

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de pós-graduação em Biologia Molecular



**O papel da melanina e da lacase 1 de *Cryptococcus neoformans* na inflamação e morte celular de macrófagos humanos.**

Amanda Pereira Rocha

Brasília, Distrito Federal

2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

AMANDA PEREIRA ROCHA

O PAPEL DA MELANINA E DA LACASE 1 DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*  
NA INFLAMAÇÃO E MORTE CELULAR DE MACRÓFAGOS HUMANOS.

Tese apresentada como requisito  
parcial para a obtenção de título  
de Doutor em Biologia Molecular  
pelo programa de pós-graduação em  
Biologia Molecular da Universidade  
de Brasília

Área de concentração: Ciências Biológicas  
Linha de pesquisa: Imunologia de doenças infecciosas

Orientador: André Moraes Nicola

BRASÍLIA

2024

## RESUMO

*Cryptococcus neoformans* é o agente mais comum da criptococose. Anualmente, ocorrem cerca de 152 mil novos casos de criptococose, sendo que 73% destes levam à morte. *C. neoformans* é capaz de produzir melanina, que é catalisada pela enzima lacase 1 (LAC1). Embora a melanina em *C. neoformans* tenha um papel na sobrevivência do fungo no ambiente externo, este componente desenvolveu-se como um importante fator de virulência durante a interação com o hospedeiro mamífero, favorecendo a infecção. A cápsula de *C. neoformans*, fator de virulência mais crítico desse patógeno, já apresentou alguma interferência na inflamação e morte celular. No entanto, o papel da melanina e da LAC1 na inflamação e morte das células hospedeiras humanas permanece obscuro. Portanto, neste trabalho estudamos se a melanina e LAC1 intercedem em mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos humanos e, conseqüentemente, na sua morte. A melanina causou menos fagocitose de células de levedura no início da infecção (2 h.p.i), mas não é possível notar diferença em leveduras internalizadas em períodos mais tardios (24 h.p.i). Já LAC1 parece não interferir na fagocitose. *C. neoformans* promoveu ativação da via NF- $\kappa$ B e IRF; entretanto, a melanina e o LAC1 não interferiram nesse processo. Pudemos notar que *C. neoformans* promove mais morte apenas nas primeiras horas de infecção, com quase três vezes mais apoptose em comparação com células sem infecção. Porém, na infecção tardia, a morte lítica é predominante e a apoptose quase inexistente com a interação de *C. neoformans*. A melanina diminui a apoptose tanto no início como na infecção tardia, enquanto a LAC1 aumenta a apoptose nos primeiros tempos, mas atenua a apoptose após 24 h.p.i. A caspase 8 (CASP8) é clivada e ativada no início da infecção e se mantém ao longo desta. Por outro lado, CASP1, CASP3 e GSDMD foram clivadas na infecção tardia. A ativação dessas proteínas provavelmente explica mais apoptose observada no início e morte lítica no final da infecção. Investigando qual fator do hospedeiro relacionado à inflamação poderia ser afetado pela infecção por *C. neoformans*, NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 parecem estar envolvidos, uma vez que sua inibição afeta a fagocitose de células de levedura, aumenta a morte celular, embora diminua a apoptose, principalmente nas primeiras horas. Por outro lado, a inibição de CASP1 causou menos fagocitose e ligeiro aumento de morte no início, que foi mais pronunciado na infecção tardia. Porém, não conseguimos observar esses fenômenos na presença de melanina no início da infecção, enquanto a presença de LAC1 pode ser necessária para desencadear a morte por CASP8 sem afetar NLRP3 e AIM2. Portanto, melanina e LAC1 de *C. neoformans* poderiam afetar a inflamação e a morte celular, talvez mediada por NLRP3, AIM2 e CASP8 das células hospedeiras.

**Palavras-chaves:** Criptococose, *Cryptococcus neoformans*, melanina, LAC1, macrófagos, infecção, imunidade, inflamação, morte celular

## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* is the most common agent of cryptococcosis. Every year, around 152,000 new cases of cryptococcosis occur, 73% of which lead to death. *C. neoformans* is capable of producing melanin, which is catalyzed by the enzyme laccase 1 (LAC1). Although melanin in *C. neoformans* plays a role in the survival of the fungus in the external environment, this component developed as an important virulence factor during interaction with the mammalian host, favoring infection. The *C. neoformans* capsule, the most critical virulence factor of this pathogen, has already shown some interference with inflammation and cell death. However, the role of melanin and LAC1 in human host cell inflammation and death remains unclear. Therefore, in this work we studied whether melanin and LAC1 intervene in inflammatory mediators produced by human macrophages and, consequently, in their death. Melanin caused less phagocytosis of yeast cells at the beginning of infection (2 h.p.i), but it was not possible to notice a difference in yeast internalized at later periods (24 h.p.i). LAC1 does not seem to interfere with phagocytosis. *C. neoformans* promoted activation of the NF- $\kappa$ B and IRF pathways; however, melanin and LAC1 did not interfere with this process. We were able to notice that *C. neoformans* promotes more death only in the first hours of infection, with almost three times more apoptosis compared to cells without infection. However, in late infection, lytic death is predominant and apoptosis is almost non-existent with the interaction of *C. neoformans*. Melanin decreases apoptosis both at early and late infection, while LAC1 increases apoptosis at early times, but attenuates apoptosis after 24 h.p.i. Caspase 8 (CASP8) is cleaved and activated at the beginning of infection and remains throughout it. On the other hand, CASP1, CASP3 and GSDMD were cleaved in late infection. Activation of these proteins likely explains more apoptosis observed early and lytic death late in infection. Investigating which host factor related to inflammation could be affected by *C. neoformans* infection, NLRP3, AIM2, CASP1 and CASP8 appear to be involved, since their inhibition affects the phagocytosis of yeast cells, increases cell death, although decreases the apoptosis, especially in the first hours. Conversely, CASP1 inhibition caused less phagocytosis and a slight increase in early killing, which was more pronounced in late infection. However, we were unable to observe these phenomena in the presence of melanin at the beginning of infection, whereas the presence of LAC1 may be necessary to trigger death by CASP8 without affecting NLRP3 and AIM2. Therefore, melanin and LAC1 from *C. neoformans* could affect inflammation and cell death, perhaps mediated by NLRP3, AIM2 and CASP8 of host cells.

**Key words:** Cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*, melanin, laccase 1, macrophages, infection, immunity, inflammation, cell death



*“Avalia-se a inteligência de um indivíduo pela quantidade de incertezas que ele é capaz de suportar.”*

**Immanuel Kant**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho ao meu eterno e querido herói, Matuzalem Rocha da Silva.

Uma pessoa tão simples, alegre e alto astral, que quem o conhecia no dia a dia nem poderia imaginar como foi castigado com uma vida árdua, repleta de dificuldades, miséria, sofrimento e trabalho duro. Mesmo tendo que enfrentar tantas barreiras ao longo da vida, sempre trabalhou muito desde cedo, correu atrás dos seus sonhos, fez inúmeros sacrifícios para poder melhorar de vida e sempre proporcionar o melhor que podia para sua família. Me ensinou valores imprescindíveis que guiam e vão guiar para sempre minha jornada. Me apoiou e me incentivou incondicionalmente em todas as minhas ideias e aventuras malucas, mesmo sem compreendê-las, mesmo as vezes tentando me impedir para me proteger, com medo de eu que pudesse me frustrar ou me ferir. Mas no fim me permitiu ser livre para que eu tomasse as rédeas do meu destino e pudesse correr atrás das minhas ambições, mesmo que não fossem compatíveis com os planos que ele tinha em mente para mim. Por isso, sempre dei o máximo que estava ao meu alcance para que você sentisse orgulho de mim, espero ter conseguido alcançar isso antes da sua partida. Para que fique em paz e com a consciência tranquila e satisfeito de saber que você criou essa menina que agora está pronta para seguir sua vida sozinha e continuar perpetuando seu legado, seus ensinamentos e manter sua lembrança viva. Me entristece muito saber que você não está mais aqui para poder ver a conclusão dessa etapa tão importante na minha vida, a qual você foi peça chave para eu conseguir chegar até aqui. Mas espero que onde esteja agora, que você possa se sentir orgulhoso de mim. Eu mesmo sempre senti muito orgulho de você. Você é minha inspiração, trabalho todos os dias para ser ao menos metade do ser humano maravilhoso que você era. As minhas vitórias sempre foram e sempre serão suas. Te amarei para sempre, meu querido pai.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente ao meu pai e minha mãe, que apesar de todos os conflitos e discordâncias, foram as únicas pessoas que me apoiaram incondicionalmente em todos os meus planos e ambições em todos os momentos da minha vida. Foram os únicos também que sempre me ajudaram, me reergueram e estiveram do meu lado nos momentos de glória e de sufoco.

Gostaria de agradecer aos meus amigos que também proporcionaram muito apoio e auxílio, tanto na área profissional como pessoal. Agradeço especialmente à Natalia Montenegro, Gabriel Pasquarelli, Samir Hamady, Mariana Mathias, Igor Santos, Clara Luna, Gleiciane Gontijo, Tarcila Zaparoli e Rhayza Brito.

Um agradecimento em especial ao meu orientador, André Nicola, que me acolheu e me aceitou em seu grupo quando todo mundo parecia me dar as costas. Me deu total liberdade e autonomia para realizar um projeto do meu interesse, me resgatou nos momentos difíceis e perdidos, confiou no meu trabalho e me guiou sempre que necessário com paciência e cuidado. Foi um excelente professor dentro e fora do laboratório, com uma didática invejável, me ensinando muito sobre imunologia, doenças infecciosas, fatores de virulência, etc., assim como compartilhando diversas experiências profissionais. Tem me ensinado também muitos ensinamentos que me auxiliam na vida pessoal, me permitindo não só evoluir muito como profissional e cientista, mas também uma cidadã e como ser humano. Obrigada professor, o senhor é um exemplo de profissional, pesquisador, amigo e pessoa que admiro e que almejo ser no futuro.

Gostaria também de salientar minha eterna gratidão pelo companheirismo, auxílio, conversas e momentos de distrações proporcionados pelos meus colegas de laboratório do LabMIB, em especial à Jéssika, Thaís, Thalita, Luiz, Maria Carolina e ao Marcelo. Vocês tornaram o trabalho árduo muito mais ameno e os dias mais leves e agradáveis.

Agradeço imensamente aos mestres que também nos auxiliaram neste projeto, dando sugestões, apoio, conhecimento e até mesmo fornecendo itens que eram necessários, especialmente à prof. Kelly Magalhães, Patrícia Albuquerque, Hugo Costa, Pedro Bürgel, Ildinete Silva.

Não poderia esquecer também de agradecer toda paciência e apoio que recebi dos meus mestres e chefes de trabalho da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Elíbio Rech, Daniela Bittencourt e Grácia Rosinha. Me aceitaram em seu grupo para trabalhar com bolsa, mesmo cientes das minhas limitações de tempo e dedicação devido à finalização do doutorado, compreenderam minhas necessidades e me deram todo

suporte para que eu concluísse essa etapa, se mostrando pacientes e compreensíveis. Eu não teria conseguido finalizar esse processo sem vocês.

