

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**EFEITO DE METABÓLITOS SECRETADOS POR *CRYPTOCOCCUS*
NEOFORMANS NA INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS MURINOS.**

TATIANE SILVA DOS SANTOS

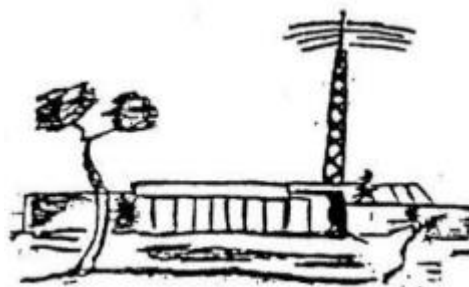
**BRASÍLIA-DF
2017**

Efeito de metabólitos secretados por *Cryptococcus neoformans* na interação com macrófagos murinos.

TATIANE SILVA DOS SANTOS

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola



**BRASILIA-DF
2017**

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

ST219e Santos, Tatiane Silva dos
Efeito de metabólitos secretados por *Cryptococcus*
neoformans na interação com macrófagos murinos. /
Tatiane Silva dos Santos; orientador Patrícia
Albuquerque de Andrade Nicola. -- Brasília, 2017.
57 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina
Tropical) -- Universidade de Brasília, 2017.

1. *Cryptococcus* neoformans. 2. metabólitos
secretados. 3. interação patógeno-hospedeiro. 4.
fagocitose. 5. sobrevivência. I. Nicola, Patrícia
Albuquerque de Andrade, orient. II. Título.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Tatiane Silva dos Santos

Efeito de metabólitos secretados por *Cryptococcus neoformans* na interação com macrófagos murinos.

Universidade de Brasília

Medicina Tropical: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

Data da defesa da dissertação

1° de junho de 2017

Banca Examinadora

Profa. Dr^a Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola
Universidade de Brasília (Presidente)

Prof. Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo
Universidade de Brasília (Banca Interna)

Prof. Dra. Larissa Fernandes Matos
Universidade de Brasília (Banca Interna)

Prof. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva
Universidade de Brasília (Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico a presente dissertação aos meus pais José Domingos dos Santos e Tereza Silva dos Santos por dedicarem suas vidas para que os filhos pudessem ter acesso ao ensino.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde concedida e pelos desafios de aprendizagem, à orientadora Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola, aos colegas e técnicos do laboratório e aos professores que auxiliaram com suas observações e críticas construtivas para a presente dissertação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de infecção de <i>Cryptococcus</i>	17
Figura 2: Fluxograma do experimento.....	28
Figura 3: Efeito do meio condicionado sobre a interação fungo-macrófago.....	34
Figura 4: Avaliação da sobrevivência de <i>C. neoformans</i> linhagem H99 após 24 horas de interação com macrófago, com ou sem adição de meio condicionado.	36
Figura 5: Avaliação das UFC para verificar viabilidade do número de colônias de <i>C. neoformans</i> linhagem H99 após 24 horas de infecção	37
Figura 6: Efeito do meio condicionado sobre a interação fungo-macrófago.....	38
Figura 7: Fagocitose após interação fungo-macrófago por 24 horas.	39
Figura 8: Níveis de IL-1 β no sobrenadante da cultura de macrófago derivado de medula óssea (BMM) nas diferentes condições experimentais.....	41
Figura 9: Níveis de IL-6 no sobrenadante da cultura de macrófago derivado de medula óssea (BMM) nas diferentes condições experimentais.....	42
Figura 10: Níveis de TNF- α no sobrenadante da cultura de macrófago derivado de medula óssea (BMM) infectados ou não, com ou sem CM.	43
Figura 11: Níveis de MCP-1 no sobrenadante da cultura de macrófago derivado de medula óssea (BMM) nas diferentes condições experimentais.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Por cento

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BMM – Macrófagos Derivados de Medula Óssea

UFC – Unidade Formadora de Colônias

C. gatti – *Cryptococcus gatti*

C. neoformans – *Cryptococcus neoformans*

CO₂ – Dióxido de carbono

CrAg – Antígeno capsular polissacarídico criptocócico

D-DOPA – D-3,4-dihydroxyphenylalanine; Dextrodopa

ELISA – Ensaio de ligação imunoenzimático

GM-CSF – Fator de Crescimento de Granulócitos e Macrófagos

GXM – Glicuronoxilomanana

GxMGal – Galactoxilomanana

GXM – glicuronoxilomanana

h – Hora

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IF – Índice Fagocítico

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

LAC – Lactato

L-DOPA – 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine; Levodopa

mL – Mililitros

m ϕ – Macrófago

NKT – Células natural killer

°C – Graus Celsius

PBS – Tampão Fosfato Salina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

QS – Sensoriamento de quórum

RPM – Rotações por minuto

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute

SNC – Sistema nervoso central

spp. – Espécie

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TWEEN – Polietileno Glicol Monoestearato de Sorbitano

UnB – Universidade de Brasília

var. – Variação

μ L – Microlitro

FINANCIAMENTO

Esse trabalho contou com o financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

1.1	INFECÇÕES FÚNGICAS	14
1.2	CRIPTOCOCOSE	15
1.3	PATOGÊNESE DA CRIPTOCOCOSE.....	16
1.4	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE	18
1.5	<i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	19
1.6	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	20
1.6.1	Termotolerância a 37°C.....	20
1.6.2	Produção de cápsula.....	21
1.6.3	Síntese de melanina.....	21
1.6.4	Síntese de enzimas.....	22
1.6.5	Formação de Biofilmes.....	22
1.7	INTERAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO.....	23
1.7.1	Os macrófagos na infecção por <i>C. neoformans</i>	23
1.7.2	Resposta imune anti- <i>C. neoformans</i>	23
1.8	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR FUNGOS	24
1.8.1	Potencial dos metabólitos secundários na interação patógeno-hospedeiro.....	25
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	HIPÓTESE	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	CULTURA DE MICRORGANISMOS	28
5.2	OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO (CM).....	29
5.3	ANIMAIS.....	29

5.4	MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA	29
5.5	AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO CELULAR	30
5.6	ENSAIO DE INTERAÇÃO MACRÓFAGOS-FUNGOS	31
5.6.1	Teste de fagocitose	31
5.6.2	Ensaio de viabilidade do fungo	31
5.7	DOSAGEM DE CITOCINAS	32
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
6	RESULTADOS	33
6.1.1	Teste de fagocitose	33
6.1.2	ENSAIO DE VIABILIDADE DO FUNGO APÓS A INTERAÇÃO COM OS MACRÓFAGOS	35
6.1.3	Dosagem de citocinas	39
6.1.4	Interleucina (IL-10) e Interleucina IL-12 (p70)	40
6.1.5	Interleucina IL-1 β	40
6.1.6	Interleucina IL-6	41
6.1.7	Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)	42
6.1.8	Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1)	43
9.	PERSPECTIVAS	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	49

