptococose cutânea, 2 (4,16%) tiveram criptococose pulmonar e 4 (8,33%) fungemia, sendo que 3 desses também estavam com comprometimento no SNC.

Avaliamos também os prognósticos desses pacientes no primeiro dia de admissão no hospital. Onde verificamos se o paciente apresentava confusão, redução de consciência, coma, deficiência neurológica focal e hipertensão intracraniana. 16 pacientes (33,33%) apresentaram confusão, 2 (4,16%) estavam com o nível de consciência reduzido, 21 pacientes (43,75%) apresentaram deficiência neurológica focal, 20 (41,66%) pacientes tiveram hipertensão intracraniana e 13 deles não apresentaram nenhum dos parâmetros e alguns apresentaram mais de um.

### ***Desfecho***

Como desfecho, avaliamos se o paciente foi a óbito ou recebeu alta e a presença de sequelas. Observamos que 27 pacientes faleceram (56,25%), 19 receberam alta

(39,58%) e tivemos 2 perdas de seguimento (4,16%). Dos que receberam alta, 3 tiveram mudanças visuais como seqüela.

A partir dos 54 isolados geramos dados de interação macrófago-*Cryptococcus* (percentual de fagocitose, Índice Fagocítico, Sobrevida pós interação) e fatores de virulência (Produção de urease, produção de fosfolipase e susceptibilidade a antimicrobianos). E de 19 deles fizemos microscopia de lapso de tempo para avaliação da exocitose não lítica.

### **Avaliação de exocitose não lítica do isolados clínicos de *Cryptococcus spp***

A exocitose não lítica é o principal mecanismo avaliado neste presente estudo. Ela foi descrita em *Cryptococcus* a quase duas décadas e tem sido estudada por diversos grupos de pesquisa, na tentativa e elucidar os mecanismos para que esse evento ocorra. Contudo tem encontrado entraves pela falta de formas confiáveis de estimular ou inibir a exocitose não lítica. Com um objetivo paralelo ao de trazer informações sobre o impacto da exocitose não lítica na criptococose, também tentamos correlacioná-la como outros fatores de virulência a fim de obter mais informações sobre esse mecanismo.

Diferente do capítulo 1 que realizávamos os experimentos no microscópio invertido da Zeiss, para o capítulo 2, o método que utilizamos para análise de eventos de exocitose não lítica foi a videomicroscopia por lapso de tempo no equipamento Evos por 24 horas, onde foi possível visualizar a interação dos macrófagos com as células fúngicas nesse período. Acompanhamos as 24 horas de 100 macrófagos de cada grupo. Observamos que, assim como os nossos controles (H99 e R265), 78,94% dos isolados foram capazes de realizar exocitose não líticas nas condições testadas. As taxas variaram entre 0% e 19% de exocitose não lítica, com mediana de 3% (Figura 8). Quanto a sobrevida dos macrófagos nessa interação, vimos que a mediana de sobrevida foi de 87%, cuja sobrevida dos isolados variaram de 67% a 99% (Tabela 2). Notamos também que em todas as interações os macrófagos que haviam internalizado leveduras se reproduziam. Entretanto não observamos ocorrência de transferência lateral (dragocitose) pelos isolados.

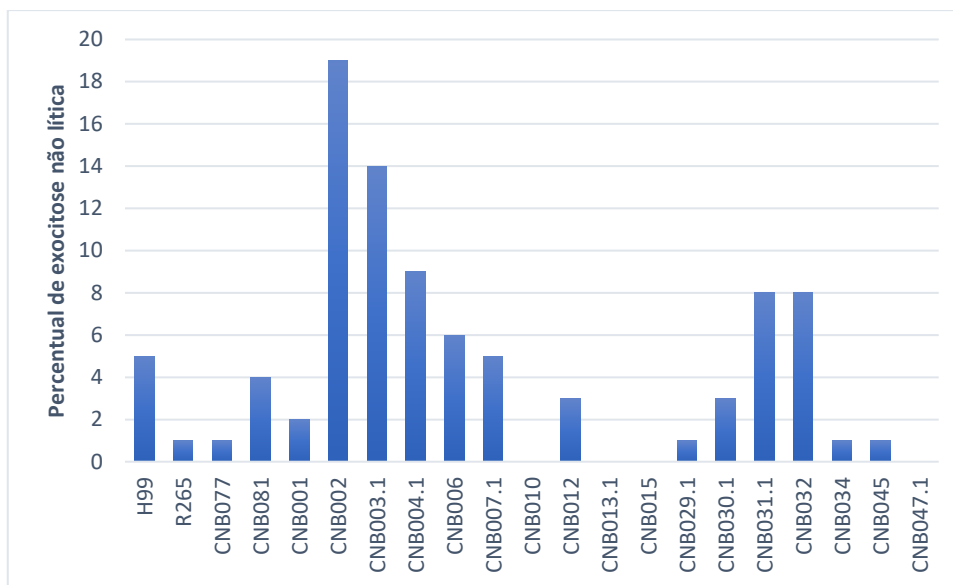


Figura 8: **Ocorrência de excitose não lítica dos isolados**: Analisamos 100 macrófagos por isolado durante 24 horas via videomicroscopia no Evos a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Computamos a porcentagem de excitose não lítica de cada isolado clínico representadas pelas barras.

Isolado	% de Excitose não Lítica	% de macrófagos vivos em 24 horas	% de reprodução celular dos macrófagos.
H99	5	94	27
R265	1	87	9
CNB077	1	85	16
CNB081	4	91	33
CNB001	2	99	43
CNB002	19	96	26
CNB003.1	14	95	30
CNB004.1	9	93	24
CNB006	6	92	19
CNB007.1	5	87	15
CNB010	0	77	18

<b>CNB012</b>	3	67	13
<b>CNB013.1</b>	0	67	14
<b>CNB015</b>	0	74	9
<b>CNB029.1</b>	1	93	55
<b>CNB030.1</b>	3	85	49
<b>CNB031.1</b>	8	81	50
<b>CNB032</b>	8	83	36
<b>CNB034</b>	1	93	68
<b>CNB045</b>	1	91	63
<b>CNB047.1</b>	0	79	47

Como dito anteriormente, no início do projeto utilizávamos o microscópio invertido da Zeiss, esse equipamento apresentou um defeito e tivemos que mudar para o EVOS. Comparando os resultados subjetivamente, no EVOS teve uma redução da ocorrência de exocitose não lítica e aumento no número de mortes. Quando comparamos nosso controle H99 que foi feito em ambos os equipamentos, confirmamos essa diferença. No microscópio invertido, tivemos taxa de exocitose não lítica de 79% contra 5% no EVOS e taxa de morte de 13% no EVOS contra apenas 1% no microscópio invertido (Tabela 3). Os percentuais de exocitose não lítica observados no Evos estão mais próximos aos apontados na literatura, mas esse equipamento, por ser mais simples, conta com um sistema de incubação menos preciso que por muitas vezes levou a morte dos macrófagos.

<b>Tabela 3: Comparativo da videomicroscopia da cepa H99 no microscópio invertido Zeiss x EVOS</b>				
<b>Cepa</b>	<b>% de Exocitose Não Lítica</b>	<b>% Vivas em 24 horas</b>	<b>% mortas em 24 horas</b>	<b>% Repiques</b>
<b>H99 - Microscópio Zeiss</b>	79	99	1	51
<b>H99 - EVOS</b>	5	87	13	15

### **Correlação com a sobrevivência dos pacientes com criptococose do Distrito Federal**

Na tentativa de obter mais informações sobre a importância da exocitose não lítica e fatores que pudessem contribuir para esse mecanismo, fizemos algumas análises de correlação entre o processo de exocitose não lítica com a sobrevivência dos pacientes com criptococose e os fatores de virulência vistos nesse projeto e pelo nosso grupo.

Com base nos dados analisados, o percentual de exocitose não-lítica não demonstrou uma correlação com a sobrevivência dos pacientes, uma vez que a estimativa de risco foi e 1,045 assim como a idade dos pacientes (Tabela 4). A sobrevivência dos pacientes no entanto mostrou uma correlação positiva com gênero do paciente, onde homens possuem um risco maior de falecimento quando comparados a mulheres, com uma estimativa de risco de 2,381 (Tabela 4). Estar infectado pelo vírus HIV também parece aumentar o risco de óbito desses pacientes, com uma estimativa de risco de 14,91 (Tabela 4). Um dado já esperado, haja vista que a infecção por HIV já foi definida como a principal causa de imunossupressão em pacientes com criptococose e a criptococose é um fator definidor de AIDS (COGLIATI, 2013).