Por último gostaria de agradecer à Universidade de Brasília que tem sido minha casa por quase 13 anos, onde me formei, vivenciei vários estágios, aprendi novas disciplinas, fiz novos amigos, compartilhei inúmeras experiências e aprendi outras novas, concluí meu mestrado e agora tenho a oportunidade de finalizar meu doutorado nesta universidade que sempre me acolheu e me fez me sentir muito bem-vinda. Além disso, agradeço aos órgãos de fomento CAPES e CNPq por viabilizar e financiar esse projeto em que trabalhamos duro, e conseqüentemente, ter permitido gerar tanto conhecimento e frutos.

## Sumário

1.	15	
1.1.	Criptococose	15
1.2.	Reconhecimento de patógenos, formação de inflamassomas e produção de mediadores inflamatórios	18
1.3.	Morte celular de células hospedeiras	21
1.4.	Resposta imunológica contra <i>C. neoformans</i> e seus mecanismos de evasão	25
1.4.	29	
1.5.	Ativação de inflamassomas por fungos patogênicos e <i>C. neoformans</i>	34
2.	37	
3.	Objetivo	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4.	Metodologia	39
4.1.	Cultivo de THP-1 e diferenciação em macrófagos	39
4.2.	Cultivo de leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i>	39
4.3.	Indução de produção de melanina em <i>C. neoformans</i>	39
4.4.	Infecção de macrófagos por leveduras de <i>C. neoformans</i>	39
4.5.	Taxa de fagocitose de macrófagos por <i>C. neoformans</i>	40
4.6.	Morte celular ocasionada por <i>C. neoformans</i>	40
4.7.	Inibição de proteínas dos inflamassomas e de vias de morte	40
4.8.	Avaliação de ativação de inflamassomas	41
4.9.	Análise de dados e estatística	41
5.	Resultados	44
5.1.	Padronização de experimentos	44
5.1.1	Obtenção de macrófagos a partir de monócitos de THP-1	44
5.1.2	Melanização de <i>C. neoformans</i> H99 selvagem e $\Delta$ LAC1	46
5.1.3.	Opsonização e fagocitose de <i>C. neoformans</i> por macrófagos-THP-1	50
5.1.4.	Viabilidade de macrófagos-THP-1 e leveduras de <i>C. neoformans</i> na presença de PSH	57
5.2.	Influência da melanina e LAC1 de <i>C. neoformans</i> na sua fagocitose por macrófagos de THP-1	62
5.3.	Reconhecimento e ativação da via do NF- $\kappa$ B e IRFs por <i>C. neoformans</i> e a interferência da melanina e da LAC1 nesses mecanismos	68
5.4.	Influência da melanina e LAC1 de <i>C. neoformans</i> na morte de macrófagos de THP-1	70
5.5.	Análise de formação de inflamassomas em macrófagos de THP-1 desencadeados pela infecção com <i>C. neoformans</i> , pela sua melanina ou sua LAC1.	75
5.6.	A influência de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 na infecção por <i>C. neoformans</i>	87

5.6.1. A influência de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 na fagocitose de <i>C. neoformans</i> por macrófagos humanos	87
5.5.2. A influência de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 na sobrevivência de <i>C. neoformans</i> em macrófagos humanos	89
6. Discussão	98
7. Conclusão	105
8. Referências bibliográficas:	109

## Sumário de figuras

Figura 1. Estimativas globais e regionais da incidência de antigenemia criptocócica, meningite criptocócica e mortes relacionadas à criptococose. (RAJASINGHAM <i>et al.</i> , 2022).	16
Figura 2. Transmissão e patogênese da criptococose de <i>C. neoformans</i> .	18
Figura 3. Reconhecimento, fagocitose e mecanismos efetores ativados por patógenos reconhecidos intracelularmente.	24
Figura 4. Resposta imunológica contra <i>C. neoformans</i> , mecanismos de evasão da imunidade do fungo e desfechos clínicos.	27
Figura 5. Vias biossintéticas simplificadas de cinco categorias diferentes de melanina: eumelanina, neuromelanina, feomelanina e os dois análogos livres de nitrogênio, piomelanina e alomelanina.	30
Figura 6. Modelo representando a formação de melanina em <i>C. neoformans</i>	32
Figura 7. Mecanismos de fagocitose, reconhecimento intracelular, evasão e indução de morte celular por <i>C. neoformans</i> .	36
Figura 8. Fluxograma das etapas e metodologias aplicadas para diferentes estágios do trabalho realizado.	43
Figura 9. Macrófagos obtidos a partir da diferenciação de células THP-1 estimulado com PMA por 72h.	45
Figura 10. Número de células suspensas no sobrenadante após estímulo com PMA.	46
Figura 11. Esquema de coloração adquirida por <i>C. neoformans</i> selvagem (WT) e $\Delta$ LAC1 durante melanização.	47
Figura 12. Melanização de <i>C. neoformans</i> H99 selvagem e $\Delta$ LAC1 e meio contendo glicina e L-DOPA após 5 dias.	48
Figura 13. Melanização acelerada em <i>C. neoformans</i> H99 selvagem e $\Delta$ LAC1 a medida que se aumenta a densidade de leveduras.	49
Figura 14. Melanização de <i>C. neoformans</i> H99 selvagem e $\Delta$ LAC1 com densidade de $1 \times 10^8$ leveduras/mL em meio contendo glicina e L-DOPA após 24h.	50
Figura 15. Fagocitose de leveduras de <i>C. neoformans</i> selvagem por macrófagos com diferentes concentrações de distintos agentes opsonizantes	52
Figura 16: Comparação de fagocitose de leveduras de <i>C. neoformans</i> selvagem por macrófagos em diferentes concentrações do soro fresco e congelado.	54
Figura 17. Número de leveduras de <i>C. neoformans</i> H99 selvagem fagocitadas por macrófago.	54
Figura 18. Unidades formadoras de colônia (CFU) de leveduras de <i>C. neoformans</i> H99 selvagem internalizadas por macrófagos sob diferentes agentes opsonizantes.	55
Figura 19. Proporção de macrófagos contendo leveduras de <i>C. neoformans</i> H99 selvagem internalizadas (fagocitose) ou não (sem fagocitose) e número de leveduras fagocitadas por macrófago.	56
Figura 20. Viabilidade de <i>C. neoformans</i> H99 selvagem incubado em diferentes concentrações de PSH por 30 min.	58
Figura 21. Viabilidade de <i>C. neoformans</i> H99 selvagem ao PSH na presença de melanina e LAC1.	59

Figura 22. Porcentagem de células THP-1 vivas e mortas após incubação por 2 e 24h com PSH em diferentes concentrações.	60
Figura 23. Número de células THP-1 mortas após incubação com PSH.	61
Figura 24. Número de macrófagos derivados de THP-1 mortos após incubação com PSH por 4h.	62
Figura 25. Porcentagem de macrófagos que fagocitaram leveduras de <i>C. neoformans</i> que produziam ou não melanina e LAC1 e número de leveduras por macrófago na presença de PSH.	64
Figura 26. Porcentagem de macrófagos que fagocitaram leveduras de <i>C. neoformans</i> que produziam ou não melanina e LAC1 na ausência de PSH.	65
Figura 27. Estratégia de definição de população para MO-THP1 e definição de MO-THP1 infectados com leveduras de <i>C. neoformans</i> ou não.	67
Figura 28. Fagocitose de leveduras de <i>C. neoformans</i> H99 na presença ou ausência de melanina e LAC1 por MO-THP1 através de citometria de fluxo em 2, 5 e 24 h.p.i.	67
Figura 29. Sobrevivência de <i>C. neoformans</i> H99 na presença ou ausência de melanina e LAC1 fagocitados por macrófagos derivados de THP1 após 2, 5 e 24 h.p.i.	68
Figura 30. Ativação da via do NF- $\kappa$ B e IRFs por MO-THP1 infectados com <i>C. neoformans</i> e influência da melanina e da LAC1 no processo.	70
Figura 31. Cinética de morte de macrófagos por <i>C. neoformans</i> H99 selvagem e $\Delta$ LAC1 por 24 horas.	71
Figura 32. Estratégia de gates para citometria de fluxo adotado para definir células mortas e viáveis, assim como células que sofreram apoptose e morte lítica pela infecção pelo <i>C. neoformans</i> H99 que produziam ou não melanina e LAC1.	74
Figura 33. Proporção de macrófagos mortos e dos que sofreram apoptose ou morte lítica após infecção com <i>C. neoformans</i> .	75
Figura 34. Abundância de NLRP3, AIM2 e ASC em MO-THP1 desencadeada pela infecção com <i>C. neoformans</i> e o efeito da melanina e LAC1.	77
Figura 35. Abundância de CASP1, CASP3 e CASP8 em MO-THP1 desencadeada pela infecção com <i>C. neoformans</i> e o efeito da melanina e LAC1.	78
Figura 36. Abundância relativa de CASP1p45 e CASP1 p10/20 em MO-THP1 infectados com leveduras de <i>C. neoformans</i> e a influência da melanina de LAC1.	79
Figura 37. Abundância relativa de CASP8 p55, CASP8 p43/41 e CASP8 p18 em MO-THP1 infectados com leveduras de <i>C. neoformans</i> e a influência da melanina de de LAC1.	80
Figura 38. Abundância relativa de CASP3 p30 e CASP1 p17/19 em MO-THP1 infectados com leveduras de <i>C. neoformans</i> e a influência da melanina de de LAC1.	82
Figura 39. Abundância de GSDMD p53, N e C terminal e IL-1B p31 e IL-1B p17 em MO-THP1 infectados com leveduras de <i>C. neoformans</i> e a influência da melanina de de LAC1.	83
Figura 40. Abundância relativa de GSDMD p53, N e C terminal em MO-THP1 infectados com leveduras de <i>C. neoformans</i> e a influência da melanina de LAC1.	84
Figura 41. Abundância relativa de IL1-B p30 e IL-1B p17I em MO-THP1 infectados com leveduras de <i>C. neoformans</i> e a influência da melanina de de LAC1.	86



<b>Figura 42. Proporção de MO-THP1 que fagocitaram ou não leveduras de <i>C. neoformans</i> sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.</b>	<b>89</b>
<b>Figura 43. CFU de leveduras de <i>C. neoformans</i> fagocitadas por MO-THP1 após 2 horas de infecção sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.</b>	<b>90</b>
<b>Figura 44. CFU de leveduras de <i>C. neoformans</i> fagocitadas por MO-THP1 após 5 horas de infecção sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.</b>	<b>91</b>
<b>Figura 45. CFU de leveduras de <i>C. neoformans</i> fagocitadas por MO-THP1 após 24 horas de infecção sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.</b>	<b>92</b>
<b>Figura 46. Cinética de morte de macrófagos infectados com <i>C. neoformans</i> com inibição de proteínas do inflamassoma.</b>	<b>94</b>
<b>Figura 47. Morte celular de MO-THP1 ocasionada por <i>C. neoformans</i> por 2, 5 e 24 h.p.i. sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.</b>	<b>95</b>
<b>Figura 48. Apoptose e morte lítica de MO-THP1 ocasionada por <i>C. neoformans</i> por 2, 5 e 24 h.p.i. sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.</b>	<b>97</b>
<b>Figura 49. Papel da infecção de <i>C. neoformans</i> na fagocitose, inflamação e morte de macrófagos humanos e interferência da melanina e LAC1 das leveduras nesses mecanismos.</b>	<b>106</b>
<b>Figura 50. Interferência de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 na infecção de <i>C. neoformans</i> na fagocitose, inflamação e morte de macrófagos humanos e interferência da melanina e LAC1 das leveduras nesses mecanismos.</b>	<b>107</b>