RESUMO

O fungo *Cryptococcus neoformans* é um agente causador da micose sistêmica criptococose, que tem levado a óbito cerca de 181 mil pessoas por ano ao redor do mundo. A doença atinge principalmente pessoas imunodeprimidas e adquiriu maior importância clínica a partir da década de 1980, com o aparecimento da AIDS. Como em outras doenças fúngicas, o diagnóstico e o tratamento dessa doença ainda não são ideais, reforçando a necessidade de estudar-se melhor a relação parasito-hospedeiro na busca por melhores estratégias para reverter esses problemas. Nos últimos anos tem se mostrado que pequenos metabólitos podem ter um importante papel na interação parasita-hospedeiro. Demonstrou-se previamente, que moléculas de baixo peso molecular (menor que 1 KDa) presentes no meio condicionado (CM) de culturas estacionárias de *C. neoformans* da linhagem H99, afetavam o crescimento planctônico e em biofilmes desse fungo, bem como a produção de melanina e a secreção de polissacarídeos capsulares por esse fungo. Em continuidade a esses estudos, no presente trabalho analisou-se a influência dessas mesmas moléculas secretadas pelo fungo na sua interação com macrófagos murinos primários. Fungos e macrófagos foram co-incubados por períodos de 2h ou 24h em uma razão de infecção de 2:1 na presença ou não do CM e foram analisados os possíveis efeitos na fagocitose dos fungos, na sobrevivência fúngica pós-interação e na produção de citocinas por esses macrófagos (TNF- α , IL-12, IL-1 β , IL-6 e MCP-1, e IL-10). Observou-se uma potencial atividade antifagocítica de metabólitos presentes no CM, uma vez que na presença do CM houve um menor percentual de fagocitose dos fungos. Além disso, o CM produziu um aumento significativo no número de unidades formadoras de colônia do fungo após a interação com os macrófagos por 24h, sugerindo, portanto, a possibilidade de existir nessas amostras, moléculas capazes de estimular o crescimento extra e/ou intracelular do fungo. Interessantemente, após 24 h de fagocitose, observa-se um número bem menor de fungos intracelulares nos macrófagos contendo fungo, do que nas amostras controle sem CM. A produção de citocinas só foi avaliada no período de 2h de interação e não foram observadas diferenças significativas na produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, apenas uma diminuição da produção de MCP-1 na presença de CM indicando um potencial papel anti-inflamatório de moléculas presentes nessa amostra. Em resumo, foi possível constatar que os pequenos metabólitos presentes no CM podem afetar a viabilidade e/ou crescimento fúngico na sua interação com macrófagos, possivelmente inibindo a sua internalização por fagócitos e inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Dessa maneira, um maior conhecimento das moléculas presentes no CM bem com o melhor detalhamento de suas atividades podem ajudar no melhor entendimento das interações fungo-hospedeiro na criptococose.

Palavras chaves: *Cryptococcus neoformans*, metabólitos secretados, macrófagos, interação patógeno-hospedeiro, fagocitose e sobrevivência de fungo.

ABSTRACT

The fungus *Cryptococcus neoformans* is a causative agent of the systemic mycosis cryptococcosis, a disease leading to about 181 thousand deaths per year worldwide. The disease affects mainly immunocompromised individuals and gained greater clinical importance from the 1980s, with the onset of AIDS. As in other fungal diseases, the diagnosis and treatment of this pathology is still far from ideal, reinforcing the need to better study the host-parasite interaction in the seek for best strategies to revert these problems. In the recent years, small metabolites were shown to play important roles in host-parasite interactions. It was previously demonstrated that low molecular weight molecules (lower than 1 KDa), present in conditioned medium (CM) from stationary cultures of *C. neoformans* strain H99, affected the planktonic and biofilm growth of this fungus, as well the production of melanin and secretion of capsular polysaccharides by this fungus. To further study the role of those molecules, in the present work we analyzed the influence of these secreted molecules, during fungal interaction with primary murine macrophages. Fungal cells and macrophages were co-incubated for periods of 2h or 24h in an infection ratio of 2:1, in the presence or absence of CM. Then we analyzed the possible effects of these molecules on fungal phagocytosis by macrophages, fungal survival, and macrophage cytokine production (TNF- α , IL-12, IL-1 β , IL-6, MCP-1, and IL-10). We observed a potential anti-phagocytic activity of metabolites present in CM, which samples showed a lower percentage of fungal internalization. In addition, the CM produced a significant increase in the number of colony forming units of the fungus, obtained after 24h interaction with macrophages. This suggests that molecules capable to stimulate the extra and/or intracellular growth of the fungus might exist in these samples. Interestingly, after 24h phagocytosis, a significantly lower number of intracellular fungi were observed in fungus-containing macrophages when compared to control samples without CM. The production of cytokines was evaluated only within a period of 2h interaction and no significant differences were observed in the production of TNF- α , IL-1 β , IL-6. Only a decrease in the production of MCP-1 in the presence of CM was detected, suggesting a potential anti-inflammatory role of the molecules present in this sample. In summary, it was possible to confirm that small metabolites present in CM might affect fungal viability and/or growth while interacting with macrophages, possibly inhibiting their internalization by these phagocytes and the production of pro-inflammatory cytokines. Thus, a better characterization of the molecules present in CM and of their activities could improve the understanding of fungus-host interactions in cryptococcosis.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, secreted metabolites, macrophages, host-pathogen interaction, phagocytosis and fungal survival.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções fúngicas

No decorrer do tempo, infectologistas tem enfrentado uma grande batalha em relação as doenças fúngicas invasivas que estão atingindo cada vez mais as práticas clínicas. Essa ocorrência é vista mais comumente em pacientes com AIDS e também naqueles que sofrem de problemas hematológicos, certos tipos de câncer e pacientes submetidos a transplantes (SINKO, 2017). Parte do aumento do número de diagnósticos acerca de micoses sistêmicas observados nas últimas décadas deve-se à evolução da medicina, que, permite a sobrevivência de pacientes imunodeprimidos, os quais são mais vulneráveis a doenças oportunistas, em especial doenças fúngicas (JIANG, 2016; KIERTIBURANAKUL *et al.*, 2006; CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006). O maior número de casos de infecções fúngicas relatadas são ocasionadas por fungos oportunistas que em geral acometem pessoas imunodeficientes, como os portadores do vírus HIV, pessoas com câncer, em tratamento com corticoesteróides ou recentemente transplantados (ARMSTRONG-JAMES *et al.*, 2014; ROMANI, 2011). No entanto, também se tem observado um crescente número de relatos de infecções fúngicas por espécies de fungos capazes de causar doenças em pacientes aparentemente imunocompetentes (MITCHELL & PERFECT, 1995).