<b>Tabela 4: Correlação com a Sobrevivência de pacientes com Criptococose do Distrito Federal</b>			
<b>Razões de Risco</b>	<b>Variável</b>	<b>Estimativa</b>	<b>95% CI (perfil de probabilidade)</b>
<b>exp(<math>\beta_1</math>)</b>	Gênero [2]	2.381	0.3557 to 15.37
<b>exp(<math>\beta_2</math>)</b>	Idade	0.9120	0.8172 to 0.9936
<b>exp(<math>\beta_3</math>)</b>	Status de infecção por HIV [1]	14.91	1.188 to 537.3
<b>exp(<math>\beta_4</math>)</b>	Percentual Exocitose não lítica	1.045	0.8302 to 1.296

### **Correlação entre interações macrófago-*Cryptococcus***

A interação entre o *Cryptococcus* e os macrófagos é importante para o desfecho da infecção, podendo culminar em uma infecção autolimitada e assintomática ou até o óbito do paciente. Frente a essa importância, avaliaremos a interação macrófago-*Cryptococcus*, e para tal utilizamos três testes. No teste de fagocitose tínhamos como objetivo avaliar a capacidade dos macrófagos de fagocitar os isolados clínicos, uma vez que a fagocitose é uma etapa importante para que os macrófagos consigam montar uma resposta contra o patógeno. Observamos que os macrófagos foram capazes de internalizar todos os isolados além dos controles (H99 e R265), os isolados apresentaram uma mediana de percentual de fagocitose de 87,83%, em um intervalo de 25% e 95,66% (Tabela 5). A partir dos macrófagos que fizeram fagocitose, calculamos o índice fagocítico, que indica a média de *Cryptococcus* internalizados por macrófagos. O índice de fagocitose dos isolados variou entre 1,74 e 4,2031, com uma média de 2,8145 (Tabela 5).

Uma vez que o macrófago é a principal célula efetora da resposta imunitária contra *Cryptococcus*, avaliamos a capacidade dos isolados clínicos de sobreviver as atividades microbicidas dos macrófagos, através da sobrevivência de *Cryptococcus* após interação de 24 horas com macrófagos J774. Para avaliação do índice de sobrevivência fúngica, consideramos que valores maiores que 1,2 indicam uma maior capacidade de

sobrevivência e replicação do isolado após a interação, valores menores que 0,7 indicam que os isolados morreram e no intervalo de  $0,7 > 1,2$  indicam que os isolados se mantiveram vivos e não se replicaram. Os controles H99 e R265 foram capazes de sobreviver a interação com macrófagos e proliferar, assim como 8 dos nossos isolados (42,10%), 8 isolados sobreviveram a interação sem proliferar (42,10%) e 3 isolados não resistiram as atividades microbicidas dos macrófagos (15,78%) (Tabela 5).

<b>Tabela 5: Avaliação da interação Macrófagos-<i>Cryptococcus</i></b>			
<b>Isolado</b>	<b>% fagocitose</b>	<b>Índice fagocítico</b>	<b>Sobrevivência das leveduras após interação</b>
<b>H99</b>	89,66667	3,652747833	1,548333
<b>R265</b>	95,16667	3,349159	1,34
<b>CNB077</b>	87,83333	3,251545	2,021667
<b>CNB081</b>	90	3,588361833	1,576667
<b>CNB001</b>	90,33333	3,655549167	1,826667
<b>CNB002</b>	77,5	3,262458167	1,603333
<b>CNB003.1</b>	74,16667	2,639210333	1,526667
<b>CNB004.1</b>	64	2,5243445	0,841667
<b>CNB006</b>	52	2,627557	1,033333
<b>CNB007.1</b>	55,33333	2,172356	1,606667
<b>CNB010</b>	25	1,887682833	0,223333
<b>CNB012</b>	61,66667	1,740035	0,575
<b>CNB013.1</b>	49	1,813321667	0,99
<b>CNB015</b>	53,5	1,909278333	0,421667
<b>CNB029.1</b>	91,66667	3,466056667	0,72
<b>CNB030.1</b>	94,5	3,273452	0,923333
<b>CNB031.1</b>	88,16667	2,687453333	0,98

<b>CNB032</b>	94,5	2,99198	0,73
<b>CNB034</b>	95,66667	4,203183167	0,84
<b>CNB045</b>	92	2,981617833	1,656667
<b>CNB047.1</b>	94,33333	2,801097	1,846667
<b>Média:</b>	75,32456	2,814554728	1,154912

Ao correlacionarmos exocitose não lítica com fagocitose, nossos dados mostraram uma estimativa de risco de 0,9332, (Tabela 6) indicando que não há correlação do percentual de macrófagos que internalizaram fungo durante a interação com o percentual de macrófagos que fizeram exocitose não lítica. Porém a quantidade de fungos internalizados parece importante, uma vez que observamos uma possível correlação entre os macrófagos que fagocitam mais leveduras de um determinado isolado com aqueles que fazem mais exocitose não lítica, com uma estimativa de risco 5,16 (Tabela 6). Assim como a sobrevivência dos fungos após 24 horas de interação com macrófagos. Com uma estimativa de 4,388 (Tabela 6), vimos que quanto maior a capacidade de sobreviver e se replicarem dentro dos macrófagos maiores são as taxas de exocitose não lítica.

<b>Tabela 6: Correlação da ocorrência de exocitose não lítica com fagocitose e sobrevivência do fungo após a interação</b>			
<b>Razões de risco</b>	<b>Variável</b>	<b>Estimativa<sup>valor de p</sup></b>	<b>95% CI (perfil de probabilidade)</b>
<b>exp(<math>\beta_1</math>)</b>	Fagocitose	0,9332**	0.8875 to 0.9789
<b>exp(<math>\beta_2</math>)</b>	Índice de fagocitose	5,16**	1.803 to 15.66
<b>exp(<math>\beta_3</math>)</b>	Sobrevida após interação com macrófagos	4,388**	1.635 to 12.96

### **Correlação entre fatores de virulência e demais fatores de virulência.**

Nesse presente estudo além dos testes de interação macrófago-*Cryptococcus*, realizamos testes para avaliar a expressão de atividade de fosfolipase e urease dos diferentes isolados clínicos.

#### ***Fosfolipase***

A fosfolipase são enzimas que hidrolisam as ligações fosfodiéster dos lipídios presentes na membrana celular do *Cryptococcus*, sendo crucial na degradação das membranas de macrófagos, favorecendo a invasão e a evasão das leveduras (DJORDJEVIC et al., 2005). Além de favorecer a produção e mediadores inflamatório que contribuem para formação de um ambiente favorável para a persistência do fungo. A fosfolipase já foi descrita como participadora nos mecanismos de Exocitose não lítica (CHAYAKULKEEREE et al., 2011). Com isso, levantamos a hipótese de que a intensidade de fosfolipase produzida influenciaria nos eventos de exocitose não lítica.

A análise de fosfolipase foi feita por um método semi-quantitativo onde crescemos os isolados em meio enriquecido com gema de ovo e avaliamos a formação de um halo ao redor da colônia em um crescimento de 5 dias. A atividade de fosfolipase (valor de Pz) é a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia total e a zona de precipitação ao seu redor. A partir da medida do halo classificamos a atividade como negativa (Pz= 1), positiva (Pz: 0,64 - 1) ou fortemente positiva (Pz ≤ 0,64). Todos os isolados produziram fosfolipase em alguma intensidade. 11 deles foram classificados como positiva e 42 como fortemente positivo (Figura 9). Sabe-se que a Fosfolipase B não é a única fosfolipase presente no *Cryptococcus* justificando assim a ausência de negatividade do controle negativo. Ao avaliarmos se existe alguma correlação entre a intensidade da produção de fosfolipase e a ocorrência de exocitose não lítica, não observamos uma correlação entre a atividade de fosfolipase pelos isolados e o processo de exocitose não-lítica (Tabela 7). Também não houve correlação com a intensidade de atividade de Fosfolipase com a sobrevivência dos pacientes (dados não mostrados).