## Lista de abreviações

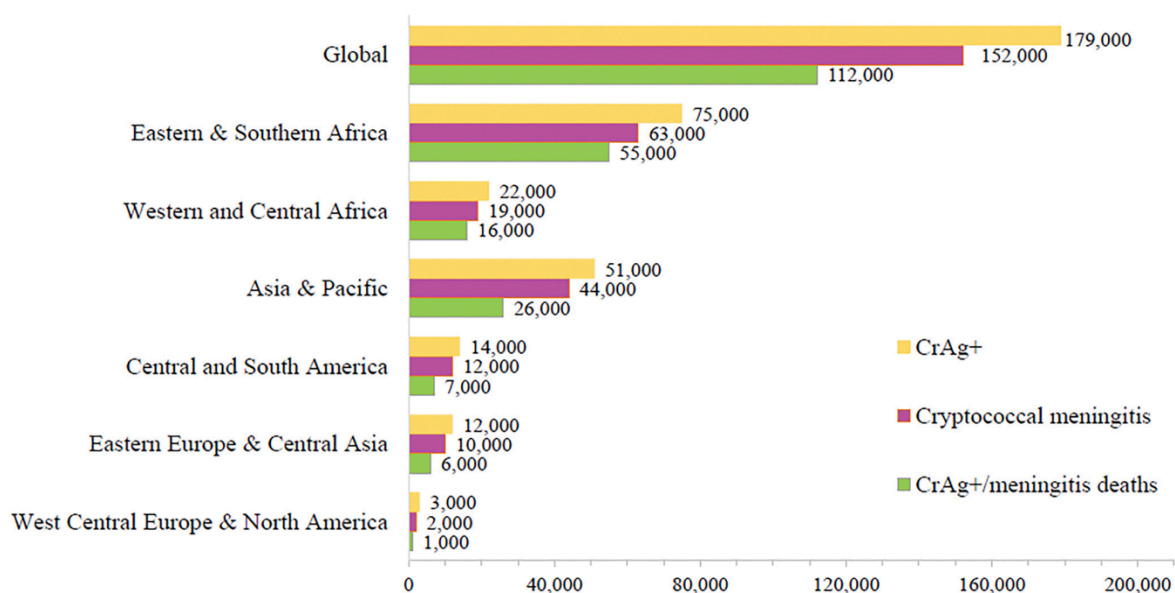
- $\Delta$ LAC1 – mutante deficiente em LAC1
- 7-AAD - 7-Aminoactinomycin D
- ACTB –  $\beta$ -Actina
- AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, síndrome da imunodeficiência adquirida
- AIM2 – *Absent In Melanoma 2*
- APCs – *Antigen Presenting Cells, Células Apresentadoras de Antígenos*
- ASC - Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A CARD
- CASP1 – Caspase 1
- CASP8 – Caspase 8
- CD14 – *Cluster of Differentiation 14*
- CD18 - *Cluster of Differentiation 18*
- CFU – *Colony Forming Unit*, Unidade Formadora de Colônia
- DAMPs - *Damage Associated Molecular Patterns*, Padrões Moleculares Associados à Danos
- GalXM – Galactoxilomana
- GSDMD – gasdermina D
- GXM - Glicoroxilomanana
- HIV – *Human Immunodeficiency Virus*, Vírus da Imunodeficiência Humana
- H.p.i - horas pós infecção
- IFN- $\gamma$  – Interferon gama
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-12 – Interleucina 12
- IL-1 $\beta$  - interleucina 1 beta
- IL-4 – Interleucina 4
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-8 – Interleucina 8
- LAC1 – Lacase 1
- L-DOPA - l-3,4 dihidroxifenilalanina
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MOI – *Multiplicity Of Infection*, multiplicidade de infecção
- MO-THP1 – macrófagos derivados de THP-1
- NF- $\kappa$ B – *Factor Nuclear Kappa B*
- NLRP3 – *NOD-like Receptor Protein 3*
- PAMPs - *Pathogen Associated Molecular Patterns*, Padrões Moleculares Associados à Patógenos
- PE – Ficoeritrina
- PI – *propidium iodide*, iodeto de propídio
- PSH – Pool de soro humano
- Th1 – *T helper 1*
- Th17 - *T helper 17*
- Th2 - *T helper 2*
- TLR2 - *Toll Like Receptor 2*, Receptor do Tipo Toll 2
- TLR4 - *Toll Like Receptor 4*, Receptor do Tipo Toll 4
- TLR9 – *Toll Like Receptor 9*, Receptor do Tipo Toll 9
- TNF- $\alpha$  – *Tumor Necrosis Factor alfa*, Fator de Necrose Tumoral Alfa
- WT – *Wild type*, selvagem

# 1. Introdução

## 1.1. Criptococose

A criptococose é uma doença infecciosa causada por fungos basidiomicetos do gênero *Cryptococcus*, sendo que a infecção por *Cryptococcus neoformans* é a mais comum e disseminada globalmente (MAZIARZ & PERFECT, 2016). Era considerada uma doença rara até 1970, devido ao fato de não desenvolver sintomatologia em pessoas imunocompetentes. Porém, com o advento da imunodeficiência adquirida (AIDS, da sigla em inglês para *Acquired immunodeficiency syndrome*) e seu auge na década de 80 com sua característica clínica de causar imunossupressão, fez com que esses pacientes se tornassem um dos grupos mais vulneráveis à infecção pelo *C. neoformans* e que o número de casos subiu vertiginosamente (HAJJEH, BRANDT & PINNER, 1995; MOLEZ, 1998, LUI *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2008; CARNIATO *et al.*, 2009; EL OUAZZANI *et al.*, 2009; HEITMAN *et al.*, 2011, MAZIARZ & PERFECT., 2016). Estima-se que surjam 152 mil novos casos de criptococose anualmente, em que 73% dos casos acarretam o óbito em indivíduos vivendo com HIV/AIDS. (RAJASINGHAM *et al.*, 2022). A criptococose é considerada a segunda maior causa de morte nesse grupo, atrás apenas da tuberculose (RAJASINGHAM *et al.*, 2017), sendo responsável por 19% das mortes nesse grupo de pessoas (RAJASINGHAM *et al.*, 2022). A **Figura 1** mostra número de pessoas que apresentaram antígeno criptocócico, incidência e número de óbitos anuais devido à criptococose.

Além da imunossupressão causada por HIV, outros pacientes imunossuprimidos também são grupo de risco para a criptococose, como indivíduos com tumores em tratamento com quimio/radioterapia e pessoas que receberam transplante de órgãos e precisam obrigatoriamente fazer uso de imunossupressores. Com a incidência cada vez maior de tumores sob tratamento e com transplante de órgãos se tornando um procedimento clínico comum, aumenta cada vez mais a porcentagem da população vulnerável a essa doença oportunista (PERFECT E CASADEVALL, 2002).



**Figura 1. Estimativas globais e regionais da incidência de antigenemia criptocócica, meningite criptocócica e mortes relacionadas à criptococose.** (RAJASINGHAM *et al.*, 2022).

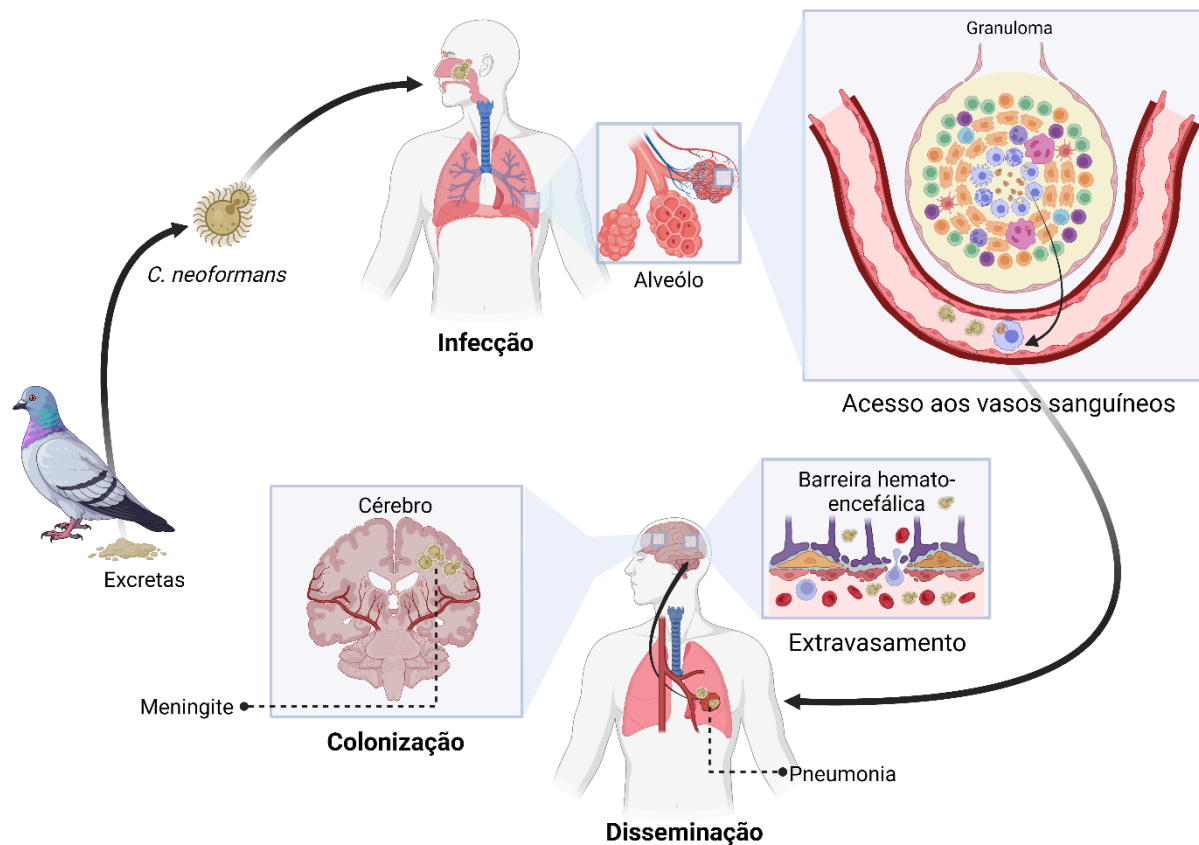
Apesar da enfermidade ter sido descrita há mais de um século, em 1894 (BUSSE, 1894), esta ainda continua sendo uma doença negligenciada, pois afeta em sua grande maioria pessoas vulneráveis social e economicamente e/ou que foram por muito tempo estigmatizadas. Mesmo não sendo considerada formalmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como negligenciada, apenas 0,5% de financiamento e pesquisa destina-se à área (RODRIGUES, 2016). O *C. neoformans* é encontrado por todo mundo e geralmente está associado à excretas de aves, como pombos (EMMONS, 1955; LITTMAN & SCHNEIERSON, 1959; KWON-CHUNG, BENNETT, 1984; CASTANÓN-OLIVARES & LÓPEZ-MARTÍNEZ, 1994; ROSARIO ET A., 2005; GHADERI, EIDI, & RAZMYAR 2019).