Nesse sentido, a Micologia médica abrange inúmeros estudos sobre fungos patogênicos, microrganismos capazes de causar infecções aos seres humanos e que também são de grande interesse científico e tecnológico. Pode-se dizer que dos 1,5 milhão de espécies de fungos descritas, apenas 300 são de interesse médico por serem capazes de causar doenças humanas (GARCIA & CASADEVALL, 2010).

Os fungos são microrganismos que estão presentes em todos os ambientes e apresentam estruturas reprodutivas capazes de se dispersarem nos mais diferentes substratos e ambientes. Apresentam extrema importância no desenvolvimento de avanços nas áreas médica e farmacológica, como por exemplo na descoberta dos

antibióticos (MOLINARO, 2009; CASADEVALL & PERFECT; 1998, ALMEIDA et al., 2008).

Por esse motivo, não é exagero afirmar que ainda são necessários aprofundamentos científicos que busquem compreender melhor os mecanismos de sobrevivência, a resposta imune contra os fungos e a sua interação com seus hospedeiros para estabelecimento de melhores estratégias para o controle dessas infecções. Embora existam algumas classes de antifúngicos em uso clínico atualmente, o número de compostos é bastante limitado, o tratamento em geral é bastante prolongado e vários desses fármacos apresentam alta toxicidade e baixa eficácia (GUPTA & TOMAS, 2003). Além disso, a resistência fúngica natural ou adquirida a esses fármacos agrava ainda mais essa situação, criando a necessidade de aprimorar o que se conhece acerca da biologia desses microrganismos, bem como da sua interação com o hospedeiro para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle dessas doenças (ALVES et al 1997; FICA, 2004; COLOMBO et al., 2002; JIANG, 2016).

1.2 Criptococose

A criptococose é um tipo de micose sistêmica que apresenta anualmente mais de um milhão de novos casos e, que leva a morte de aproximadamente 181.000 pessoas por ano (RAJASINGHAM et al, 2017).

A criptococose é causada por fungos do complexo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG et al.; 2014, MARZIARZ & PERFECT, 2016). O *C. neoformans* apresenta duas variedades (var. grubii - sorotipo A e var. neoformans - sorotipo D), além do híbrido AD. *C. gattii* - que também tem duas variedades (sorotipos B e C). (KWON-CHUNG & VARMA, 2006; DEL POETA & CASADEVALL, 2012). Infecções por *C. neoformans* são mais comuns em pacientes imunocomprometidos, enquanto as infecções por *C. gattii* são mais frequentemente associadas a pacientes com o sistema imune aparentemente saudável (KWON-CHUNG et al., 2014; BICANIC & HARRISON, 2005).

É sabido que a infecção por ambas as espécies pode ser fatal na ausência de tratamento, principalmente em pessoas com o sistema imunológico comprometido,

considerando-se que ainda não está compreendido o neurotropismo do fungo que é responsável por meningites e meningoencefalites (VU et al., 2014).

No Brasil, estudos revelam que cerca de 3,8 milhões de pessoas são acometidas por alguma infecção fúngica grave, principalmente pacientes com alguma outra doença ou condição crítica e os habitantes de áreas endêmicas para fungos patógenos (GIACOMAZZI et al., 2015). Porém, levantamentos de dados epidemiológicos da criptococose no Brasil ainda não são muito consistentes.

1.3 Patogênese da criptococose

A infecção é causada por inalação de partículas infecciosas (esporos) de leveduras encapsuladas do gênero *Cryptococcus*. A doença pode apresentar duas formas principais, uma forma oportunista, que acomete principalmente pessoas imunossuprimidas e que é causada por *C. neoformans*; e a criptococose primária causada por *C. gattii*, que acomete principalmente pessoas com o sistema imune teoricamente saudável (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; SRIKANTA et al., 2014).

Após a inalação de propágulos ou de leveduras dissecadas do fungo, tais estruturas permanecem no trato respiratório do hospedeiro, sendo seu crescimento contido por uma resposta imune eficiente, sem gerar dano ao hospedeiro ou evoluindo como uma infecção assintomática onde o fungo pode permanecer latente por muitos anos. Neste último caso, havendo uma baixa significativa da resposta imune do hospedeiro, comprometida por alguma outra enfermidade, poderá ocorrer a ativação do agente infeccioso, disseminando-se por via hematogênica, causando infecção sistêmica, e frequentemente atingindo o Sistema Nervoso Central. (LIN & HEITMAN, 2006; GILES et al., 2009; LIU et al., 2012; DEL POETA & CASADEVALL, 2012).

Um ciclo infeccioso esquemático do fungo no seu ambiente natural, o solo e na sua interação com os diferentes hospedeiros baseados em diferentes trabalhos da literatura foi sugerido por Lin & Heitman (2006), e pode ser observado abaixo (Figura 1).

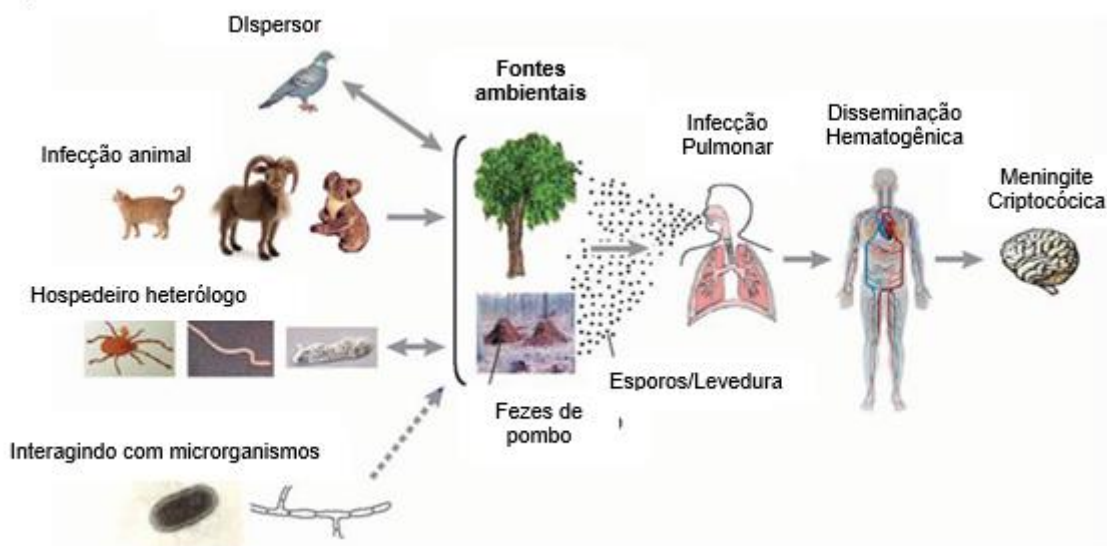


Figura 1: Ciclo de infecção de *Cryptococcus* (ambiente e hospedeiro). (Adaptado. Fonte: Lin & Heitman, 2006).