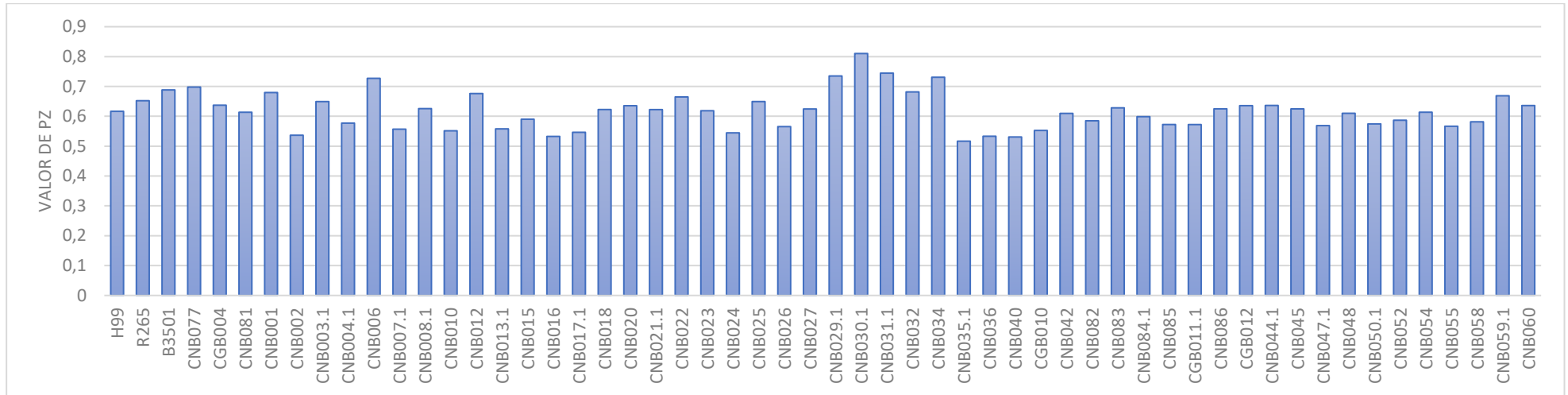


Figura 9: Avaliação da atividade de Fosfolipase pelos isolados. Os diferentes isolados clínicos de *C. neoformans* foram crescidos em meio enriquecido com gema de ovo por 5 dias. Após esse período, foi mensurada a formação de um halo de digestão dos fosfolipídeos ao redor de cada colônia, calculando-se o valor de Pz (atividade de fosfolipase). Pz=1 atividade negativa, Pz entre 0,64 – 1 atividade positiva e Pz ≤ 0,64 atividade fortemente positiva.

<b>Tabela 7: Correlação da ocorrência de exocitose não lítica com produção de enzimas</b>			
<b>Razões de risco</b>	Variável	Estimativa <sup>valor de p</sup>	95% CI (perfil de probabilidade)
<b>exp(β4)</b>	Fosfolipase [Produtor muito positivo]	2,254 <sup>ns</sup>	0.7288 to 8.628
<b>exp(β7)</b>	Urease Top	1,013 <sup>***</sup>	1.006 to 1.021
<b>exp(β8)</b>	Urease IC50	0,9998 <sup>**</sup>	0.9997 to 0.9999
<b>exp(β9)</b>	Urease HillSlope	0,3515 <sup>ns</sup>	0.05445 to 2.358

### **Produção de atividade de *Urease***

Outra enzima importante para a patogênese da criptococose é a urease. Ela foi descrita como participante no processo de disseminação para o SNC e também por manipula o microambiente dentro dos fagócitos permitindo o crescimento do *Cryptococcus* (OLSZEWSKI et al., 2004; SHI et al., 2010; SINGH et al., 2013). Além disso, induz uma resposta não protetora durante a infecção pulmonar (OSTERHOLZER et al., 2009a). Recentemente foi descrita como importante para o processo de exocitose não lítica (FU et al., 2018). A avaliação da atividade de urease nesses estudos geralmente mostram a atividade como positiva ou negativa, não fornecendo informações quantitativa. Por isso, nos propusemos a estabelecer um método mais quantitativo para a avaliação da atividade de urease e posteriormente, investigar a relação da atividade de urease com eventos de exocitose não lítica. Visto que ambos possuem relação com a infecção do SNC, levantamos a hipótese de que a cinética de consumo de ureia pela urease influenciaria na ocorrência de exocitose não lítica.

Para a avaliação da urease, utilizamos um método quantitativo onde crescemos os diferentes isolados em meio urease de Christensen e observamos o consumo da ureia do meio durante 8h por espectrofotometria (leituras a cada 5 minutos) por meio da mudança de cor do meio que contém um indicador de pH. Se o organismo testado produz urease, a enzima degrada a ureia no meio, liberando amônia (NH<sub>3</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A amônia aumenta o pH do meio, tornando-o alcalino. O indicador de pH, fenol vermelho, muda de cor em resposta à alteração no pH: sendo o meio inicialmente de cor

amarela indicando um pH ácido e no caso de produção de atividade de urease, o meio muda para uma coloração rosa indicando a alcalinização do meio em resposta a atividade de urease.

A partir dessas leituras foram geradas curvas da atividade de urease. Em um experimento piloto, também fotografamos a placa para avaliar visualmente a mudança de cor. Conforme pode ser observado na Figura 10, não houve mudança de cor nos poços onde cultivamos uma linhagem mutante para urease (*ure1*Δ) confirmando a atividade negativa dessa enzima nesse mutante e podemos observar a atividade positiva nos poços onde crescemos três linhagens controle, *C. neoformans* H99, *C. neoformans* B3501 e *C. gattii* R265. No entanto, não é possível distinguir visualmente diferenças entre as três linhagens. Por sua vez, ao avaliarmos a cinética de atividade de urease por essas diferentes linhagens ao longo de 8h podemos diferenciar importantes entre estas, observando que a produção de urease pelo isolado *C. gattii* R265 é bem mais lenta que a dos isolados de *C. neoformans* H99 e B3501, conforme pode ser observado na Figura 10.

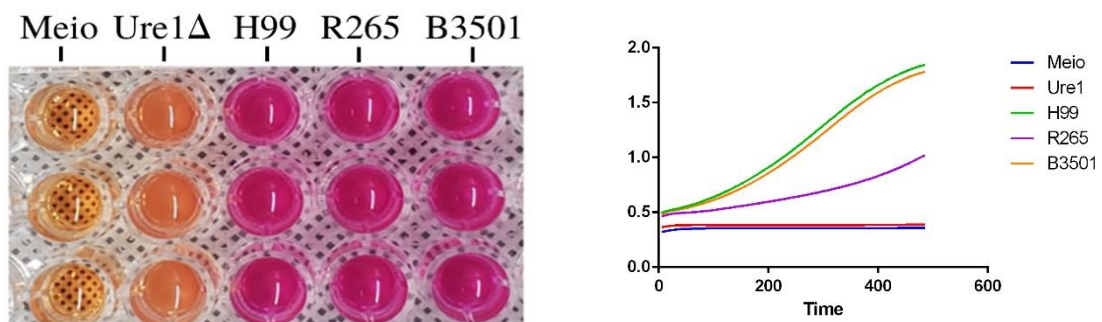


Figura 10: Teste piloto para avaliação da atividade de urease nas cepas controles (H99 e B3501 de *C. neoformans*, R265 de *C. gattii* e *Ure1*Δ *Cryptococcus neoformans* mutante que não produz urease. Experimento feito em triplicata e com leituras a cada 5 minutos por 8 horas

A partir das curvas geradas de atividade de urease dos isolados clínicos, calculamos os valores de Top, EC50 e HillSlop (Dados mostrados na Tabela 8). Esses Com esses valores conseguimos avaliar a atividade máxima de urease para cada isolado (Top), o tempo médio em que a urease produzida por cada isolado leva para chegar a 50% do valor máximo de conversão da ureia (EC50) e a velocidade da conversão da ureia pela urease produzida por cada isolado (HillSlop).

<b>Tabela 8: Avaliação da atividade de urease dos isolados clínicos</b>			
	Top	EC50	Hillslope
<b>Ure1</b>	0,6417	24,4	0,7999
<b>H99</b>	2,714	388,5	2,24
<b>R265</b>	369,5	ND	1,875
<b>B3501</b>	2,648	398	2,332
<b>CNB077</b>	65,02	13423	1,396
<b>CGB004</b>	32,36	4471	1,563
<b>CNB081</b>	41,02	7663	1,463
<b>CNB001</b>	24,64	8007	1,363
<b>CNB002</b>	44,11	8820	1,576
<b>CNB003.1</b>	3,743	962	1,888
<b>CNB004.1</b>	17,96	2488	1,872
<b>CNB006</b>	54,37	ND	1,345
<b>CNB007.1</b>	2,79	639,7	2,155
<b>CNB008.1</b>	2,92	1395	1,58
<b>CNB010</b>	2,607	371,2	2,504
<b>CNB012</b>	144,8	8865	1,685
<b>CNB013.1</b>	127,3	10057	1,617
<b>CNB015</b>	3,158	497,3	2,005
<b>CNB016</b>	400,2	16399	1,713
<b>CNB017.1</b>	198,3	19269	1,62
<b>CNB018</b>	2,759	875,3	1,731
<b>CNB020</b>	97,04	17194	1,568
<b>CNB021.1</b>	9,875	2888	1,581