Estima-se que 80% de crianças são infectadas com *C. neoformans* em áreas urbanas, apesar de não apresentarem sintomas (DESHAW & PIROFSKI, 1995; ABADI & PIROFSKI, 1999; GOLDMAN *et al.*, 2001; COELHO, BOCCA & CASADEVALL, 2014), e que praticamente todos os adultos possam apresentar anticorpos séricos reativos para antígenos do *C. neoformans* (CHEN *et al.*, 1999), mostrando como é um patógeno disseminado, apesar da doença ser rara. Atualmente, cerca de 1 milhão de pessoas sofrem de meningite causada pelo *C. neoformans* e mais de 60% falecem em até 3 meses após o diagnóstico (SABIITI & MAY, 2012).

O indivíduo se infecta quando entra em contato com excretas de aves contaminadas pelo fungo e inalar seus esporos ou suas leveduras desidratadas, que se alojam no pulmão e alcançam os alvéolos (HATCH, 1961; POWELL *et al.*, 1972; NEILSON, FROMTLING, BULMER, 1977). Células fagocíticas nos próprios pulmões, como macrófagos alveolares (LEVITZ, 1994; MANSOUR & LEVITZ, 2002), são capazes de fagocitar esses fungos (VECCHIARELLI *et al.*, 1994), inibindo sua propagação inicial.

A fagocitose de *C. neoformans* também induz a produção de mediadores inflamatórios e o recrutamento de outras células fagocíticas e imunológicas para o sítio de infecção, que geralmente culminam na formação de uma barreira. As células do hospedeiro rodeiam os patógenos, condição que pode associar-se à necrose do tecido conjuntivo adjacente. Essa barreira é denominada de granuloma, onde os fungos ficam retidos e sua replicação é controlada, podendo o patógeno ficar latente por muito tempo nesse sistema ou nunca se manifestar novamente (PERFECT & CASADEVALL, 2002). Neste momento, alguns pacientes podem desenvolver sintomas parecidos com uma pneumonia, como tosse, encurtamento da respiração, dor no peito, febre e perda de peso (PERFECT & CASADEVALL, 2002; CDC, 2020) mas a grande maioria das pessoas permanece assintomática (GARCIA-HERMOSO, JANBON & DROME, 1999). A quebra da integridade da barreira do granuloma pode ser desencadeada durante quadros de imunossupressão e em pessoas imunossuprimidas. Nesse momento, leveduras ou fagócitos com estas internalizadas podem ter acesso a outras áreas do pulmão, podendo desencadear pneumonia, ou terem acesso aos vasos sanguíneos adjacentes, disseminando o fungo de forma sistêmica.

Geralmente os fungos de *C. neoformans* possuem tropismo pelo sistema nervoso central, principalmente pelo cérebro (CDC, 2022), alcançando este órgão por meio da penetração da barreira hematoencefálica, tanto pelas leveduras livres, como por elas internalizadas em fagócitos (WOO & MARTINEZ, 2021). Atingindo o cérebro, as leveduras conseguem colonizar o local e promovem um processo inflamatório, podendo ocasionar meningite (CASADEVALL & PERFECT, 1998; HEITMAN *et al.*, 2011). Isso pode gerar dores de cabeça, letargia, febre, dor no pescoço, náusea, coma e perda de memória (PERFECT & CASADEVALL, 2002; PERFECT, 2015; CDC, 2022). Dependendo da sua gravidade e tempo de diagnóstico, a inflamação pode ser bastante acentuada, acarretando no óbito do indivíduo infectado. A **Figura 2** ilustra o processo de transmissão e o estabelecimento da criptococose.



**Figura 2. Transmissão e patogênese da criptococose de *C. neoformans*.**

Representação esquemática de ciclo de transmissão, órgãos afetados, características clínicas e disseminação de *C. neoformans* em humanos no curso da infecção. *C. neoformans* é encontrado em excretas de aves em forma de leveduras desidratadas ou esporos, que podem ser inalados por outros organismos, como o ser humano. Esses esporos ou leveduras então se alojam no pulmão, onde inicia-se um processo de migração leucocitária para o sítio de infecção, gerando a formação de um granuloma. Geralmente o granuloma consegue reter o espalhamento do patógeno e conter a infecção, mas em organismo imunocomprometidos, essa “barreira” não é tão eficiente, permitindo o escape e disseminação de *C. neoformans* para outras partes do organismo hospedeiro, sendo o sistema nervoso central sendo um nicho onde o fungo consegue se estabelecer e colonizar a região. Isso acarreta no desenvolvimento de uma inflamação, gerando meningite, o que pode ocasionar dores de cabeça, letargia, febre, dor no pescoço, náusea, coma e perda de memória. Figura criada no BioRender.

## 1.2. Reconhecimento de patógenos, formação de inflamassomas e produção de mediadores inflamatórios

Ao longo da evolução, os organismos vivos desenvolveram diferentes receptores e métodos para reconhecer moléculas exógenas potencialmente prejudiciais, por possivelmente representarem algum tipo de toxina ou ser atrelado a algum agente invasor que pode lhe causar enfermidades. Essas moléculas comumente encontradas em patógenos possuem características bem preservadas e selecionaram ao longo do tempo esses receptores em seus hospedeiros, permitindo que possam ser reconhecidos, identificados e haja a indução de alguma resposta que possa amenizar seus danos no organismo invadido, e assim, permitir sua sobrevivência. Essas moléculas são

denominadas como padrões moleculares associados a patógeno (PAMP, da sigla em inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*) (JANEWAY, 1989). Alguns exemplos são lipopolissacarídeo (LPS), flagelina de bactérias, RNA de fita simples ou dupla (geralmente provenientes de vírus) e DNA exógeno não-metilado (oriundo de protozoários). Geralmente esse reconhecimento é denominado de primeiro sinal de ativação, mas comumente por si só não é capaz de tornar a célula responsiva (TAKEUCHI & AKIRA, 2010).

As invasões de células do hospedeiro por agentes exógenos podem desencadear estresse e danos, que são reconhecidos e conseguem gerar sinais de alerta ao organismo, para que este possa iniciar um contra-ataque e evitar mais danos. Esses sinais são comumente conhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs da sigla em inglês para *Damage Associated Molecular Patterns*). O DNA situado no compartimento citoplasmático e o desbalanço acentuado de íons, como K<sup>+</sup> são considerados DAMPs, por exemplo, pois estão localizados em locais ou em níveis atípicos, o que pode indicar um sinal de estresse celular (TAKEUCHI & AKIRA, 2010). Geralmente são denominados de indutores de segunda sinalização, pois ela é necessária para desencadear uma resposta na célula hospedeira e é uma forma de regulação para que células não se ativem contra micro-organismos inócuos, como a microbiota intestinal, por exemplo, ou à danos comuns gerados no organismo diariamente. Se uma molécula ou organismo começa a ser nocivo e causa dano tecidual, essa célula interpreta esses sinais como uma ameaça e se ativa, tornando-se responsiva a este estresse.

Ao reconhecer um agente invasor potencialmente danoso, umas das primeiras reações do hospedeiro é tentar induzir a sua morte pelo alvejamento com proteínas do sistema complemento ou realizar a fagocitose com o intuito de conter sua disseminação, controlar sua replicação, e assim evitar o desenvolvimento de uma doença. Caso o sistema complemento não consiga promover a eliminação do patógeno, ele pode ao menos permitir a sua opsonização e facilitar seu reconhecimento e fagocitose por células do organismo, visto que as células possuem receptores para essas proteínas. Ao ser fagocitado, o agente fica contido em um vacúolo denominado de fagossomo, onde há a fusão de vesículas contendo enzimas digestivas, como os lisossomos, formando o fagolisossomo, com o intuito de promover a degradação do agente exógeno (ROSALES & URIBE-QUEROL, 2017)

Além disso, a célula invadida ao reconhecer agentes invasores promove a ativação de vias inflamatórias, como a via do NF- $\kappa$ B e dos fatores regulados por interferons (IRF,

da sigla em inglês para *Interferon Regulated Factors*). A ativação dessas vias ocasiona a expressão de genes e produção de proteínas envolvidas em respostas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF, que irão regular a morte celular, modificar a permeabilidade do endotélio vascular, recrutar células para o sítio de infecção/inflamação e induzir a produção de proteínas de fase aguda (TAKEUCHI & AKIRA, 2010).

Quando o agente capturado é fagocitado por células apresentadoras de antígenos (APCs, da sigla em inglês *Antigen Presenting Cells*), como macrófagos ou células dendríticas, essas são capazes de processar os antígenos após a degradação do patógeno, e complexá-los em moléculas específicas que são transportadas para a membrana e ficam expostas na porção extracelular. Isso permite que o antígeno do patógeno fique exposto e possa ser reconhecido por outras células que possuam receptores compatíveis.

Assim, quando APCs migram para linfonodos, elas são capazes de apresentar esses antígenos para linfócitos T, que estão em estado latente, além de estimulá-los com outros receptores e produção de citocinas que os ativarão, tirando-os da latência. As APCs são capazes de produzir conjuntos de citocinas distintas dependendo do tipo de patógeno capturado, permitindo a diferenciação desses linfócitos, agora responsivos, em subtipos diferentes, ou seja, especializados em reconhecer e agir em células infectadas por diferentes invasores (KAIKO *et al.*, 2008)

Os linfócitos agora podem migrar até o sítio de infecção e promover respostas distintas, como ativar macrófagos infectados para que eles intensifiquem seu potencial microbicida, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (resposta Th1). Outra resposta desses macrófagos pode ser a deposição de matriz, angiogênese, reparo do tecido danificado e cicatrização, promovendo uma resposta de “resolução da inflamação” para reconstituir a homeostasia (resposta Th2). Os linfócitos podem induzir também o recrutamento de fagócitos ao local inflamado, como neutrófilos, e aumentar a indução de fagocitose para neutralizar os patógenos que ainda estão extracelulares, além de promover produção de peptídeos antimicrobianos (resposta Th17) (KAIKO *et al.*, 2008)

Apesar da resposta imunológica do hospedeiro, ao longo da evolução, os patógenos desenvolveram mecanismos para driblar esse reconhecimento ou fugir do fagolisossomo para o citoplasma a fim de conseguir sobreviver. Todavia, quando este consegue escapar para o citoplasma, há a presença de sensores no interior da célula hospedeira que são capazes de reconhecer tanto PAMPs quanto DAMPs em seu interior



e sinalizar para a célula que foi invadida. Uma resposta que pode ocorrer, caso o invasor não seja degradado na fagocitose, é promover a morte da própria célula hospedeira. Isso poderia acarretar tanto a destruição do nicho de replicação daquele agente, assim como permitiria que esse possa ser liberado novamente para o meio extracelular e para que possa ser destruído por componentes da imunidade humoral ou por um outro fagócito (CHEN NING & JIANG., 2017). O reconhecimento e desencadeamento de uma morte celular pode ser promovida por meio de diferentes formas, como reconhecimento de PAMPS e/ou DAMPS no interior das células e formação de inflamassomas, ou pela ligação de diferentes mediadores inflamatórios em receptores celulares. Todos esses eventos convergem por serem executados por diferentes caspases (CHEN NING & JIANG., 2017. MAN, KARKI & KANNEGANTI., 2017, ROMO, 2021)