Devido sua gama de fatores de virulência, como por exemplo a adaptação microbiana a temperaturas diferentes, esse fungo apresenta um grande potencial de ultrapassar os limites de defesa do sistema imune do hospedeiro, e de se proliferar. Isso oportuniza o patógeno sobreviver ao sistema de reconhecimento e as defesas do hospedeiro (CASADEVALL & PIROFSKI, 2003).

O *C. neoformans* deve ultrapassar a barreira hematoencefálica para invadir o SNC. Estudos histológicos em cérebros com a infecção sugerem que o fungo possa utilizar entre outras estratégias, macrófagos do hospedeiro como "cavalos de tróia", para atingir o cérebro. (CHÉRETIEN, 2002; CHARLIER et al., 2009)

A disposição do hospedeiro quando a criptococose atinge o SNC se caracteriza por manifestações de: febre, dor de cabeça, confusão mental, vertigem, rigidez na nuca, sonolência, vômitos, paralisia dos nervos cranianos e coma. (LACAZ, 2002; PERFECT et al., 2010).

É nessa ênfase infecciosa projetada por esse fungo que é desejável aprofundar estudos direcionados para o mesmo, tendo em vista que, conhecer os mecanismos que regulam o patógeno durante a infecção pode permitir decifrar as estratégias utilizadas pelo patógeno e possibilitar o desenvolvimento de terapias para tratar suas infecções (FELDMESSER, 2001; DEL POETA, 2004). Nessa perspectiva, considera-se também que a infecção do hospedeiro ocorre pela

exposição em locais contaminados, porém o desenvolvimento da doença dependerá do equilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e os fatores de virulência do patógeno (CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006; CASADEVALL & PIROFSKI, 2003).

1.4 Diagnóstico e Tratamento da criptococose

A criptococose foi por muitos anos conhecida por uma doença caracteristicamente oportunista. Por esse motivo, em hospedeiros imunocompetentes o diagnóstico da doença demora significativamente a ser feito quando comparado ao diagnóstico em pacientes imunocomprometidos. Essa condição pode estar relacionada com a alta morbidade dessa doença devido ao baixo índice de suspeita clínica que possui (CHEN et al., 2000; AYE et al., 2016).

O diagnóstico é realizado por meio clínico, sendo a presença do fungo frequentemente confirmada por exame direto da presença do microrganismo *Cryptococcus spp.* por coloração de materiais biológicos, como líquido e outras secreções corporais, com tinta da China (nanquim), a qual evidencia a presença da cápsula mucopolissacarídica desses fungos, fazendo-se então a investigação de células em forma de leveduras, que podem conter ou não brotamento. No entanto, também podem ocorrer alterações fenotípicas no fungo nos tecidos do hospedeiro, como por exemplo, o aumento ou diminuição do tamanho celular, que podem dificultar no diagnóstico da doença, embora ajudem o fungo a sobreviver nos tecidos do hospedeiro (BAVA et al., 2008; PERFECT et al., 2010).

Foi desenvolvido para *C. neo formans*, testes moleculares para detecção de ácidos nucleicos dos agentes infecciosos em amostras biológicas, tais como sangue, licor, secreções, raspagens cutâneas (SANDHU et al., 1995; PASCHOAL et al., 2004).

Para casos de neurocriptococose, o diagnóstico pode ser realizado por técnicas mais sensíveis e específicas, como o PCR. Pois nesses casos há a necessidade de um diagnóstico precoce, para que haja uma rápida introdução de tratamento terapêutico contra o fungo (IMWIDTHAYA et al, 2000; IYER & BANKER, 2002; PASCHOAL et al., 2004).

Atualmente, o teste mais eficaz para o diagnóstico da criptococose é o teste de detecção do antígeno criptocócico (CrAg) em fluidos pacientes o qual é positivo em mais de 90% dos pacientes infectados (KOZEL & BAUMAN, 2012).

O tratamento da criptococose por *Cryptococcus neoformans* como descrito por Saag et al. (2000, p.710), depende dos locais da infecção e do estado imunitário do hospedeiro:

Infecção pulmonar sintomática e criptococemia isolada ou com infecção instalada no trato urinário ou cutâneo, tratamento com fluconazol, 200-40mg/dia, durante 3-6 meses. Intolerantes ao fluconazol, alternativa é a intraconazol, 200-400 mg/dia, durante 6-12 meses. Pacientes mais graves o tratamento é com anfotericina B, 0,5-1mg/Kg/dia, durante 6-10 semanas. Imunocompetentes com doença do SNC, a terapia consiste de anfotericina B, 0,7-1 mg/kg/dia mais flucitosina, 100 mg/Kg/d, durante 6-10 semanas. Imunocomprometidos com HIV⁻ devem ser tratados igualmente aos doentes do SNC, independentemente do local da infecção.

Portanto, no que diz respeito ao tratamento, observa-se a importância de um diagnóstico adequado, aliado principalmente ao estado do paciente e ao local da infecção.

1.5 *Cryptococcus neoformans*

É uma levedura encapsulada, pertencente ao filo dos basidiomicetos, e apresenta grande distribuição mundial, já foi isolado de solo, tronco de árvores, vegetais decompostos e em excretas de aves, principalmente de pombos, uma das maiores fontes ambientais desse fungo. (LIN, 2009; CASADEVALL & PERFECT, 1998).

Convencionalmente, sabe-se que ocorre a dispersão de *C. neoformans* por pombos através do alojamento em penas, bico e fezes. Teoricamente, não há comprovação científica de que o organismo do pombo seja infectado. Apenas, há indícios de que essas leveduras sejam tolerantes à temperatura corporal e à passagem gastrointestinal do pombo, favorecendo na disseminação do patógeno pelas fezes (LIN & HEITMAN, 2006; JANG et al, 2011).

Esse fungo normalmente reproduz-se assexuadamente por brotamento, mas em condições especiais é capaz de reproduzir-se sexuadamente ou parassexualmente. (LIN et al., 2005).

C. neoformans têm grande potencial de interesse científico e médico, pois se trata de um microrganismo presente em diversos ambientes, causando doenças considerada graves e até mesmo letais, tendo em vista serem patógenos oportunistas que podem permanecer muitos anos em latência nos tecidos de indivíduos saudáveis após a infecção. Entretanto, quando há a baixa imunidade no hospedeiro, ocorre um desequilíbrio da interação parasita-hospedeiro, que pode levar ao desenvolvimento de uma doença. Nesse sentido, pesquisas têm sido realizadas para a melhor compreensão da regulação dos fatores de virulência desses fungos patógenos (LIN & HEITMAN, 2006; CASADEVALL & PIROFSKI, 2003).