<b>CNB022</b>	4,355	1523	1,521
<b>CNB023</b>	4,213	1105	1,77
<b>CNB024</b>	50,5	9404	1,554
<b>CNB025</b>	3,822	1126	1,793
<b>CNB026</b>	274,3	ND	1,835
<b>CNB027</b>	74,53	21837	1,417
<b>CNB029.1</b>	78,15	11557	1,612
<b>CNB030.1</b>	53,65	13377	1,507
<b>CNB031.1</b>	384,2	17855	1,754
<b>CNB032</b>	195,4	ND	1,425
<b>CNB034</b>	19,37	4665	1,489
<b>CNB035.1</b>	54,54	13923	1,43
<b>CNB036</b>	148,2	12083	1,765
<b>CNB040</b>	303,3	ND	1,456
<b>CGB010</b>	35,58	16479	1,4
<b>CNB042</b>	53,51	9323	1,626
<b>CNB082</b>	55,74	10909	1,658
<b>CNB083</b>	18,03	5747	1,603
<b>CNB084.1</b>	146,6	17415	1,639
<b>CNB085</b>	35,48	11345	1,424
<b>CGB011.1</b>	1,301	1088	1,534
<b>CNB086</b>	2,784	1442	1,586
<b>CGB012</b>	210,3	ND	1,622
<b>CNB044.1</b>	1,708	516,6	2,33
<b>CNB045</b>	3,231	1191	1,763
<b>CNB047.1</b>	131,6	15600	1,524
<b>CNB048</b>	13,23	2966	1,86
<b>CNB050.1</b>	104,4	10019	1,744

<b>CNB052</b>	1,386	321,7	2,619
<b>CNB054</b>	12,8	3078	1,615
<b>CNB055</b>	31,13	13020	1,311
<b>CNB058</b>	2,532	694,9	1,928
<b>CNB059.1</b>	148,4	ND	1,667
<b>CNB060</b>	162,6	16145	1,717

Ao correlacionarmos os valores de Top, EC50 e HillSlop das curvas de urease com a ocorrência de exocitose não lítica, verificamos que não existe uma correlação entre eles, pois os valores das estimativas estavam muito próximos do 1 ou não foram significativas (Tabela 7). Assim como não observamos correlação de Top, EC50 e HillSlop com a sobrevivência dos pacientes. Observamos que para alguns dos isolados a produção de urease é muito mais lenta, não sendo possível para esses determinar o EC50.

### ***Melanina e Lacase***

Tentamos também correlacionar a ocorrência de exocitose não-lítica com a expressão de outros fatores de virulência previamente caracterizados por nosso grupo, mas perdemos alguns isolados por não ter analisados a expressão de alguns dos fatores de virulência para alguns desses isolados. A melanina e a lacase foram estudadas no capítulo 1 desse estudo, onde vimos que a lacase, independente da melanina, tem um papel nos eventos de exocitose não lítica. Sendo assim, correlacionamos a lacase de células inteiras (LacCell96) e lacase secretada no meio (LacSec). Encontramos uma possível correlação da Lacase presente na célula inteira, onde vimos uma estimativa de risco de 94.33, mas foi um valor não significativo, possivelmente pela quantidade reduzida de isolados (Tabela 9). Usando regressão logística a produção de melanina de cada isolado foi avaliada quantitativamente. Correlacionamos a ocorrência de exocitose não lítica com o tempo em que cada colônia leva para atingir metade da intensidade de melanização final (melEC50) e tivemos uma estimativa de risco de 0,3302, porém esse

dado não foi significativo assim como melTOP, que nos mostra a quantidade final de melanina produzida por cada isolado (Tabela 9).

**Tabela 9: Correlação da ocorrência de exocitose não lítica com produção de melanina e atividade de lacase.**

Razões de risco	Variável	Estimativa <sup>valor de p</sup>	95% CI (perfil de probabilidade)
<b>exp(β6)</b>	melEC50	0,3302 <sup>ns</sup>	0.03235 to 2.675
<b>exp(β7)</b>	melTOP	0,004773 <sup>ns</sup>	1.344e-005 to 1.841
<b>exp(β9)</b>	LacCell96	94,33 <sup>ns</sup>	0.6313 to 312050
<b>exp(β10)</b>	LacSec	0,0004754 <sup>ns</sup>	4.223e-010 to 2.824

### **Crescimento fúngico**

O crescimento celular é necessário para que um patógeno possa se estabelecer no hospedeiro. Para análise do crescimento fúngico, os isolados foram cultivados em meio mínimo sob agitação constante a 37°C com leituras a cada 30 minutos por 72 horas em espectrofotometro. A partir dessas leituras geramos as curvas de crescimento de cada isolado e obtivemos o Growthk, que o crescimento máximo do isolado, Growthr que é a taxa de crescimento intrínseca de cada isolado e Growthmid, que é indica a velocidade de crescimento fúngico. Vimos que Growthk e Growthr apesar de apresentar uma estimativa de risco alta, o valor de p não foi significativo. Mas observamos uma correlação com a velocidade de crescimento e a ocorrência de exocitose não lítica, com uma estimativa de risco de 0,000255 (Tabela 2Tabela 10) esse valor sugere que quanto menor o tempo que o isolado leva para crescer maior a chance de ocorrer uma maior quantidade de exocitose não lítica na sua interação com macrófagos. Ou seja, quanto mais rápido o fungo cresce, maior a probabilidade que ele escape por exocitose não lítica (Figura 11).

**Tabela 10: Correlação da ocorrência de exocitose não lítica com crescimento fúngico**

Razão de riscos	Variável	Estimativa Valor de p	95% CI (perfil de probabilidade)
<b>exp(β11)</b>	Growthk	96364 <sup>ns</sup>	3.040 to 2136623700819
<b>exp(β12)</b>	Growthr	1261 <sup>ns</sup>	0.3662 to 126183329
<b>exp(β13)</b>	Growthmid	0,0002555****	7.490e-007 to 0.006126

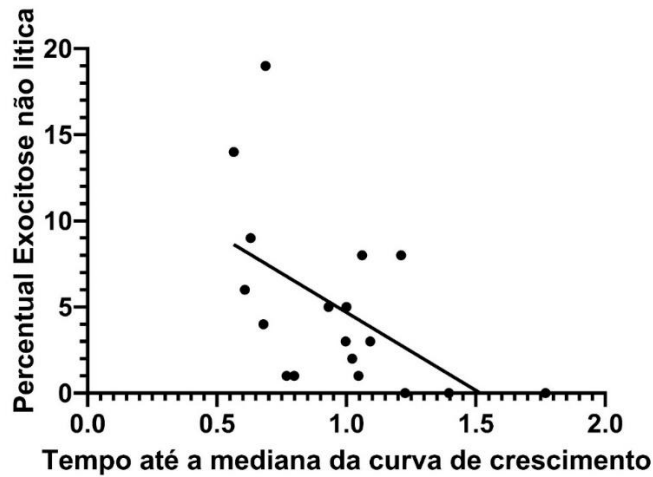


Figura 11: Correlação entre o tempo de crescimento dos isolados e a ocorrência de exocitose não lítica na interação de isolados clínicos de *C. neoformans* e macrófagos.

## Discussão

Não observamos uma correlação entre o processo de exocitose não-lítica e a sobrevivência dos pacientes dos quais os isolados clínicos foram obtidos. Isso pode ser devido ao baixo número de isolados clínicos para os quais conseguimos gerar dados de exocitose não-lítica. Apesar de termos inicialmente cerca de 50 isolados clínicos dos quais tínhamos informações clínicas sobre os pacientes, só conseguimos avaliar o processo de exocitose não-lítica em cerca de 20 isolados. Uma diferença importante entre os experimentos do primeiro capítulo da minha tese e os do segundo capítulo, foi a mudança no equipamento usado para os experimentos de vídeomicroscopia. Infelizmente o microscópio que usamos para os experimentos do primeiro capítulo apresentou problemas técnicos que impediram a realização de experimentos de vídeomicroscopia e como alternativa usamos o equipamento Evos, que possui uma resolução mais baixa, e um sistema de incubação de células menos preciso, que muitas vezes levava a morte dos macrófagos e a necessidade de interrompermos os experimentos. Essas dificuldades impediram a análise do processo de exocitose não-lítica num número maior de isolados e também resultou em percentuais de exocitose não-lítica bem menores que os que observamos no equipamento anterior.