Um inflamassoma é composto basicamente por uma proteína sensora (NLRP3, NLRP1, NLRC4, AIM2), que consegue reconhecer PAMPS ou DAMPs e que pode se associar com uma proteína adaptadora denominada ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD - caspase activation and recruitment domains*), que possui vários sítios de ligações para múltiplas caspases, podendo se associar com caspase 1 (CASP1) ou caspase 8 (CASP8), por exemplo. Essas caspases são proteínas naturalmente inativas, que ao se associarem ao inflamassoma são clivadas, acarretando sua ativação. A partir da ativação, as caspases se tornam aptas a clivarem seus substratos, incluindo a citocina inflamatória interleucina-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$  ou IL1B) e outras caspases efetoras que desencadeiam apoptose, como caspase 3 e 7, e proteínas efetoras de piroptose, como a Gasdermina D (GSDMD), ambas também presentes nas suas formas inativas, permitindo sua ativação e tornando-as aptas a realizarem suas funções biológicas (NAGATA 1997; SUSIN *et al.* 2000; DIX *et al.* 2008; MAHRUS *et al.* 2008; HE *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015, LOPEZ-CASTEJON E BROUGH, 2011)

Uma vez que a IL-1 $\beta$  é ativada, ela é secretada pela célula atacada e se liga a receptores em células vizinhas, propagando um sinal de invasão do organismo. Essa sinalização provoca ativação de linfócitos, produção de proteínas de fase aguda, permeabilização do endotélio, recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção e causa alguns efeitos sistêmicos no organismo como febre.

### **1.3. Morte celular de células hospedeiras**

A morte de uma célula é um processo fisiológico recorrente e normal dentro de organismos multicelulares e tem função importante em processos de desenvolvimento

embrionário, homeostasia e respostas imunológicas. Inúmeras células morrem todos os dias e são recicladas, sendo fagocitadas e seus componentes reutilizadas por essas células saudáveis. Geralmente essas células morrem através de uma morte programada e silenciosa, a fim de manter as condições normais do organismo sem causar um grande “alarde”, sinalizando que aquele processo biológico não é incomum. Mas em casos atípicos em que a homeostasia é drasticamente afetada, como em doenças crônicas, autoimunes e infecções por agentes exógenos, um número massivo de células pode morrer em um espaço curto de tempo, liberando quantidades anormais de moléculas que sinalizam dano (DAMPs), o que deixa as células das redondezas em estado de alerta. Isso recruta mais fagócitos para o local para “limpar a bagunça”, controlar a proliferação do agente invasor, caso este esteja presente, iniciar o reparo tecidual, a fim de restabelecer a homeostasia do organismo. Portanto, há diferentes tipos de morte que uma célula pode sofrer, umas mais discretas e silenciosas que não provocam tantas alterações no cotidiano de outras células, e outras que causam um alarde maior para sinalizar algum evento potencialmente perigoso para a integridade do hospedeiro. As principais mortes descobertas e amplamente estudadas recentemente são denominadas de apoptose, piroptose e necroptose (BERTHELOOT, LATZ, & FRANKLIN, 2021).

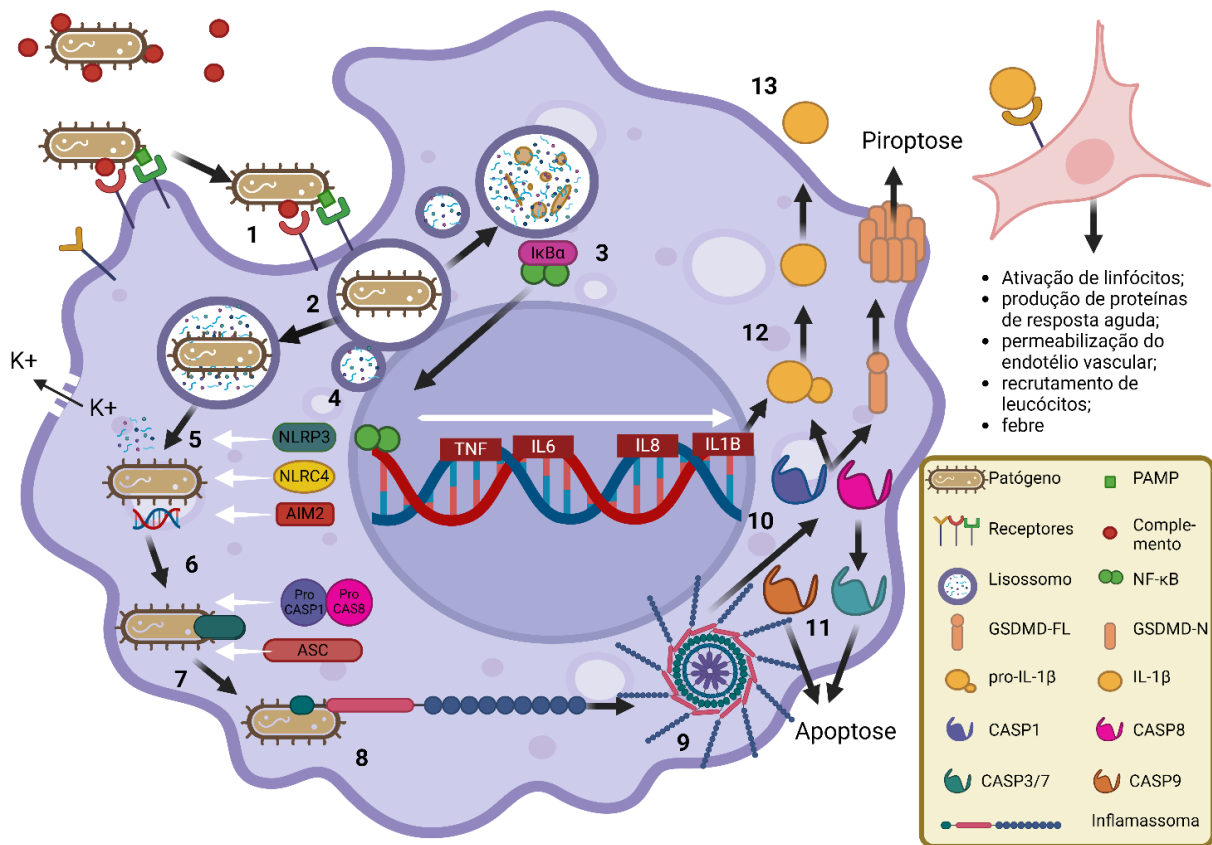
A formação canônica de inflamassomas, provoca a ativação de CASP1 e a consequente clivagem e ativação de seus respectivos substratos, como mencionado na seção anterior. Um dos substratos da CASP1 é a gasdermina D (GSDMD), que é produzida na sua forma inativa, porém, quando clivada pela CASP1, sua porção N-terminal de cerca de 31 kDa é ativa (SHI *et al.*, 2015). Esta é capaz de se ancorar à membrana plasmática celular e se oligomerizar nesta região, promovendo a formação de uma estrutura em forma de poro, que culmina no extravasamento de material citoplasmático, na liberação massiva de mediadores inflamatórios como a IL-1 $\beta$  e a morte da célula alvo denominada de piroptose (AGLIETTI *et al.*, 2016; SBORGI *et al.*, 2016, WANG *et al.*, 2020). Há outras caspases que também podem se associar ao inflamassoma de forma não canônica e clivar GSDMD, como a CASP11 em murinos e CASP4 e CASP5 em humanos, onde CASP11 e CASP4 podem atuar diretamente como receptores de PAMPs como o LPS (KAGAYASHI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015; AGLIETTI *et al.*, 2016).

Como consequência deste desfecho, há a destruição do nicho de replicação de patógenos intracelulares e a liberação de mediadores inflamatórios para o exterior para sinalizar às outras células um potencial perigo. Esse tipo de morte é denominado como

piroptose, visto que está associada à inflamação (BERGSBAKEN, FINK, & COOKSON, 2009; HE *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015, LOPEZ-CASTEJON E BROUGH, 2011).

Outro tipo de morte que pode ocorrer numa célula, é denominado de apoptose, a qual pode ocorrer por duas vias distintas: a intrínseca e extrínseca. A via intrínseca pode ser engatilhada por sinais de estresse ocorridos no interior das células, como dano no DNA causado por agente físicos, químicos ou biológicos. Esses danos acarretam na permeabilização da membrana externa da mitocôndria e a liberação do citocromo C para o citoplasma, através da formação de poros na membrana mitocondrial por proteína da família BCL-2, como BAX e BAK, quando oligomerizados. A liberação do citocromo C no interior do citoplasma causa o recrutamento de Apaf-1 e da procaspase 9, fazendo com que estes se oligomerizem formando uma plataforma proteica denominada de apoptossomo, onde há a auto-clivagem de CASP9 na sua forma ativa. Esta agora é capaz de clivar outras caspases, como a CASP3 e CASP7, que por sua vez ativam as caspases 2, 8 e 10, que desencadeiam na morte apoptótica. Esse tipo de morte é caracterizado por fragmentação do DNA, perda de receptores de membrana, desestabilização da bicamada lipídica da membrana plasmática com exposição de lipídeos para o exterior da célula (como as fosfatidilserina) e formação de vesículas.