1.6 Fatores de virulência

A predisposição de um organismo humano ou animal de ser infectado pelo *C. neoformans* está associada a particularidades do momento da infecção e da expressão de fatores de virulência, durante a interação patógeno-hospedeiro, que geram resistência do fungo a imunidade do hospedeiro. Há vários fatores de virulência do *C. neoformans* que determinam a infecção. No entanto, os que mais se destacam são: termotolerância a 37°C, produção de cápsula, síntese de melanina (COELHO, BOCCA & CASADEVALL, 2014; CASADEVALL & PIROFSKI, 2003; HARRIS et al., 2014).

1.6.1 Termotolerância a 37°C

Para que a patogênese demonstre êxito, um fator determinante é a temperatura corporal do hospedeiro infectado, um ambiente propício para o desenvolvimento do fungo de 37°C (ALSPAUGH et al., 2000; PERFECT, 2006; ROBERT & CASADEVALL, 2009).

1.6.2 Produção de cápsula

A cápsula proporciona resistência ao fungo tanto no ambiente externo quanto no hospedeiro e estudiosos são unânimes ao indicá-la como principal fator de virulência do *Cryptococcus* spp. a presença de cápsula, devido ao fato de que mutantes não encapsulados, em geral, são avirulentos. Uma vez que, as linhagens desprovidas de cápsula podem de fato ser até 3 vezes mais fagocitadas que as capsuladas (CHANG & KWON-CHUNG, 1994; ZARAGOZA et al., 2009).

Constituída de 90-95% de glicoronoxilomanana (GXM), este sendo o principal componente capsular, fundamental na modulação da resposta imune através da inibição da fagocitose por macrófagos, modulação na produção de citocinas, neutralização de opsoninas, inibição da produção de anticorpos, por exemplo. Além da GXM, a cápsula possui 5% de glicoronoxilomanogalactana (GxMGal) e outros componentes em menor quantidade, como as manoproteínas tais como MP-98 e MP-99 (MA & MAY, 2009; RAKESH et al., 2008; VAISHNAW et al., 1998; MERSHON-SHIER et al., 2011; VECCHIARELLI et al., 2013).

1.6.3 Síntese de melanina

A melanina é um polímero pigmentado de cor escura, preta ou marrom, presente na parede do fungo. A melanina atua prevenindo o fungo do estresse oxidativo, protegendo-o da fagocitose, e também é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, além de proporcionar uma proteção maior à parede celular, e tornar o fungo mais resistente a antifúngicos como a anfotericina B (WANG & CASADEVALL, 1994; GOMEZ & NOSANCHUK, 2003; COELHO, BOCCA & CASADEVALL, 2014).

A melanina é sintetizada por uma enzima fenol oxidase, a Lacase, que usa como precursores compostos como L- e D- dopa, dopamina, epinefrina e norepinefrina. *C. neoformans* apresenta dois genes de lacase, LAC1 e LAC2, ambos responsáveis pela síntese da melanina, sendo o primeiro o principal, com um nível significativamente maior de transcrição basal (WILLIAMSON, 1994; PUKKILA-WORLEY et al., 2005).

1.6.4 Síntese de enzimas

Cryptococcus spp. secreta várias enzimas durante o seu crescimento, mas duas enzimas são consideradas de maior importância como fatores de virulência: a fosfolipase B e a urease.

A fosfolipase B é parte de um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolisar ésteres de glicerofosfolipídeos resultando na degradação de fosfolipídeos de membrana das células hospedeiras, e conseqüentemente, desestruturando a membrana e facilitando a lise da membrana celular, levando a liberação de lipídios como mensageiros (GHANNOUM, 2000; SCHMIEL; MILLER, 1999; MA & MAY, 2009).

Já a urease, é uma importante enzima hidrolítica secretada pelo *C. neoformans*, que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e carbamato, levando a alcalinização do ambiente, viabilizando a nutrição fúngica e facilitando a disseminação do fungo através de rupturas no tecido e da barreira hematoencefálica (EATON et al., 1991; COELHO, BOCCA & CASADEVALL, 2014). Sua produção facilita a evasão do fungo das células hospedeiras e é essencial para a disseminação desse fungo para o sistema nervoso central (SIGH et al. 2013).

1.6.5 Formação de Biofilmes

De acordo como Ramage et al. (2012) como ocorrido em bactérias, os biofilmes – comunidades microbianas dinâmicas – podem ser formados por fungos e de forma similar são capazes de resistir a tratamentos e a resposta imune do hospedeiro.

Já é demonstrado que *C. neoformans* pode formar biofilmes o que pode ser considerado como um fator de virulência para esse fungo, no entanto ainda não se tem muitos estudos avaliando-se a importância desses biofilmes na infecção in vivo (MARTINEZ & CASADEVALL, 2015; GULLO et al., 2013).

1.7 Interação fungo-hospedeiro

O *C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo que pode viver tanto em seres complexos como mamíferos, quanto em seres unicelulares como amebas (STEENBERGEN, SHUMAN & CASADEVALL, 2001). Os macrófagos são a principal célula do sistema imune responsável pela contenção desse fungo, mas também uma das células em que esse fungo pode se replicar intracelularmente. Vários relatos na literatura mostram que a sobrevivência e multiplicação desse fungo pode às vezes ser mais eficiente dentro de macrófagos do que externamente (FELDMESSER et al., 2001; JOHNSTON & MAY, 2012), indicando que o *C. neoformans* habita a célula como proteção, sendo capaz de se locomover de um macrófago para outro (GIBSON & JOHNSTON, 2015)

1.7.1 Os macrófagos na infecção por *C. neoformans*

Os macrófagos têm a capacidade de realizar a tarefa de controle da infecção até a persistência, latência e disseminação extrapulmonar da criptococose (DELEON-RODRIGUEZ & CASADEVALL, 2016).

Em uma infecção humana, a primeira barreira de defesa que o *C. neoformans* se depara ao se encontrar depositado no pulmão após a inalação são os macrófagos alveolares. Estes são os que irão conter microorganismos e demais partículas estranhas e que também reagirão a presença do fungo, internalizando-o através da fagocitose (FELDMESSER et al., 2000; GOLDMAN et al., 2001).

1.7.2 Resposta imune anti- *C. neoformans*

A fagocitose provoca a destruição dos microorganismos e inicia o processo de modulação do sistema imune do hospedeiro, acarretando na liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12, IL-18 e IFN- γ), a ativação e o recrutamento de outras células de defesas (linfócitos T auxiliares (CD4+) e linfócitos T citotóxicos (CD8+), célula natural killer (NK), neutrófilos e a apresentação de antígenos. Há

evidências que em muitos casos, os fungos não sejam totalmente eliminados permanecendo internalizados em granulomas, que são nódulos compactos, formados por uma aglomeração de células, principalmente por macrófagos grandes e multinucleados envoltos por linfócitos CD4+, com a finalidade conter a infecção (ROSE et al., 2014; SHIBUYA et al., 2005). Havendo uma diminuição significativa na imunidade do hospedeiro, pode ocorrer a desorganização do granuloma e o fungo poderia disseminar-se pelo organismo (GARCIA-HERMOSO et al., 1999).