Observamos uma correlação positiva entre a sobrevivência dos pacientes com o sexo (masculino) e a infecção por HIV, em conformidade com dados já relatados na

literatura. O National Institutes of Health (NIH), em 2016, começou a exigir que as pesquisas fossem realizadas em ambos os sexos biológicos, uma vez que metabolismo e outros processos físicos podem se divergir entre homens e mulheres (ARNEGARD et al., 2020). Na criptococose, as evidências de que homens eram mais afetados que mulheres ganhou evidência no início da epidemia de AIDS (GUESS; ROSEN; MCCLELLAND, 2018). Diversos artigos descrevem que o risco para infecção por *Cryptococcus* é maior para homens, onde a depende da região, 70% ou mais da população de estudo é composta por homens (SHAHEEN et al., 2018). Essa característica de prevalência em homens também foi evidenciada em nosso estudo, onde 68,75% dos pacientes são do sexo masculino. Um estudo retrospectivo nos EUA evidenciou que houve um aumento na incidência de Criptococose em homens e que eles tinham uma probabilidade de ser internado três vezes maior e se tivessem AIDS essa probabilidade era de quatro vezes. Além disso, homens tinham três vezes mais probabilidade de morrer (GUESS; ROSEN; MCCLELLAND, 2018). Na tentativa de explicar essa maior susceptibilidade para homens, estudos sugerem que a testosterona pode suprimir a resposta imune, em contraste o estrogênio aumenta a resposta imune (MCCLELLAND et al., 2013). Além dessas questões biológicas, alguns pesquisadores sugerem que pode haver uma maior exposição em homens, uma maior quantidade de pacientes HIV positivos e uma baixa adesão ao tratamento por pacientes do sexo masculino (GUESS; ROSEN; MCCLELLAND, 2018).

A infecção por HIV é a principal causa de imunodeficiência em pacientes com criptococose (LIMA; KLAFKE; XAVIER, 2016; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014), conseguimos observar essa característica também nos pacientes desse estudo, sendo que 72,92% dos pacientes eram HIV positivos enquanto as taxas de pacientes com outras causas de imunodeficiência foram bem baixas. Observamos também que ser HIV positivo aumenta risco de morte para pacientes com criptococose. Uma possível variável que influencia na gravidade da infecção desses pacientes é a exocitose não lítica. (SEOANE et al., 2020) analisaram a exocitose não líticas em células infectadas pelo vírus HIV e viram que há um aumento da exocitose não lítica por essas células. E a hipótese levantada por eles é de que quando os eventos de exocitose não lítica quando ocorre no SNC pode ser prejudicial ao paciente pois permite que as

leveduras escapem da ação de fagócitos e cresçam rapidamente no ambiente extracelular.

Os macrófagos têm papel central na imunidade da criptococose (DROMER et al., 2014). Eles são responsáveis por reconhecer as leveduras, engolfá-las e montar uma resposta para eliminá-las (CAMPUZANO; WORMLEY, 2018). A fagocitose é um passo primordial nesse processo, pois a partir dele possibilita diversos processos que determinam a sobrevivência do *Cryptococcus* e desenvolvimento da criptococose aconteçam (OSTERHOLZER et al., 2009a; SORRELL et al., 2016). Nossos dados não demonstraram uma correlação entre a ocorrência de exocitose não lítica com o percentual de fagocitose, mas sim uma possível correlação entre a quantidade de leveduras fagocitadas por esses macrófagos com esse processo, assim como da capacidade das leveduras de sobreviverem a interação macrófago-*Cryptococcus*. Tanto em macrófagos quanto em neutrófilos foram demonstrados que a viabilidade da levedura é fundamental, pois a exocitose não lítica de células fúngicas mortas é diminuída (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; MA et al., 2006; YANG et al., 2019). Também observamos uma possível correlação com a taxa de replicação do fungo com o processo de exocitose não-lítica. Corroborando com um estudo em que eles viram uma correlação entre a taxa de replicação intracelular e os eventos de exocitose não lítica (GARELNABI et al., 2018).

A fosfolipase e a Urease são enzimas muito importantes na patogênese do *Cryptococcus* e tem sido bastante estudada. Ambas estão associadas a disseminação desse patógeno para o SNC. Assim como a exocitose não lítica, que alguns autores acreditam que seja um mecanismo para que as células fúngicas sejam transportadas para o SNC dentro de macrófagos, escondendo do sistema imunológico e lá saem de dentro dos macrófagos de forma sorrateira sem ativar grandes respostas imunológicas (teoria do cavalo de Tróia) (CHEN et al., 2022). De forma bem genérica, a urease tem um papel de auxiliar a entrada e saída do *Cryptococcus* dos macrófagos, enquanto a fosfolipase facilita o crescimento fúngico dentro dos macrófagos (WANG et al., 2022).

A fosfolipase de *Cryptococcus* promove o aumento de capsula, inibe fagocitose por macrófagos e importante para a reprodução intracelular (CHRISMAN et al., 2011; EVANS et al., 2015). Também é necessária para a infecção pulmonar e para a

disseminação para outros órgãos, inclusive para o SNC. (HAMED et al., 2023) demonstraram que a fosfolipase favorece a uma maior carga fúngica no SNC em camundongos gerando mais lesões cerebrais e cepas mutantes de fosfolipase são mais fagocitadas e mortas por células semelhantes a micróglia. Sugerindo uma importância da fosfolipase para a colonização e sobrevivência no SNC. A fosfolipase também é favorece a ocorrência de exocitose não lítica (CHAYAKULKEEREE et al., 2011). Entretanto nossos resultados demonstraram que não há uma correlação entre a intensidade de fosfolipase produzidas pelos isolados clínicos e a ocorrência de exocitose não lítica.

A urease foi descrita como tendo efeito na exocitose não lítica. Dados apresentados por (FU et al., 2018) demonstram que macrófagos infectados com mutante *ure1Δ* sofrem menos exocitose não lítica quando comparados com macrófagos infectados com *C. neoformans* produtor de urease. Na tentativa de relacionar a urease com a ocorrência de exocitose não lítica, eles adicionaram ureia ao meio e viram que tanto os mutantes quanto o selvagem tiveram aumento na exocitose não lítica. Eles também investigaram a atividade da urease e viram que quando ela é inibida a exocitose não lítica diminui a níveis similares ao mutante de urease. Concluindo que a urease tem um papel na ocorrência de exocitose não lítica. Corroborando com esses dados (DE CASTRO et al., 2023) demonstram que a falta da atividade de urease por células VBNC faz com que elas tenham menos eventos de exocitose não lítica. Não observamos uma correlação entre a atividade urease, tanto em relação a velocidade de consumo de ureia, como o tempo de conversão com o processo de exocitose não-lítica. Isso pode indicar que a existência da atividade já é suficiente para a ocorrência da exocitose não lítica, mas que esses outros fatores não são tão relevantes. No entanto, é importante salientarmos que outros estudos são necessários para confirmarmos essa hipótese.

A lacase é outra enzima que também foi associada a disseminação do *Cryptococcus* para o SNC (NOVERR et al., 2004). E suas funções vão para além da biossíntese de melanina. A lacase é necessária para a proliferação fúngica no pulmão de camundongos e para a disseminação dessas células para o SNC (QIU et al., 2012) e a atividade da lacase também foi associada a uma maior sobrevivência de isolados fúngico coletados de LCR (SABIITI et al., 2014). Dados do capítulo 1 demonstraram que a atividade de lacase tem um papel na ocorrência de exocitose não lítica (FRAZÃO et

al., 2020). Vimos também uma correlação entre a velocidade de crescimento do *Cryptococcus* favorece a ocorrência de exocitose não lítica, assim como uma possível correlação entre a sobrevivência do fungo após interagir com macrófagos e os eventos de exocitose não lítica. Com essas informações levantamos a hipótese de que a lacasse leva uma maior resistência do *Cryptococcus*. Com isso mais fungos sobrevivem dentro dos macrófagos e por consequência o número de fungo aumenta mais rápido, levando a mais exocitose não lítica. Essa hipótese não foi testada. É importante salientar, no entanto, que os isolados clínicos usados no capítulo 1, são diferentes dos isolados clínicos do capítulo 2, bem como a metodologia para avaliarmos a exocitose não-lítica.

## Conclusão

O desfecho da interação entre *Cryptococcus* e seres humanos depende de fatores do fungo, do hospedeiro e ambientais. Com nossos dados observamos que os isolados mesmo pertencendo a mesma espécie apresenta uma grande variabilidade na expressão de virulência, assim como a capacidade de sobreviver a interação com macrófagos *in vitro*. Observamos que o índice fagocítico e a capacidade dos isolados sobreviverem após a interação com o macrófago se correlaciona positivamente a ocorrência de exocitose não lítica dos isolados. Vimos também que possivelmente a taxa de sobrevivência do fungo se correlacione com a exocitose não lítica. Então, provavelmente a quantidade de células presentes dentro dos macrófagos é importante para que ocorra a exocitose não lítica.