Na via extrínseca ocorre o mesmo desfecho final observado na via intrínseca, porém, esta é inicializadas por outros estímulos, como a ligação de agonistas a receptores de morte como proteínas da família dos fatores de necrose tumoral (TNF) (YERETSSIAN *et al.*, 2011), pelo estímulo do receptor Fas com seu agonista Fas ligante (Fas-L) (HUANG *et al.*, 1999 e WARING & MULLBACKER, 1999), ou ligação de PAMps aos seus respectivos receptores. Esse reconhecimento culmina no recrutamento de caspase 8 (CASP8), que sofre clivagem e sua consequente ativação, podendo agora ativar as CASP3 e CASP7, acarretando na ativação de toda cascata de apoptose vista anteriormente. Todos os mecanismos de mortes descritos aqui são ilustrados na



- Ativação de linfócitos;
- produção de proteínas de resposta aguda;
- permeabilização do endotélio vascular;
- recrutamento de leucócitos;
- febre

**Figura 3. Reconhecimento, fagocitose e mecanismos efetores ativados por patógenos reconhecidos intracelularmente.**

Patógenos possuem moléculas conservadas que podem ser reconhecidas por receptores reconhecedores de padrões presentes na superfície de células hospedeiras (PRRs, da sigla em inglês para *Pattern Recognition Receptors*) e desencadeiam um processo de fagocitose (1), onde o patógeno é internalizado e retido intracelularmente, formando o fagossomo (2). Com isso, há ativação de vias no interior da célula, como a via do NF-κB (3), que causam o deslocamento de fatores de transcrição para o núcleo e consequente transcrição e tradução de mediadores pró-inflamatórios, como TNF-α, IL-6, IL-8 e IL-1β, a fim de sinalizar às células da vizinhança sobre uma possível invasão e ameaça do hospedeiro. Porém, alguns desses mediadores inflamatórios são produzidos na sua forma inativa, sendo necessário a ativação de outras vias adicionais intracelulares para causar sua ativação e ter seu efeito biológico. A formação do fagossomo desencadeia a fusão de vesículas contendo lisossomos (4), liberando enzimas hidrolíticas em seu interior e formando o fagolisossomo (5), com a finalidade de causar a degradação do agente invasor. O patógeno, portanto, pode ser degradado e sua colonização contida, ou este pode possuir fatores de virulência que neutralizam a ação das enzimas hidrolíticas, permitindo seu escape desse compartimento para o citoplasma (6). Lá, tanto alguns componentes do agente invasor, como componentes de estresse celular do próprio hospedeiro ocasionado pela invasão de agentes exógenos podem ser “sentidos” pela própria célula, através de proteínas sensoras, que podem reconhecer desbalanço de íons como de potássio, DNA no citoplasma e componentes conservados de bactérias e fungos (7). Algumas dessas proteínas sensores são NLRP3, AIM2 e NLRC4, que são recrutadas para o sítio de infecção e ocasionam o recrutamento de outras proteínas, como a proteína adaptadora ASC, que se associa a proteína sensora e possui domínios recrutadores de caspases, onde estas conseguem ser recrutadas para o local e se associam a ASC-proteína sensora (8), formando um complexo proteico que se associa com outro complexo, formando uma plataforma proteica denominada de inflamassoma (9). Essa plataforma ocasiona a clivagem e ativação de caspases (10), que agora conseguem agir sob seus substratos. No caso de CASP1 ativa, clivam proteínas como IL-1β e GSDMD-FL, clivando-as e ativando-as (11). A porção amino-terminal de GSDMD (GSDMD-N) é capaz de se oligomerizar com outras e formar uma estrutura de poro a membrana plasmática, causando extravasamento de material citoplasmático e causando morte da célula conhecida como piroptose. Caso seja ativada CASP8, esta cliva outras caspases que promovem a apoptose da célula. IL-1β clivada pode ser secretada para a porção extracelular, onde consegue se ligar em células vizinhas e sinalizar para essas uma provável ameaça ao organismo. Além disso, pode provocar efeitos moleculares e celulares, como induzir produção de proteínas de resposta da fase aguda pelo fígado e ativar linfócitos, assim como efeitos sistêmicos, como promover febre no organismo. Figura criada no Biorender.

Alguns patógenos podem se beneficiar de uma morte em detrimento de outra, dependendo de vários fatores, como condição do hospedeiro, se é um patógeno intra ou extracelular, patogênese da infecção, tipo de cepa, etc. Assim como as células também podem controlar uma infecção por um tipo de morte, mas serem prejudicadas por outra.

#### **1.4. Resposta imunológica contra *C. neoformans* e seus mecanismos de evasão**

Células do hospedeiro, como fagócitos, também conseguem reconhecer moléculas específicas de *C. neoformans* que mostram que ele é um agente exógeno e possivelmente prejudicial ao organismo. Alguns receptores, como CD14, TLR2 (YAUCH *et al.*, 2004; BIONDO *et al.*, 2005), TLR4 (SHOHAM *et al.*, 2001), TLR9 (NAKAMURA *et al.*, 2008), CD18 (DONG & MURPHY., 1997) e receptores de manose (SYME *et al.*, 2002; DAN *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2018) são capazes de reconhecer moléculas presentes no fungo. A importância desses receptores dentro dessa infecção é ressaltada pelo fato de que seu estímulo prévio proporcionou aumento da fagocitose e da ativação de células por *C. neoformans* (REDLICH *et al.*, 2013). Da mesma forma, proteínas do sistema complemento também auxiliam na opsonização e reconhecimento das leveduras por receptores, devido a deposição de C3 (LEVITZ & TABUNI, 1991; MONARI *et al.*, 1997; VECHIARELLI *et al.*, 1998 ZARAGOVA, TABORDA & CASADEVALL, 2003), lectina ligadora de manose (VAN ASBECK *et al.*, 2008) e anticorpos (KOZEL & MCGAW, 1979; GRIFFIN, 1981). Essa interação é mediada principalmente pelos receptores de complemento CR1, CR3 e CR4 (LEVITZ & TABUNI, 1991; ZARAGOVA, TABORDA & CASADEVALL, 2003) e receptores Fc $\gamma$  (KOZEL & MCGAW, 1979; GRIFFIN, 1981).

Sem a presença de um agente opsonizante, como proteínas do sistema complemento, a ancoragem e a internalização deste fungo é drasticamente reduzida, mas não abolida (BOLAÑOS & MITCHELL, 1989a; BOLAÑOS & MITCHELL, 1989b; LEVITZ & TABUNI, 1991, GUERRA *et al.*, 2014). A importância do sistema complemento na infecção por *C. neoformans* é ressaltada pelo fato de que a falta da opsonização em experimentos *in vivo* ocasiona suscetibilidade ao patógeno (RHODES, WICHER & URBA, 1980), além de já ter sido encontrado danos nos receptores de complemento do tipo 3 de monócitos de pacientes com HIV/AIDS, sugerindo que pode ser um fator que dificulta a fagocitose das leveduras e torna essa população vulnerável à infecção (MONARI *et al.*, 1997). Ademais, pacientes que sofreram de sepse devido ao *C. neoformans* apresentaram depleção do sistema complemento (MACHER *et al.*, 1978).

Esse reconhecimento via opsonização acaba desencadeando fagocitose das leveduras em células fagocíticas como macrófagos, monocitos, células dendríticas e neutrófilos (MONARI *et al.*, 1997, VECCHIARELLI *et al.*, 1998, SYME *et al.*, 2002; ROHATGI & PIROFSKI., 2016), que parece ser dependente de polimerização de actina (GUERRA *et al.*, 2014). O reconhecimento e fagocitose das leveduras promovem a ativação de fatores de transcrição e seu translocamento para o núcleo, como NF- $\kappa$ B via MyD88, que promovem a produção de mediadores inflamatórios (YAUCH *et al.*, 2004; BIONDO *et al.*, 2005), a fim de promover sua degradação e sinalizar para células vizinhas sobre uma invasão do organismo.

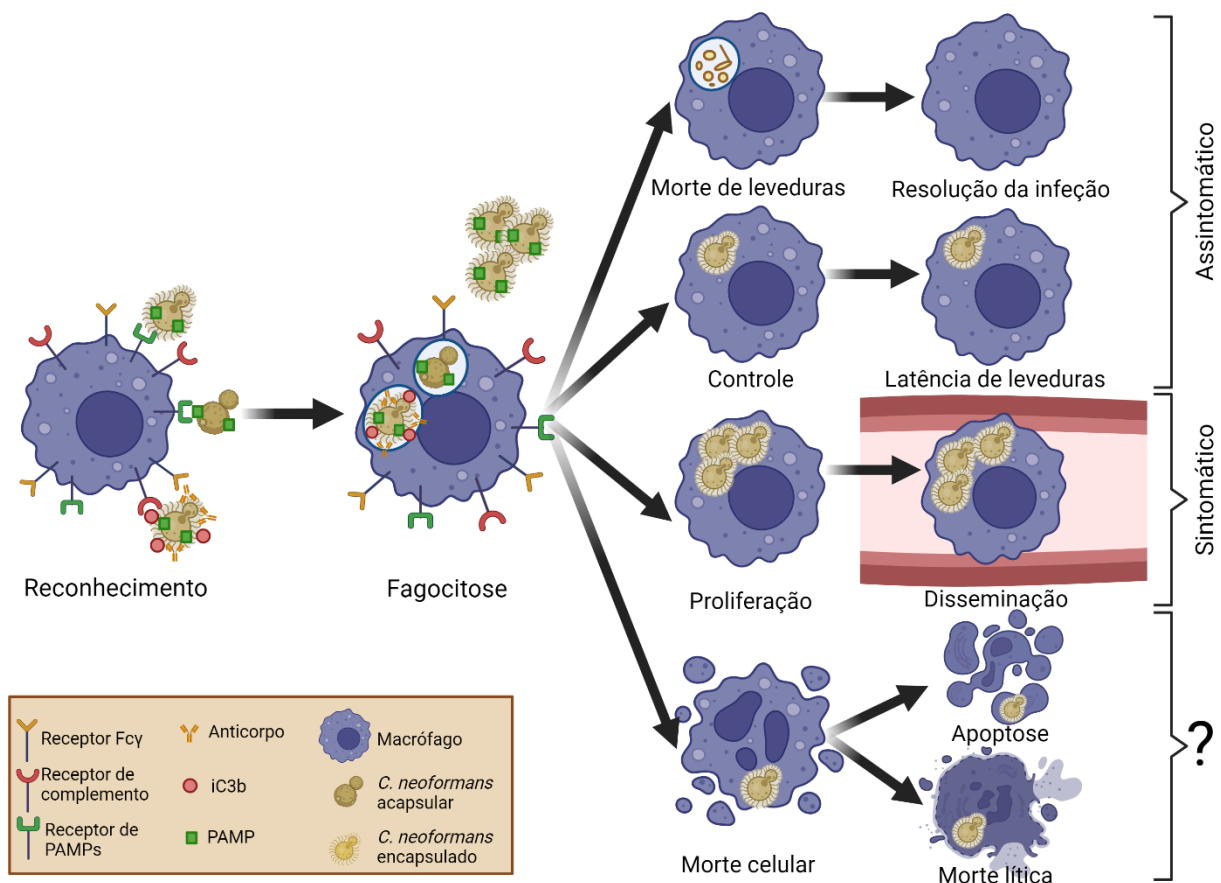
Todavia, em modelos animais foi notado que apesar de haver a internalização das leveduras pelos macrófagos, não houve uma destruição completa dessas (LEVITZ, FARELL & MAZIARZ, 1991; VECCHIARELLI *et al.*, 1994; TUCKER & CASADEVALL, 2002), mostrando que o fungo pode ter desenvolvido mecanismos para driblar o sistema imunológico e se manter infectando o hospedeiro. Isso pode ocorrer devido ao *C. neoformans* produzir fatores de virulência, como urease e cápsula, que ocasiona um aumento de pH do fagolisossomo, assim como fosfolipase B1 que auxilia na ruptura do fagolisossomo (HARRISON, CHEN & LEVITZ, 2002; TUCKER & CASADEVALL, 2002, DE LEON-RODRIGUEZ *et al.*, 2018a; DE LEON-RODRIGUEZ *et al.*, 2018b; FU *et al.*, 2018; SANTIAGO-BURGOS, STUCKEY, & SANTIAGO-TIRADO, 2022). Já foi visto também que *C. neoformans* é capaz de inibir a fusão de lisossomos ao fagossomo (VECCHIARELLI *et al.*, 1994)

Macrófagos e células dendríticas também atuam como células apresentadoras de antígenos, apresentando antígenos de *C. neoformans* a linfócitos T e produzindo citocinas que auxiliam na sua proliferação (VECCHIARELLI *et al.*, 1994; NELSON, HAWKINS, & WOZNIAK, 2020) e na sua diferenciação, a fim de que possa promover um tipo específico de resposta imunológica contra o agente etiológico. Já foi visto que quando é produzido citocinas de respostas Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e Th17 (IL-17), há uma diminuição da carga parasitária, já a presença de citocinas da resposta Th2 (IL-4 e IL-13) aumentam a proliferação intracelular de *C. neoformans* (HUFFNAGLE, 1996; KAWAKAMI *et al.*, 1999 UICKER *et al.*, 2005; VOELZ, LAMMMAS & MAY, 2009; DAVIS *et al.*, 2013; COELHO, BOCCA & CASADEVALL, 2015; LI *et al.*, 2022).