A resposta das células T é primordial para que haja controle da doença e como observado nos pacientes com AIDS ocorre uma falha no sistema auxiliar T CD4+, podendo ser observada a proliferação do fungo nos alvéolos pulmonares. Nesse caso o fungo deixa de ser contido dentro dos pulmões, se disseminando pelo corpo, em especial para o sistema nervoso central, onde se aloja resultando nas formas mais graves da infecção, as meningites e a meningoencefalites (SHIBUYA et al., 2005; BOVERS et al., 2008; MITCHELL & PERFECT, 1995; PERFECT & CASADEVALL, 2002; BICANIC & HARRISON, 2005).

1.8 Metabólitos secundários produzidos por fungos

Metabólitos secundários são moléculas de baixo peso molecular, ou seja, menores de 1KDa, produzidas ao longo do crescimento microbiano e que podem ser bioativos, ou seja, tem capacidade de interagir com o ambiente, participando de diversas atividades biológicas, sendo determinantes nas interações fúngicas com outros organismos, um exemplo disso são as moléculas antibióticas produzidas por fungos como a penicilina e as pleuromutilinas (BRAKHAGE & SCHOROECKN et al., 2011; KELLER et al., 2005; BILLS & GLOER, 2016; KEMPEN & ROHLFS, 2009).

Dessa maneira, podem ter papéis importantes na virulência fúngica, tanto em infecção vegetal quanto animal, e também servem de moléculas de comunicação ou de defesa contra outros microorganismos (MACHELEIDT et al., 2016).

1.8.1 Potencial dos metabólitos secundários na interação patógeno-hospedeiro

Atualmente, sabe-se bastante sobre o papel moléculas de alto peso molecular (maiores de 1 KDa), como a GXM, as vesículas e as enzimas na biologia de *C. neoformans* bem como na sua interação com o hospedeiro. Tendo em vista o potencial papel de metabólitos secundários na interação patógeno-hospedeiro, e o fato que fungos em seu ambiente são submetidos a estressores bióticos e abióticos, fazendo com que produzam um grande número de metabólitos secundários, tem-se despontado o interesse pelo conhecimento do papel dos metabólitos secundários fúngicos em micoses humanas (GARVEY & KELLER, 2010; BRAKHAGE & SCHOROECKH, 2011).

O fungo é capaz de produzir grande quantidade de metabólitos secundários com diversas funções, como na virulência e comunicação intraespecífica (sensoriamento de quórum) e interespecífica com outros microrganismos (MACHELEIDT et al., 2016). Muito embora tais metabólitos não sejam os principais colaboradores para a eficácia da patogenicidade do fungo, alguns metabólitos específicos são fatores de virulência já conhecidos e que podem modificar a resposta imune do hospedeiro contra os fungos, como a gliotoxina e a DHN-melaniana produzidas por *Aspergillus fumigatus* (BIGNEL et al., 2016). A coexistência entre espécies é constante e esses metabólitos podem exercer uma gama de papéis na comunicação dentro de uma espécie ou entre espécies diferentes, como defesa e obtenção de alimentos (BRAKHAGE & SCHOROECK, 2011; SPITELLER, 2015).

O processo de comunicação microbiana conhecido como sensoriamento de quórum (QS) em que os microrganismos desenvolveram um mecanismo de regulação de comportamentos dependente da densidade celular microbiana, em muitos casos é mediado por metabólitos secundários. Embora já bem estabelecido para bactérias, ainda apresenta muitas questões em se tratando de fungos. Esse processo é melhor conhecido no fungo polimórfico *Candida albicans*, no qual entre outros processos regula a filamentação desse fungo em resposta a produção de dois metabólitos, farnesol e tirosol (HORNBY et al 2001; CHEN et al 2004; ALBUQUERQUE & CASADEVALL, 2012).

Albuquerque et al. (2014) verificaram que pequenas moléculas presentes no meio condicionado, proveniente de *C. neoformans*, produziram efeito em crescimento planctônico desse fungo e em biofilmes, melanização e secreção de polissacarídeos capsulares, além de estimular o crescimento de outros fungos, como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, em reação cruzada. Nesse trabalho, visamos dar continuidade a caracterização dessas moléculas, dessa vez avaliando o seu possível papel na interação do fungo com macrófagos murinos.

2 JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma doença fúngica que causa um grande número de mortes cujo diagnóstico e tratamentos ainda são limitados. Dessa forma, tendo em vista que o desenvolvimento da criptococose depende primariamente da relação entre o fungo e o sistema imune do hospedeiro, torna-se necessário conhecer melhor essa interação sob diferentes aspectos a fim de se tentar elaborar melhores estratégias dessa doença. Uma vez que metabólitos secundários podem ter uma influência importante nas interações fungo-hospedeiro, acreditamos que a avaliação do potencial papel de metabólitos secretados pelo fungo possa nos ajudar a entender melhor a interação entre esses dois organismos.

3 HIPÓTESE

Pequenos metabólitos secretados por *C. neoformans* podem influenciar na interação com macrófagos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral analisar a influência de pequenas moléculas secretadas pelo fungo *C. neoformans* na interação com macrófagos murinos.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos de pequenas moléculas secretas por *C. neoformans* na:
 - 1) Fagocitose por macrófagos murinos.
 - 2) Sobrevivência do fungo após infecção *in vitro* desse fungo com macrófagos murinos.
 - 3) Produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos murinos.

9. PERSPECTIVAS

Na perspectiva da melhor compreensão dos efeitos do CM na sobrevivência fúngica e também na fagocitose, serão necessários avaliar outras variáveis na interação fungo-macrófago, tal como: na exocitose não lítica, em outros tempos de interação, com outros tipos de macrófagos, ativo ou não ativados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi--a review. *Med Mycol.*, 2012; 50:337-45.

ALBUQUERQUE, P.; NICOLA, A.M.; NIEVES, E.; PAES, H.C.; Williamson, P.R.; Silva-Pereira, I., et al. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *MBio.*, 2014; 5(1).

ALMEIDA, R.S. et al. The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog.*, 2008; 4(11):1-17.

ALSPAUGH, J.A.; DAVIDSON, R.C.; HEITMAN, J. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Contrib Microbiol.*, 2000; 5:217-38.

ALVES, S.H., Lopes, J.O.; Costa, J.M., et al. Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. *Ver. Inst. Med Trop São Paulo*, 1997; 39:359-62.

ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G.; BROWN, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends in microbiology*, 2014; 22(3):120-127.

AYE, C.; HENDERSON, A.; YU, H.; NORTON, R. Cryptococcosis – The Impact of Delay to Diagnosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.022.

BAVA, J.; SOLARI, R.; ISLA, G.; TRONCOSO, A. Atypical forms of *Cryptococcus neoformans* in CSF of an AIDS patient. *J Infect Developing Countries*, 2008; 2(5):403-405.