Não observamos uma correlação entre a ocorrência de exocitose não lítica e a sobrevivência dos pacientes. Apesar de outros estudos demonstrarem que Urease e fosfolipase são importantes para o processo de exocitose não lítica, nos nossos resultados, não observamos uma correlação entre a quantidade de urease e fosfolipase produzida pelos isolados e a ocorrência de exocitose não lítica.

Ademais, conseguimos estabelecer um método para análise da atividade de urease em *Cryptococcus* onde podemos avaliar tanto a capacidade do fungo de produzir urease quanto a cinética de atividade dessa enzima. Por esse método, observamos que a maior parte dos isolados tem cinética de produção dessa atividade significativamente

mais lenta que a linhagem padrão de *C. neoformans* (H99) e algumas delas tiveram uma atividade muito próxima ao mutante para urease. Nossos dados reforçam a necessidade de melhor caracterização de isolados clínicos de diferentes regiões geográficas do mundo, uma vez que a expressão de fatores de virulência e sua interação com o hospedeiro pode variar bastante em relação às linhagens padrão do fungo.

## Artigos publicados

Tabela 6: Artigos publicados durante o doutorado	
Título	Link de acesso
<b>Laccase Affects the Rate of <i>Cryptococcus neoformans</i> Nonlytic Exocytosis from Macrophages</b>	<a href="https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mbio.02085-20?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&amp;url_ver=Z39.88-2003&amp;rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org">https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mbio.02085-20?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&amp;url_ver=Z39.88-2003&amp;rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org</a>
<b>Faster <i>Cryptococcus</i> Melanization Increases Virulence in Experimental and Human Cryptococcosis</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9029458/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9029458/</a>
<b><i>Cryptococcal</i> Virulence in Humans: Learning From Translational Studies With Clinical Isolates</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8097041/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8097041/</a>
<b>A hidden battle in the dirt: Soil amoebae interactions with</b>	<a href="https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007742">https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007742</a>

<b><i>Paracoccidioides</i> spp</b>	
<b>Opsonin-free, real-time imaging of <i>Cryptococcus neoformans</i> capsule during budding</b>	<a href="https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2018.1515610">https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2018.1515610</a>
<b>A glucuronoxylomanan-like glycan produced by <i>Trichosporon mucoides</i></b>	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184518302184?via%3Dihub">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184518302184?via%3Dihub</a>
<b>Measuring laccase activity and melanin production in <i>Cryptococcus neoformans</i></b>	<a href="https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-3722-7_17">https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-3722-7_17</a>

## Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K. et al. *Imunologia Celular e Molecular*. p. 549, 2015.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Current biology : CB**, v. 16, n. 21, p. 2161–2165, 7 nov. 2006.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. **BMC immunology**, v. 8, 16 ago. 2007.

ALVAREZ, M.; SAYLOR, C.; CASADEVALL, A. Antibody action after phagocytosis promotes *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* macrophage exocytosis with biofilm-like microcolony formation. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1622, ago. 2008.

ANDES, D. Optimizing antifungal choice and administration. **Current medical research and opinion**, v. 29 Suppl 4, n. SUPPL4, p. 13–18, 2013.

ARASTEHFAR, A. et al. Drug-Resistant Fungi: An Emerging Challenge Threatening Our Limited Antifungal Armamentarium. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 12, p. 1–29, 1 dez. 2020.

ARAÚJO, G. R. DE S. et al. The environmental yeast *Cryptococcus liquefaciens* produces capsular and secreted polysaccharides with similar pathogenic properties to those of *C. neoformans*. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 25 abr. 2017.

ARNEGARD, M. E. et al. Sex as a Biological Variable: A 5-Year Progress Report and Call to Action. **Journal of Women's Health**, v. 29, n. 6, p. 858, 1 jun. 2020.

ARORA, S. et al. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 79, n. 5, p. 1915–1926, maio 2011.

BAIN, J. M. et al. Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 49, n. 9, p. 677–678, set. 2012.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast (Chichester, England)**, v. 27, n. 11, p. 875–904, nov. 2010.

BASSO, A. M. M. et al. Immunomodulatory activity of  $\beta$ -glucan-containing exopolysaccharides from *Auricularia auricular* in phagocytes and mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology**, v. 58, n. 2, p. 227–239, 1 fev. 2020.

BAUMAN, S. K.; HUFFNAGLE, G. B.; MURPHY, J. W. Effects of tumor necrosis factor alpha on dendritic cell accumulation in lymph nodes draining the immunization site and the impact on the anticryptococcal cell-mediated immune response. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 68–74, 1 jan. 2003.

BAUMAN, S. K.; NICHOLS, K. L.; MURPHY, J. W. Dendritic cells in the induction of protective and nonprotective anticryptococcal cell-mediated immune responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 1, p. 158–167, 1 jul. 2000.

BICANIC, T. et al. Relationship of cerebrospinal fluid pressure, fungal burden and outcome in patients with cryptococcal meningitis undergoing serial lumbar punctures. **AIDS**, v. 23, n. 6, p. 701–706, 27 mar. 2009.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. 106, 1 fev. 2016.

BLACKSTOCK, R. et al. Differential regulation of immune responses by highly and weakly virulent *Cryptococcus neoformans* isolates. **Infection and immunity**, v. 67, n. 7, p. 3601–3609, 1999.

BOJARCZUK, A. et al. *Cryptococcus neoformans* Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 18 fev. 2016.

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

CAMPUZANO, A. et al. CARD9 is required for classical macrophage activation and the induction of protective immunity against pulmonary cryptococcosis. **mBio**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2020.

CAMPUZANO, A.; WORMLEY, F. L. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination. **Journal of Fungi 2018, Vol. 4, Page 33**, v. 4, n. 1, p. 33, 7 mar. 2018.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 1 ago. 2000.

CHAYAKULKEEREE, M. et al. SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1088–1101, maio 2011.

CHEN, S. C. A. et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? **The Journal of infectious diseases**, v. 175, n. 2, p. 414–420, 1997.

CHEN, Y. et al. *Cryptococcus neoformans* Infection in the Central Nervous System: The Battle between Host and Pathogen. **Journal of Fungi 2022, Vol. 8, Page 1069**, v. 8, n. 10, p. 1069, 12 out. 2022.

CHIAPELLO, L. et al. Mechanisms for induction of immunosuppression during experimental cryptococcosis: role of glucuronoxylomannan. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 100, n. 1, p. 96–106, 2001.

CHIAPELLO, L. S. et al. Apoptosis induction by glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology**, v. 41, n. 4, p. 347–353, ago. 2003.

CHIAPELLO, L. S. et al. Immunosuppression, interleukin-10 synthesis and apoptosis are induced in rats inoculated with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. **Immunology**, v. 113, n. 3, p. 392–400, nov. 2004.

CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids Trigger *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement during Interactions with Amoebae and Macrophages. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002047, maio 2011.

CHRISMAN, C. J.; ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and nonlytic exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6056–6062, set. 2010.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual review of pathology**, v. 9, p. 219–238, 2014.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, v. 2013, p. 1–23, 2013.

COX, G. M. et al. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443, fev. 2000.

COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 1, p. 166–175, 2001.

DAVIS, M. J. et al. *Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 194, n. 5, p. 2219–2231, 1 mar. 2015.

DE CASTRO, R. J. A. et al. Kicking sleepers out of bed: Macrophages promote reactivation of dormant *Cryptococcus neoformans* by extracellular vesicle release and non-lytic exocytosis. **PLOS Pathogens**, v. 19, n. 11, p. e1011841, 1 nov. 2023.

DECKEN, K. et al. Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 10, p. 4994–5000, 1998.

DENNING, D. W. et al. Elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with cryptococcal meningitis and acquired immunodeficiency syndrome. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 267–272, 1 set. 1991.

DESHAW, M.; PIROFSKI, L. A. Antibodies to the *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan are ubiquitous in serum from HIV+ and HIV- individuals. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 99, n. 3, p. 425, 1995.

DE SOUSA, H. R. et al. Faster *Cryptococcus* Melanization Increases Virulence in Experimental and Human Cryptococcosis. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 4, 1 abr. 2022.

DJORDJEVIC, J. T. et al. Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. **Biochemical Journal**, v. 389, n. Pt 3, p. 803, 8 ago. 2005.

DOERING, T. L. et al. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. **Medical Mycology**, v. 37, n. 3, p. 175–181, jun. 1999.

DROMER, F. et al. *Cryptococcus neoformans* Antibody Levels in Patients with AIDS. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 283–285, 1988.

DROMER, F. et al. Cryptococcus neoformans: Latency and Disease. **Cryptococcus**, p. 429–439, 9 abr. 2014.