Antagonicamente, foi visto também que fagócitos, como macrófagos, podem auxiliar na infecção pelo *C. neoformans*, pois a depleção desse tipo celular permite maior sobrevivência de camundongos, apesar dessa depleção em ratos os tornarem mais

susceptíveis à infecção (KECHICHIAN *et al.*, 2007; SHAO *et al.*, 2005). Além disso, já foi visto que monócitos podem auxiliar na disseminação de *C. neoformans* que foram internalizadas para o cérebro (CHARLIER., *et al.*, 2009), mostrando que células do próprio hospedeiro podem atuar como “cavalos de Tróia” no curso da doença. Isso salienta a importância crucial de células imunológicas na infecção pelo patógeno e seu papel dúbio entre controlar ou auxiliar a colonização pelo agente etiológico. A **Figura 4** ilustra a resposta imunológica contra *C. neoformans*, mecanismos de escape da imunidade do fungo e desfechos clínicos.

A evasão do *C. neoformans* do sistema imunológico e o estabelecimento de uma infecção de sucesso se deve a características intrínsecas deste fungo que conferem virulência e o torna patogênico para humanos. As principais delas e mais estudadas são a presença de uma cápsula polissacarídica que o envolve, sua resistência à temperatura corporal de mamíferos e a capacidade de produzir melanina (McClelland, Bernhardt, & Casadevall, 2006).



**Figura 4. Resposta imunológica contra *C. neoformans*, mecanismos de evasão da imunidade do fungo e desfechos clínicos.**

Leveduras de *C. neoformans* possuem moléculas conservadas (PAMPs) que podem ser reconhecidas por receptores da superfície de células hospedeiras. Porém, a presença de cápsula em algumas cepas pode mascarar esses PAMPs e impedir seu reconhecimento por seus respectivos receptores. O alvejamento da cápsula de *C. neoformans* por proteínas do sistema complemento e por anticorpos, seria uma forma de driblar esse mecanismo de evasão do patógeno, visto que células do hospedeiro possuem receptores para

esses dois componentes, permitindo assim o reconhecimento e a fagocitose do fungo. Uma vez fagocitado, pode ocorrer alguns desfechos dependendo de uma série de fatores, como a cepa de *C. neoformans*, o estado imunológico do hospedeiro etc., portanto, pode ocorrer a destruição do fungo ou a sua contenção no interior de macrófagos e outros fagócitos, levando a um controle da infecção, o que gera um quadro clínico sem presença de sintomas aparentes nos pacientes. Porém, pode ocorrer a replicação do fungo não conseguir ser contida e este se prolifera dentro dos fagócitos. Além disso, o granuloma nesses casos pode não ser bem formado, permitindo o extravasamento tanto de leveduras quanto de células com leveduras internalizadas para vasos sanguíneos e sua consequente disseminação para outras partes do organismo, onde podem se estabelecer e causar sintomas típicos da doença. Outro desfecho após a fagocitose de *C. neoformans*, recentemente descoberto, é a ocorrência da morte celular, que pode ser uma morte apoptótica ou lítica. Entretanto, ainda não é sabido quais as consequências clínicas para os pacientes acometidos pela criptococose resultante dessa morte. Figura produzida no BioRender.

Já é sabido que a cápsula de *C. neoformans* tem a função proteger o fungo da dissecação e de altas temperaturas do ambiente externo (AKSENOV, BABYEVA, & GOLUBEV, 1973) e que esse fenótipo proporcionou grandes vantagens para evadir do reconhecimento da fagocitose de organismos parasitados e de reduzir fatores inflamatórios (KOZEL & GOTSCHLICH, 1982, SMALL & MITCHELL, 1989, KOZEL, HIGHISON & STRATON, 1984; ZHONG & PIROFSKI, 1998, VECCHIARELLI *et al.*, 2003, IBRAHIM *et al.*, 1995, MONARI *et al.*, 2009), permitindo que o fungo seja um patógeno intracelular facultativo. Portanto, cepas sem cápsulas podem ser menos virulentas (BULMER, SANS & GUNN, 1967; FROMTLING, SHADOMY E JACOBSON., 1982, CHANG, & KWON-CHUNG, 1994; CHANG, PENOYER & KWON-CHUNG, 1996).

Análogo à cápsula, cepas que não conseguiam produzir melanina mostraram virulência atenuada em hospedeiros, como exemplo, camundongos infectados com cepas produtoras de melanina tiveram menor sobrevivência e maior colonização em órgãos afetados, como o cérebro (POLACHECK, HEARING & KWON-CHUNG 1982 KWON-CHUNG, POLACHECK E POPKIN, 1982; RHODES, POLACHECK, & KWON-CHUNG, 1982 E KWON-CHUNG E RODES, 1986 E SALAS *et al.*, 1996).

A produção de melanina de *C. neoformans* já foi caracterizada tanto *in vitro* como em infecções *in vivo* em animais e humanos (NOSANCHUCK *et al.*, 1999; NOSANCHUCK *et al.*, 2000 e ROSAS *et al.*, 2000). A melanização se mostrou um importante fator de virulência, causando resistência a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, temperatura e à fagocitose por macrófagos (POLACHECK, PLATT, E& Aronovitch. 1990; JACOBSON & EMERY, 1991; JACOBSON E TYNNELL, 1993; WANG, AISEN & CASADEVALL, 1995 e ROSAS & CASADEVALL, 1997).

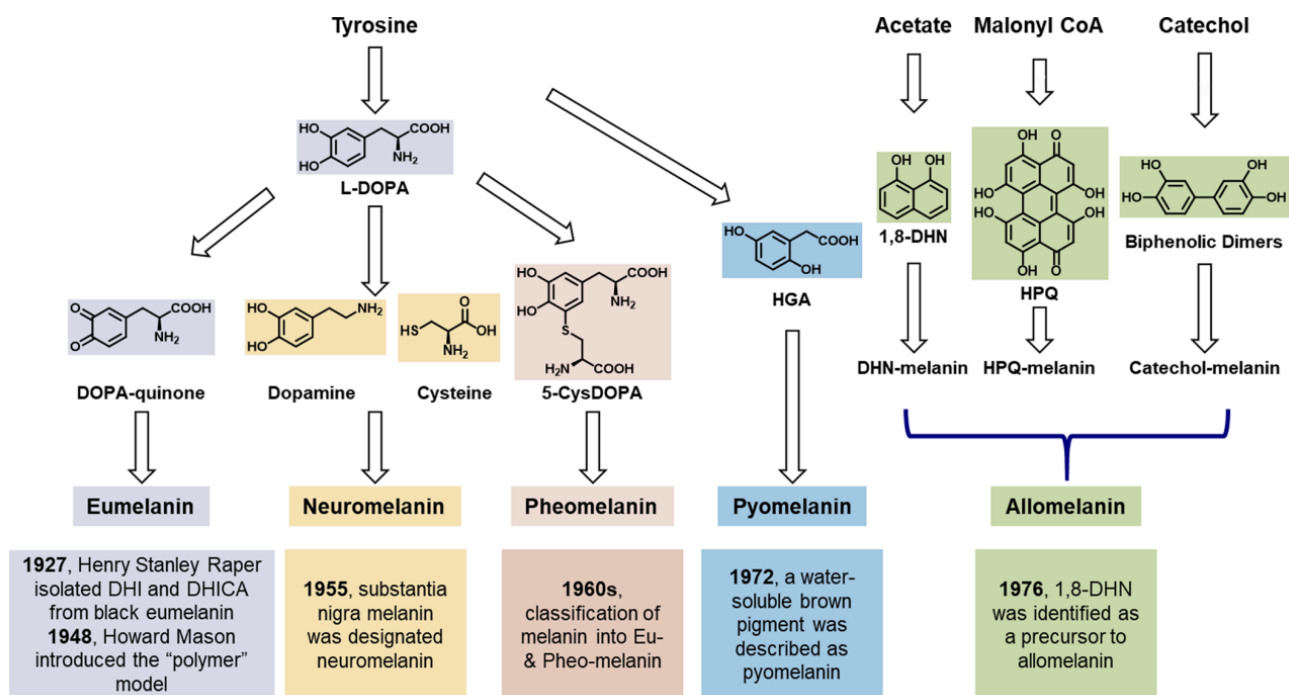
#### **1.4. Melanina e lacase 1 de *C. neoformans*.**



Apesar da palavra melanina derivar do grego "melanos", que significa "preto", há diversos tipos de melanina com colorações distintas, podendo abranger do marrom ao preto, assim como do amarelo ao vermelho (CAO *et al.*, 2021; CORDERO E CASADEVALL, 2020). Sua coloração escura se deve à capacidade de absorver toda luz visível e refletir praticamente nenhuma. Essa pigmentação abrange diferentes tipos de funções em organismos vivos, como camuflagem, comunicação visual, obtenção de energia e/ou proteção durante o processo, coleta de calor, defesa contra radiação ionizante, mudanças de temperatura e estresse osmótico (CORDERO E CASADEVALL, 2020).

A melanina se apresenta como um polímero amorfo de alto peso molecular formada pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos e sua polimerização para fenóis intermediários e suas quinonas (SOLANO, 2014; WHITE, 1958; CASADEVALL., ROSAS, & NOSANCHUK, 2000). Apesar da sua estrutura secundária ainda não ter sido elucidada, é sabido que sua estrutura forma folhas planares de modo hierárquico para formar uma molécula coloidal (CASADEVALL *et al.*, 2012). Ela pode ser classificada segundo suas propriedades físico-químicas, como resistente a ácidos fortes, porém é degradada em condições alcalinas ou em contato com compostos oxidativos como permanganato ou peróxido de hidrogênio, é insolúvel na maioria dos solventes, além disso, possui uma população de radicais livres estáveis (CASADEVALL, ROSAS, & NOSANCHUK, 2000).