BICANIC, T.; HARRISON, T.S. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin*, 2005; 72: 99–118.

BIGNELL, E.; CAIRNS, T.C.; THROCKMORTON, K.; NIERMAN, W.C. & KELLER, N.P. Secondary metabolite arsenal of an opportunistic pathogenic fungus. *Phil. Trans. R Soc. B*, 2016; 371:20160023.

BILLS, G.F.; GLOER, J.B. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiol Spectrum*, 2016; 4(6):1-32.

BOVERS, M.; HAGEN, F., BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol*, 2008; 25:4-12.

BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKN, V. Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Biol.*, 2011; 48(1):15-22.

CASADEVALL, A., PIROFSKI, L.A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.*, 2003; 1(1):17–24.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: ASM Press, 1998.

CHANG, Y. C., KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol.*, 1994; 14:4912-4919.

CHARLIER, C., NIELSEN, K., DAOU, S., Brigitte, M., Chrétien, F., Dromer, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.*, 2009; 77(1):120–27.

CHAYAKULKEEREE, M., PERFECT, J.R. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.*, 2006; 20(3):507-44, v-vi.

CHEN, H., FUJITA, M., FENG, Q., CLARDY, J., FINK, G.R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2004; 101:5048-52.

CHEN, S., SORRELL, T., NIMMO, G., SPEED, B., CURRIE, B., ELLIS, D. et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis.*, 2000, Aug.; 31:499-508.

CHÉRETIEN, F. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *J Infect Dis.*, 2002, Aug.; 15;186(4):522-30.

COELHO, C; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Pathol*, 2014; 9:219-138.

COLOMBO, A.L.; Matta, D.; Almeida, L.P., et al. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *Braz J Infect Dis*. 2002; 6:118-23.

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2008; 41(5):524-544.

DE JESUS, M.; NICOLA, A.M.; FRASES, S.; LEE, I.R.; MIESES, S.; CASADEVALL, A. Galactoxylomannan-mediated immunological paralysis results from specific B cell depletion in the context of widespread immune system damage. *J Immunol.*, 2009, Sep. 183(6): 3885–3894.

DEL POETA M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.*, 2004; 3(5):1067–1075.

DEL POETA M.; CASADEVALL, A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. *Mycopathologia*. 2012; 173:303-10.

DELEON-RODRIGUEZ, C.M.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans*: tripping on acid in the phagolysosome. *Frontiers in Microbiology.*, 2016; 7:164. 1-9.

EATON, K. A.; BROOKS, C. L.; MORGAN, D. R. & KRAKOWKA, S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.*, 1991; 59, 2470–2475.

FELDMESSER M., KRESS, Y., NOVIKOFF, P., CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect. Immun.*, 2000; 68:4225–4237.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitismo of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.*, 2001; 9, 273–278.

FICA, A.C. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Rev Chil Infectol.*, 2004; 21:26-38.

GARCIA-HERMOSO, D., JANBON, G., DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol.*, 1999; 37(10):3204–9.

GARCIA-SOLACHE, M.A., CASADEVALL, A. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *mBio.*, 2010; Apr. 1(1):1-3.

GARVEY, G.S., KELLER, N.P. Fungal secondary metabolites and their fundamental roles in human mycoses. *Curr. Fungal Infect.*, 2010; Rep. 4, 1-10.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.*, 2000; Jan.13(1):122-43.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L.C. et al. The burden of serious human fungal infections in Brasil. *Mycoses*, 2016; Mar. 59(3): 145-150.

GIBSON, J.F., JOHNSTON, S.A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genetics and Biology.*, 2015; May. 78:76-86.

GILES, S.S., DAGENAIS, T.R.T., BOTTS, M.R., KELLER, N.P., HULL, C.M. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.*, 2009; 77(8):3491–500.

GOLDMAN, D.L., KHINE, H., ABADI, J., LINDENBERG, D.J., PIROFSKI, L.A. ET AL. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics*, 2001; 107(5):e66.

GÓMEZ, B.L, NOSANCHUK, J.D. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis.*, 2003. Apr; 16(2):91-6.

GUILLOT, L., CARROLL, S.F., BADAWY, M., QURESHI, S.T. *Cryptococcus neoformans* induces IL-8 secretion and CXCL1 expression by human bronchial epithelial cells. *Respir Res.*, 2008; 9(1):9.

GULLO, F.P; ROSSI, S.A.; SARDEI, Jde C. et. al. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 2013; Nov. 32(11):1377-91.

GUPTA, A.K., Tomas, E. New antifungal agents. *Dermatol Clin.*, 2003; Jul. 21(3):565-76.

HARRIS, J. R.; GALANIS, E.; LOCKHART, S. R. *Cryptococcus gattii* Infections and Virulence, *Curr Fungal Infect Rep.*, 2014; 8:81-89.

HORNBY, J.M., JENSEN, E.C., LISEC, A.D., TASTO, J.J., JAHNKE, B., SHOEMAKER, R., et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.*, 2001; 67:2982-92.

HUFFNAGLE, G. B., G. H., CHEN, J. L., CURTIS, R. A., MCDONALD, R. M. Strieter, and G. B. Toews. Downregulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.*, 1995; 155:3507–3516.

IMWIDHAYA, P., POUNGVARIN, N. Cryptococcosis in AIDS. *Postgrad Med J.*, 2000; Feb. 76(892):85-8.

IYER, R.S., BANKER, D.D. Cryptococcal meningitis in AIDS. *Indian J Med Sci.*, 2002; Dec; 56(12):593-7.

JANG, Y.H., LEE, S.J., LEE, J.H., CHAE, H.S., KIM, S.H. & CHOE, N.H. Prevalence of yeast-like fungi and evaluation of several virulence factors from feral pigeons in Seoul, Korea. *Letters in Applied Microbiology*, 2011; 52, 367-371.

JIANG, S. Immunity against fungal infections. *Immunology and Immunogenetics Insights*, 2016:8. 3-6..

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cellular Microbiology.*, 2012; 15(3), 403–411.

KELLER, N.P., TURNER, G., BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005; 3, 937–947.

KEMPKEN, F., ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defence strategy against antagonistic animal? *Fungal Ecology*, 2009; xxx. 1– 8.

KIERTIBURANAKUL, S., WIROJTANANUGOON, S., PRACHARTAM, R., et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients. *Int J Infect Dis.*, 2006; 10(1):72–8.

KWON-CHUNG KJ, FRASER JA, DOERING TL, WANG Z, JANBON G, IDNURM A, BAHN YS. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; Jul. 1;4(7):a019760.

KWON-CHUNG KJ, VARMA A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res. 2006; 6:574-87.

KOZEL, T. R., BAUMAN, S. K. CrAg Lateral Flow Assay for Cryptococcosis. Expert Opin Med Diagn., 2012; May. 6(3).