EMERY, H. S. et al. Genetic study of oxygen resistance and melanization in Cryptococcus neoformans. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5694, 1994.

EMMONS, C. W. Saprophytic sources of Cryptococcus neoformans associated with the pigeon (Columba livia). **American journal of hygiene**, v. 62, n. 3, p. 227–232, 1955.

ERB-DOWNWARD, J. R. et al. The role of laccase in prostaglandin production by Cryptococcus neoformans. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1428–1437, jun. 2008.

EVANS, R. J. et al. Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation and control of titan cell morphology during macrophage infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1296–1304, 2015.

FEDER, V. et al. Cryptococcus gattii urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **The FEBS journal**, v. 282, n. 8, p. 1406–1418, 1 abr. 2015.

FELDMESSER, M. et al. Cryptococcus neoformans is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4225–4237, jul. 2000.

FRAZÃO, S. DE O. et al. Laccase affects the rate of cryptococcus neoformans nonlytic exocytosis from macrophages. **mBio**, v. 11, n. 5, p. 1–6, 1 set. 2020.

FU, M. S. et al. Cryptococcus neoformans urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, 1 jun. 2018.

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant Cryptococcus neoformans infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3204–3209, 1999.

GARCÍA-RODAS, R. et al. The interaction between Candida krusei and murine macrophages results in multiple outcomes, including intracellular survival and escape from killing. **Infection and immunity**, v. 79, n. 6, p. 2136–2144, jun. 2011.

GARELNABI, M. et al. Quantifying donor-to-donor variation in macrophage responses to the human fungal pathogen Cryptococcus neoformans. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0194615, 1 mar. 2018.

GILES, S. S. et al. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen Cryptococcus neoformans. **Infection and immunity**, v. 77, n. 8, p. 3491–3500, ago. 2009.

GOLDMAN, D. L. et al. Serologic Evidence for Cryptococcus neoformans Infection in Early Childhood. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. e66–e66, 1 maio 2001.

GOUGEON, M. L.; MONTAGNIER, L. Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 887, p. 199–212, 1999.

GROSSMAN, N. T.; CASADEVALL, A. Physiological Differences in *Cryptococcus neoformans* Strains In Vitro versus In Vivo and Their Effects on Antifungal Susceptibility. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 3, 1 mar. 2017.

GUESS, T. E.; ROSEN, J. A.; MCCLELLAND, E. E. An Overview of Sex Bias in *C. neoformans* Infections. **Journal of Fungi 2018, Vol. 4, Page 49**, v. 4, n. 2, p. 49, 18 abr. 2018.

HAMED, M. F. et al. Phospholipase B Is Critical for *Cryptococcus neoformans* Survival in the Central Nervous System. **mBio**, v. 14, n. 2, 1 mar. 2023.

HARDISON, S. E. et al. Pulmonary infection with an interferon-gamma-producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection. **The American journal of pathology**, v. 176, n. 2, p. 774–785, 2010.

HARDISON, S. E. et al. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 8, p. 4060–4068, 15 out. 2012.

HARDISON, S. E.; BROWN, G. D. C-type Lectin Receptors Orchestrate Anti-Fungal Immunity. **Nature immunology**, v. 13, n. 9, p. 817, set. 2012.

HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; CHASTAIN, D. B.; FRANCO-PAREDES, C. Treatment of cryptococcosis in non-HIV immunocompromised patients. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 278–285, 1 ago. 2018.

HUANG, H. R. et al. Dectin-3 recognizes glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* serotype AD and *Cryptococcus gattii* serotype B to initiate host defense against cryptococcosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, p. 1781, 6 ago. 2018.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 403–411, 1 mar. 2013.

JOHNSTON, S. A.; VOELZ, K.; MAY, R. C. *Cryptococcus neoformans* Thermotolerance to Avian Body Temperature Is Sufficient For Extracellular Growth But Not Intracellular Survival In Macrophages. **Scientific Reports**, v. 6, p. 20977, 17 fev. 2016.

KABANDA, T. et al. Point-of-Care Diagnosis and Prognostication of Cryptococcal Meningitis With the Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay on Cerebrospinal Fluid. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 58, n. 1, p. 113, 1 jan. 2014.

KASPERKOVITZ, P. V. et al. Toll-like receptor 9 modulates macrophage antifungal effector function during innate recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 12, p. 4858–4867, dez. 2011.

KELLY, R. M. et al. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 592–598, jan. 2005.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: A systematic review. **Infection**, v. 35, n. 2, p. 51–58, abr. 2007.

KIM, J. Y. Human fungal pathogens: Why should we learn? **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 145–148, 1 mar. 2016.

KON, A. S. et al. Consenso em criptococose: 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524–544, 2008.

KRAUS, P. R. et al. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 5, p. 1249–1260, out. 2004.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, 2014.

KWON CHUNG, K. J.; TOM, W. K.; COSTA, J. L. Utilization of indole compounds by *Cryptococcus neoformans* to produce a melanin-like pigment. **Journal of clinical microbiology**, v. 18, n. 6, p. 1419–1421, 1983.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. STAT1 signaling is essential for protection against *Cryptococcus neoformans* infection in mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 193, n. 8, p. 4060–4071, 15 out. 2014.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. *Cryptococcus* and phagocytes: Complex interactions that influence disease outcome. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 180340, 9 fev. 2016.

LEVITZ, S. M. et al. Chloroquine induces human mononuclear phagocytes to inhibit and kill *Cryptococcus neoformans* by a mechanism independent of iron deprivation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 6, p. 1640, 9 set. 1997.

LEVITZ, S. M. et al. *Cryptococcus neoformans* Resides in an Acidic Phagolysosome of Human Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 885, 1999.

LIMA, C. T. DE; KLAFKE, G. B.; XAVIER, M. O. *Cryptococcus* spp. em excretas de *Columba livia* (pombos domésticos) provenientes de um hospital universitário no Sul do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 0, p. 1–4, 12 jan. 2016.

LIU, L.; TEWARI, R. P.; WILLIAMSON, P. R. Laccase Protects *Cryptococcus neoformans* from Antifungal Activity of Alveolar Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 6034, 1999.

LOFGREN, S. et al. Recent advances in AIDS-related cryptococcal meningitis treatment with an emphasis on resource limited settings. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 15, n. 4, p. 331–340, 3 abr. 2017.

LU, Y. K.; SUN, K. H.; SHEN, W. C. Blue light negatively regulates the sexual filamentation via the Cwc1 and Cwc2 proteins in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 2, p. 480–491, abr. 2005.

MA, H. et al. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. **Current biology : CB**, v. 16, n. 21, p. 2156–2160, 7 nov. 2006.

MA, H. et al. Direct cell-to-cell spread of a pathogenic yeast. **BMC immunology**, v. 8, 16 ago. 2007.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 67, n. C, p. 131–190, 1 jan. 2009.

MANSOUR, M. K.; LATZ, E.; LEVITZ, S. M. *Cryptococcus neoformans* Glycoantigens Are Captured by Multiple Lectin Receptors and Presented by Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3053–3061, 1 mar. 2006.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 1 mar. 2016.

MCCLELLAND, E. E. et al. The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. **PloS one**, v. 8, n. 5, 31 maio 2013.

MCFADDEN, D. C. et al. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 8, p. 1464–1473, ago. 2007.

MONARI, C. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 6, p. 3461–3468, 15 mar. 2005.

MONARI, C. et al. Capsular polysaccharide induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2129–2137, 2008.

MONTOYA, M. C.; MAGWENE, P. M.; PERFECT, J. R. Associations between Cryptococcus Genotypes, Phenotypes, and Clinical Parameters of Human Disease: A Review. **Journal of Fungi** 2021, Vol. 7, Page 260, v. 7, n. 4, p. 260, 30 mar. 2021.

NEMATOLLAHI, S.; DIOVERTI-PRONO, V. Cryptococcal infection in haematologic malignancies and haematopoietic stem cell transplantation. **Mycoses**, v. 63, n. 10, p. 1033–1046, 1 out. 2020.

NICOLA, A. M. et al. Macrophage autophagy in immunity to Cryptococcus neoformans and Candida albicans. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 9, p. 3065–3076, 2012.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Cellular charge of Cryptococcus neoformans: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. **Infection and immunity**, v. 65, n. 5, p. 1836–1841, 1997.

NOVERR, M. C. et al. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1538–1547, 1 mar. 2003.

NOVERR, M. C. et al. CNLAC1 Is Required for Extrapulmonary Dissemination of Cryptococcus neoformans but Not Pulmonary Persistence. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1693, mar. 2004.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease Expression by Cryptococcus neoformans Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 1 maio 2004.

ONYISHI, C. U. et al. Loss of the scavenger receptor MARCO results in uncontrolled vomocytosis of fungi from macrophages. **European journal of immunology**, v. 54, n. 6, 1 jun. 2024.

OSTERHOLZER, J. J. et al. CCR2 mediates conventional dendritic cell recruitment and the formation of bronchovascular mononuclear cell infiltrates in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 1, p. 610–620, 1 jul. 2008.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Cryptococcal Urease Promotes the Accumulation of Immature Dendritic Cells and a Non-Protective T2 Immune Response within the Lung. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 3, p. 932–943, 1 mar. 2009a.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 9, p. 3749–3755, set. 2009b.

PACIFICI, N. et al. Vomocytosis of *Cryptococcus neoformans* cells from murine, bone marrow-derived dendritic cells. **PLOS ONE**, v. 18, n. 3, p. e0280692, 1 mar. 2023.

PARK, Y. D. et al. A role for LHC1 in higher order structure and complement binding of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, 2014.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 1 dez. 2017.

POLACHECK, I. The Discovery of Melanin Production in *Cryptococcus neoformans* and its Impact on Diagnosis and the Study of Virulence. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 276, n. 1, p. 120–123, 1 dez. 1991.

PRATTES, J. et al. Point of Care Testing for the Diagnosis of Fungal Infections: Are We There Yet? **Current fungal infection reports**, v. 10, n. 2, p. 43–50, 1 jun. 2016.

QIN, Q. M. et al. Functional analysis of host factors that mediate the intracellular lifestyle of *Cryptococcus neoformans*. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 6, jun. 2011.

QIU, Y. et al. Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. **PloS one**, v. 7, n. 10, 22 out. 2012.

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

RETINI, C. et al. Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils. **Infection and immunity**, v. 64, n. 8, p. 2897–2903, 1996.

RETINI, C. et al. Interdependency of interleukin-10 and interleukin-12 in regulation of T-cell differentiation and effector function of monocytes in response to stimulation with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 69, n. 10, p. 6064–6073, 2001.

ROBERT, V. A.; CASADEVALL, A. Vertebrate Endothermy Restricts Most Fungi as Potential Pathogens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 10, p. 1623–1626, 15 nov. 2009.

ROSAS, Á. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **FEMS microbiology letters**, v. 153, n. 2, p. 265–272, 17 jan. 1997.

SABIITI, W. et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 5, p. 2000–2008, 2014.

SEOANE, P. I. et al. Viral infection enhances vomocytosis of intracellular fungi via Type I interferons. **bioRxiv**, v. 4, p. 512293, 4 jan. 2019.

SEOANE, P. I. et al. Viral infection triggers interferon-induced expulsion of live *Cryptococcus neoformans* by macrophages. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 2, p. e1008240, 2020.

SEOANE, P. I.; MAY, R. C. Vomocytosis: What we know so far. **Cellular Microbiology**, v. 22, n. 2, p. e13145, 1 fev. 2020.

SHAH, A. et al. Calcineurin Orchestrates Lateral Transfer of *Aspergillus fumigatus* during Macrophage Cell Death. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 194, n. 9, p. 1127–1139, 1 nov. 2016.

SHAHEEN, A. A. M. et al. Epidemiology and trends of cryptococcosis in the United States from 2000 to 2007: A population-based study. **International journal of STD & AIDS**, v. 29, n. 5, p. 453–460, 1 abr. 2018.

SHARIF, O. et al. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- $\kappa$ B response in macrophages. **BMC Immunology**, v. 8, p. 1, 2007.

SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1683, 3 maio 2010.

SHOHAM, S. et al. Toll-Like Receptor 4 Mediates Intracellular Signaling Without TNF- $\alpha$  Release in Response to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide Capsule. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4620–4626, 1 abr. 2001.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **British journal of haematology**, v. 129, n. 5, p. 569–582, jun. 2005.

SINGH, A. et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 4, n. 3, 2013.

SMITH, L. M.; DIXON, E. F.; MAY, R. C. The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 5, p. 702–713, 1 maio 2015.

SONG, G.; LIANG, G.; LIU, W. Fungal Co-infections Associated with Global COVID-19 Pandemic: A Clinical and Diagnostic Perspective from China. **Mycopathologia**, v. 185, n. 4, p. 599, 1 ago. 2020.

SORRELL, T. C. et al. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 1, p. 57–67, 1 jan. 2016.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 21, n. 1, p. 28–34, 1995.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast (Chichester, England)**, v. 31, n. 2, p. 47–60, fev. 2014.

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

STUKES, S. et al. The Membrane Phospholipid Binding Protein Annexin A2 Promotes Phagocytosis and Nonlytic Exocytosis of *Cryptococcus neoformans* and Impacts Survival in Fungal Infection. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 4, p. 1252–1261, 15 ago. 2016.

STUKES, S.; CASADEVALL, A. Visualizing Non-lytic Exocytosis of Cryptococcus neoformans from Macrophages Using Digital Light Microscopy. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. 92, n. 92, p. 52084, 21 out. 2014.

TABORDA, C. P.; CASADEVALL, A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of Cryptococcus neoformans. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 791–802, 2002.

TRACHTENBERG, J. D. et al. The medical management of central nervous system infections in Uganda and the potential impact of an algorithm-based approach to improve outcomes. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 524–530, 1 nov. 2007.

TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. Cryptococcus neoformans induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model Galleria mellonella. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 66–74, 22 dez. 2015.

TRZASKA, W. J. et al. Developing novel approaches to treat trauma - associated fungal infections. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2019.

VAIDHYA, S. A. et al. Combination Versus Monotherapy for the Treatment of HIV Associated Cryptococcal Meningitis. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 9, n. 2, p. OC14–OC16, 1 fev. 2015.

VECCHIARELLI, A. et al. Purified capsular polysaccharide of Cryptococcus neoformans induces interleukin-10 secretion by human monocytes. **Infection and immunity**, v. 64, n. 7, p. 2846–2849, 1996.

VECCHIARELLI, A. et al. Cryptococcus neoformans galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 3, n. 8, p. 997–1005, ago. 2011.

VIOLA, G. M. et al. Disseminated cryptococcosis and anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies: An underappreciated association. **Mycoses**, v. 64, n. 6, p. 576–582, 1 jun. 2021.

VOELZ, K.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by Cryptococcus neoformans. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3450–3457, 2009.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 6, p. 835, jun. 2010.

WAGER, C. M. L. et al. STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against Cryptococcus neoformans. **Infection and immunity**, v. 83, n. 12, p. 4513–4527, 2015.

WALENKAMP, A. M. E. et al. Cryptococcus neoformans and its cell wall components induce similar cytokine profiles in human peripheral blood mononuclear cells despite differences in structure. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 26, n. 3–4, p. 309–318, dez. 1999.

WANG' AND, Y.; CASADEVALL', A. Susceptibility of Melanized and Nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to Nitrogen-and Oxygen-Derived Oxidants. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 62, n. 7, p. 3004–3007, 1994.

WANG, Y. et al. Macrophage Mediated Immunomodulation During *Cryptococcus* Pulmonary Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 859049, 24 mar. 2022.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 3864, 1994.

WATKINS, R. A. et al. *Cryptococcus neoformans* Escape From *Dictyostelium* Amoeba by Both WASH-Mediated Constitutive Exocytosis and Vomocytosis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. APR, 9 abr. 2018.

WILLIAMSON, P. R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin Biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 6, p. 1570, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rapid Advice: Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-Infected Adults, Adolescents and Children. **Rapid Advice: Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-Infected Adults, Adolescents and Children**, 2011.

WOZNIAK, K. L. et al. Induction of protective immunity against cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5–6, p. 387–394, jun. 2012.

WOZNIAK, K. L.; LEVITZ, S. M. Cryptococcus neoformans enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. **Infection and immunity**, v. 76, n. 10, p. 4764–4771, out. 2008.

WOZNIAK, K. L.; VYAS, J. M.; LEVITZ, S. M. In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. **Infection and immunity**, v. 74, n. 7, p. 3817–3824, jul. 2006.

WRIGHT, L. C. et al. Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 1, p. 37–47, jan. 2007.

YANG, X. et al. Nonlytic exocytosis of Cryptococcus neoformans from neutrophils in the brain vasculature. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 9 set. 2019.

YAUCH, L. E. et al. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen Cryptococcus neoformans in vivo. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5373–5382, set. 2004.

YAUCH, L. E.; MANSOUR, M. K.; LEVITZ, S. M. Receptor-Mediated Clearance of Cryptococcus neoformans Capsular Polysaccharide In Vivo. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8429, dez. 2005.