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO. Tratado de Micologia Médica. São Paulo: Sarvier, 2002; 416-435.

LEOPOLD WAGER, C.M., HOLE, C.R., WOZNIAK, K.L., WORMLEY, F.L. JR. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. Front Microbiol., 2016; Feb. 9; 7:105.

LEVITZ, S. M., A. TABUNI, H. KORNFELD, C. CAMPBELL REARDON, AND D. T. GOLENBOCK. Production of tumor necrosis factor alpha in human leukocytes stimulated by *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun., 1994; 62:1975–1981.

LIN, X., HULL, C.M., HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. Nature, 2005; 434:1017–21.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. Infect Genet Evol., 2009; 9(4):401-16.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annual Review of Microbiology, 2006; 14(5): 69-105.

LIU, T.B., PERLIN, D.S., XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. Virulence, 2012; 3:173–181.

LUTZ, M. B. et al. Na advanced culture method for generating large quantities of highly purê dendritic cells from mouse boné marrow. Journal of immunological methods, 1999; 223(1):77-92.

MA, H., MAY, R.C. Virulence in *Cryptococcus* species. Adv Appl Microbiol., 2009; 67:131-90.

MACHELEIDT, J.; MATTERN, D.J; FISCHER, J. et. al. Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. Annu Rev Genet., 2016; Nov. 23; 50:371-392.

MARTINEZ, L.R., CASADEVALL, A. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. Microbiol Spectrum, 2015; 3(3): MB-0006- 2014.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am, 2016. Mar. 30(1):179-206.

MERSHON-SHIER, K. L., VASUTHASAWAT, A., TAKAHASHI, K., MORRISON, S. L., BEENHOUWER, D. O. In vitro C3 deposition on *Cryptococcus* capsule occurs via multiple complement activation pathways. Molecular Immunology, 2011; 48.

MITCHELL, T.G., PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Ver., 1995; 8:515-48.

MOLINARO, E.M. Micologia. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC; 2009.

MOREIRA, T.A., FERREIRA, R.M.R, BORGES, A.S. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratory study and fungi varieties in 96 patients. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2006; 39:255-258.

NICOLA, A.M.; CASADEVALL, A. In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. Methods Mol Biol., 2012; 844:1189-97.

PASCHOAL, R.C.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.C.; MELHEM, M.S.C.; DIAS, A.L.T. & PAULA, C.R. *Neurocryptococcosis*: diagnosis by PCR method. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 2004; 46(4):203-207.

PERFECT, J.R.; DISMUKES, W.E; DROMER, F. et al. *Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease*: 2010.Update by the Infectious Diseases Society of America. Guidelines for Management of Cryptococcosis. CID, 2010:50.

PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am., 2002; 16(4):837-74, v-vi.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: The yeast that likes it hot. FEMS Yeast Research, 2006; 6, 463–468.

PUKKILA-WORLEY, R.; GERRALD, Q. D.; KRAUS, P. R.; BOILY, M. J.; DAVIS, M. J.; GILES, S. S., et al. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. Eukaryotic Cell, 2005; 4: 190–201.

RAJASINGHAM, R.; SMITH, R.S; PARK, B.J. et al. *Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis*: na updated analysis. The Lancet Infect Dis, 2017. May 5, 2017.

RAKESH, V.; SCHWEITZER, A. D.; ZARAGOZA, O.; BRYAN, R.; WONG, K.; DATTA, A.; CASADEVALL, A.; DADACHOVA, E. Finite-element model of interaction between fungal polysaccharide and monoclonal antibody in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. J Phys Chem B, 2008. 112: 8514-8522.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; et al. Fungal biofilms resistance. Int J Microbiol., 2012. 2012:528521, 14p.

RETINI, C., KOZEL, T.R., PIETRELLA, D., MONARI, C., BISTONI, F., VECCHIARELLI, A. 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*. Infect Immun, 2001; 69(10): 6064-73.

ROBERT, V. A., & CASADEVALL, A. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *The Journal of Infectious Diseases*, 2009; 200(10):1623–6.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews. Immunology*, 2011; 11(4): 275–88.

ROSE, C.D., NEVEN, B., WOUTERS, C. Granulomatous inflammation: the overlap of immune deficiency and inflammation. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2014; 28:191–212.

SAAG, M.S ET AL. Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease. *Clinical Infectious Diseases (CID)*, 2000; 30:710–8.

SANDHU G.S., KLINE B.C., STOCKMAN L., ROBERTS G.D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol.*, 1995; Nov. 33(11):2913-9.

SCHMIEL, D.H., MILLER, V.L. Bacterial phospholipases and pathogenesis *Microbes and Infection.*, 1999; 1:1103–1112.

SHIBUYA, K., HIRATA, A., OMUTA, J., SUGAMATA, M., KATORI, S., et al. Granuloma and cryptococcosis. *J Infect Chemother.*, 2005; 11(3):115–22.

SINGH, A., PANTING, R.J., VARMA, A., SAIJO, T., WALDRON, K.J., JONG, A., NGAMSKULRUNGROJ, P., CHANG, Y.C., RUTHERFORD, J.C., KWON-CHUNG, K.J. Factors required for activation of uréase as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*, 2013; 4.: e00220-13.

SINKO, J. Invasive fungal infections are malignant Hematological diseases. *Magy Onkol.*, 2017; Mar. 8;61(1):75-80.

SPITELLER, P. Chemical ecology of fungi. *Nat Prod Rep.* 2015; Jul. 32(7):971-93.

SRIKANTA, D., SANTIAGO-TIRADO, F. H. & DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*, 2014; 31:47–60.

STEENBERGEN, J. N., SHUMAN, H. A., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98(26):15245-15250.

VAISHNAV, V. V.; BACON, B. E.; O'NEIL, M.; CHERNIAK, R. Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. *Carbohydr Res.*, 1998; 306:315-330.

VECCHIARELLI, A., PERICOLINI, E., GABRIELLI, E., KENNO, S., PERITO, S., CENCI, E., MONARI, C. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Future Microbiol.* 2013; 8(9):1107-1116.

VECCHIARELLI, A., PERICOLINI, E., GABRIELLI, E., et al. *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. *Immunotherapy*, 2011; 3(8):997–1005.

VU, K., THAM, R., UHRIG, J.P., et al. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. *MBio*, 2014; 5(3):e01101-14.

WANG, Y., CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol*, 1994; 60: 3864-3866.

WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J. Bacteriol.*, 1994; 176:656–664.

WOZNIAK, K.L., HARDISON, S., OLSZEWSKI, M., WOEMLEY JR, F. L. Induction of protective immunity against Cryptococcosis. *Mycopathologia*, 2012; 173:387-394.

ZARAGOZA, O., RODRIGUEZ, M. L., DE JESUS, M., FRASES, S., DADACHOVA, E., CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol.*, 2009; 68:133-216.