Hoje são conhecidos cinco tipos de melanina que são classificadas dependendo do tipo de precursor utilizado: eumelanina, feomelanina, neuromelanina, alomelanina e piomelanina. A eumelanina, neuromelanina e feomelanina são comumente encontradas em animais e são produzidas a partir de produtos derivados da L-DOPA que foi sintetizado a partir da tirosina, sendo DOPA-quinona, dopamina e cisteína, 5-CysDOPA seus respectivos precursores para produção desses tipos de melanina. Já a piomelanina e alomelanina estão mais presentes em plantas e micro-organismos e são caracterizados pela ausência de nitrogênio. A piomelanina é produzida a partir de ácido homogênico (HGA), um produto da tirosina diferente da L-DOPA, desprovida de grupo amina. Já as alomelanina são polimerizadas de compostos orgânicos como o acetato, malonil CoA e catecol, formando respectivamente 1,8-dihidroxinaftaleno(1,8 DHN), 1,4,6,7,9,12-hexahidroxiperileno3,10-quinona (HPQ) e dímeros bifenólicos. A **Figura 5** sintetiza como os diferentes tipos de melaninas são produzidas.



**Figura 5. Vias biossintéticas simplificadas de cinco categorias diferentes de melanina: eumelanina, neuromelanina, feomelanina e os dois análogos livres de nitrogênio, piomelanina e alomelanina.**

Codificadas por cores roxa, amarela, rosa, azul e verde, respectivamente. Compilação de dados convergentes paracaminhos de uma ampla variedade de fontes literárias com uma linha do tempo histórica destacando as descobertas da melanina (CAO *et al.*, 2021).

Alguns fungos produzem melanina a partir de DHN endógeno, porém, outros produzem melanina derivada de L-DOPA, como é o caso de *C. neoformans*. Sua síntese é iniciada por fenoloxidasas. A produção de eumelanina se inicia com o processamento de L-tirosina em L-3,4- dihidroxifenilalanina (L-DOPA) pela tirosinase ou lacases e depois essa é convertida dopaquinona, que sofre diversas reações de redução e oxidação até formar 5,6-dihidroxiindole e 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico, monômeros que polimerizaram para formar eumelanina (EISENMAN & CASADEVALL., 2012). Já foi constatado que *C. neoformans* também é capaz de produzir melanina a partir de HGA, que geralmente é um precursor para produção de melanina em bactérias (FRASÉS *et al.*, 2007)

Em 1962 foi descrita pela primeira vez a produção de pigmentação escura em *C. neoformans* isolado de fezes de aves (STAIB, 1962). Foi observado que apenas essa espécie de fungo entre as estudadas se tornava marrom, o que a diferenciava das demais. Essa observação foi corroborada por outros autores anos depois (SHIELDS & AJELLO, 1966; NOSANCHUK *et al.*, 1999). Desde então, esse fenótipo foi explorado na clínica para diagnóstico de criptococose em pacientes (STAIB *et al.*, 1987). O componente responsável pela aquisição da coloração marrom em *C. neoformans* era a semente negra,

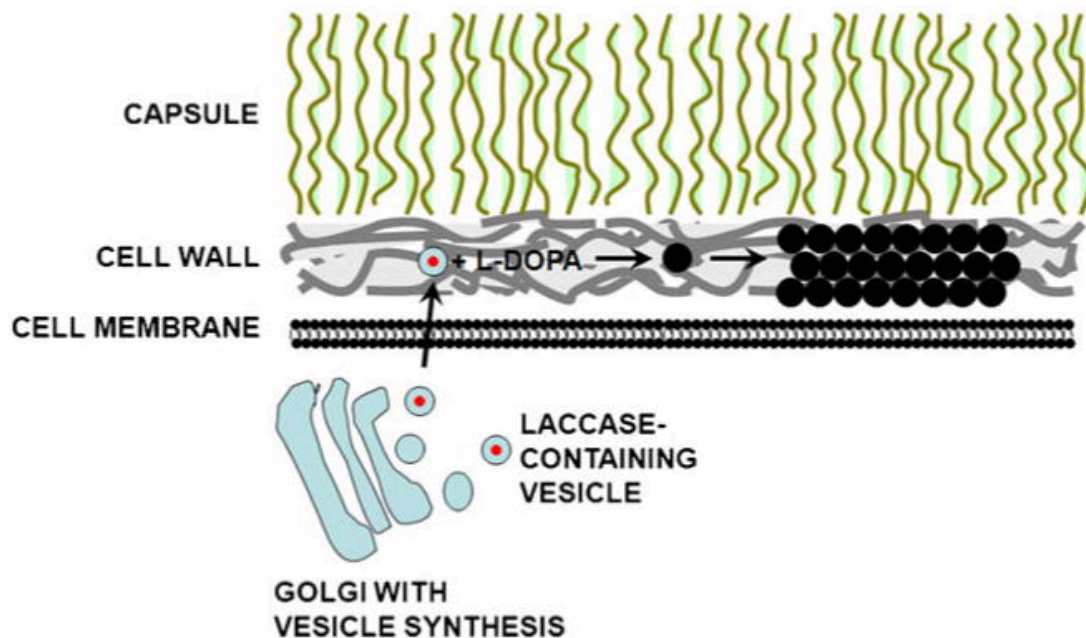
*Guizotia abyssinica* (SHIELDS & AJELLO, 1966), constituinte da dieta dessas aves, e conseqüentemente, de suas fezes. Foi observado que *C. neoformans* também adquiria pigmentação em meio composto por extrato de batata e cenoura (KAPICA E SHAW, 1969).

Alguns anos mais tarde foi identificado que o-difenóis eram os componentes químicos presentes nestes meios responsáveis pela coloração do fungo (KORTH E PULVERER, 1971 e SHAW E KAPICA, 1972) devido a presença do grupo hidroxil na posição 3 e 4 do anel fenil (STRACHAN, YU E BLANK, 1971). Portanto, o-difenóis podem ser utilizados como substratos para produção de pigmentação intracelular em diferentes cepas de *C. neoformans*. Ao passo que p-difenóis podem produzir pigmentos solúveis no meio e estão intrinsicamente relacionados com a fonte de nitrogênio disponível. Os aminoácidos glicina, glutamina e asparagina são as fontes de aminoácidos mais efetivas que permitem crescimento e aquisição de coloração pigmentada utilizando L-DOPA dentro de 3 a 6 dias em todas as cepas testadas (CHASKES E TYNDALL, 1975; NURUDEEN & AHEARN, 1979). O que pode induzir o processo de melanização em *C. neoformans* é o estresse nutricional e exposição à percussores de melanina (CORDERO, CAMACHO E CASADEVALL, 2020), visto que a presença de glicose é um fator que pode inibir a produção de melanina pelo patógeno (NURUDEEN & AHEARN, 1979; POLACHECK, HEARING & KWON-CHUNG, 1982).

Ao longo dos estudos com *C. neoformans*, foi percebido que eles possuíam fenoloxidasas que eram capazes de oxidar catecolaminas e produzir a pigmentação escura por meio deste processo (RHODES, POLACHECK & KWON-CHUNG, 1982; POLACHECK, HEARING E KWON-CHUNG 1982; KWON-CHUNG, & RHODES, 1986; POLACHECK & KWON-CHUNG, 1988). Estudos anteriores demonstraram que cepas que produziam a pigmentação escura, assim como atividade de fenoloxidase, na presença de catecolaminas possuíam propriedades antioxidantes e eram mais resistentes à espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (POLACHECK, PLATT, E Aronovitch. 1990; JACOBSON E EMERY, 1991; JACOBSON E TYNNELL, 1993).

Sabe-se atualmente que a produção de melanina pelo *C. neoformans* é devido à uma fenoloxidase, denominada de lacase 1 (LAC1), que é responsável por promover a oxidação de catecolaminas, como L-DOPA, em melanina (POLACHECK, HEARING E KWON-CHUNG 1982, SALAS *et al.*, 1996, WILLIAMSON, 1994; WILLIAMSON, WAKMATSU E ITO, 1998). Em cepas incapazes de produzir melanina, observou-se que havia uma redução drástica na atividade de fenoloxidase, assim como o estabelecimento

de uma cepa mutante para a LAC1 ( $\Delta$ LAC1), que é incapaz de produzir melanina, tornando-se uma importante ferramenta para o estudo o papel desse fator de virulência dentro da infecção (RHODES, POLACHECK & KWON-CHUNG, 1982, KWON-CHUNG E RHODES, 1986 E SALAS *et al.*, 1996 E LIU *et al.*, 2008). A **Figura 6** mostra como é sintetizado melanina a partir de L-DOPA por intermédio da lacase.



**Figura 6. Modelo representando a formação de melanina em *C. neoformans***

Vesículas contendo lacase são sintetizadas intracelularmente e transportadas para a parede celular. Aqui, eles interagem com o substrato de melanização, como a l-dopa, para produzir grânulos de melanina. Os polissacarídeos da parede celular, como a quitina, servem como uma estrutura à qual os grânulos de melanina são reticulados (EISENMAN & CASADEVALL., 2012).

O fato de *C. neoformans* ser capaz de produzir melanina a partir de catecolaminas como L-DOPA poderia explicar o tropismo do fungo pelo sistema nervoso central e pelo cérebro, visto que há grande quantidade de neurotransmissores como dopamina, epinefrina e noraepinefrina nesses locais. Isso permitiria um ambiente propício para que o agente etiológico possa construir uma proteção contra o sistema imunológico (CORDERO, CAMACHO E CASADEVALL, 2020).

Cepas produtoras de melanina, conseguiam capturar catecolaminas do meio e causavam uma mortalidade maior em camundongos infectados e tinham maior crescimento em órgãos como o cérebro em comparação a cepas albinas (KWON-CHUNG, POLACHECK E POPKIN, 1982; KWON-CHUNG & RHODES, 1986). Além disso, *C. neoformans* foi capaz de produzir melanina *in vivo* durante infecção de animais, como camundongos (NOSANCHUCK *et al.*, 1999), roedores (ROSAS *et al.*, 2000) e também em humanos (NOSANCHUCK, 2000), onde eram encontradas leveduras

contendo melanina isoladas dos cérebros desses indivíduos. Ademais, estes estudos demonstraram como a melanina é imunogênica em um processo infeccioso, em que cepas melanizadas conseguiam induzir a produção de anticorpos contra melanina, sugerindo que esta seria um importante fator de virulência de *C. neoformans* e que o hospedeiro conseguia produzir uma resposta imune contra ele.

Apesar da suspeita, apenas em 1995 que foi confirmado que a coloração se tratava realmente de pigmentos de melanina, após se verificar a presença de uma população estável de radicais livres por ressonância de spin eletrônico (ESR) em leveduras escuras após 8 dias de cultivo em meio contendo L-DOPA. Esse sinal era aumentado pela luz, pH alcalino e  $Zn^{2+}$ , propriedades físico-químicas inerentes à melanina. Em contrapartida, não era observado a presença deste sinal em leveduras crescidas em meio sem L-DOPA. O sinal dos radicais livres em leveduras que produziram melanina também era aumentado na presença de  $NaNO_2$ , em ácido succínico, onde se produzia óxido nítrico e intermediários reativos de nitrogênio, além disso, houve um pequeno aumento de sinal na presença de sulfato de amônia férrico,  $H_2O_2$  e epinefrina, onde são geradas espécies reativas de oxigênio, mostrando que a melanina era aumentada sob estresse oxidativo (WANG & CASADEVALL, 1994; WANG, AISEN & CASADEVALL, 1995).

A presença de melanina confere maior resistência à fagocitose por macrófagos (WANG, AISEN & CASADEVALL, 1995; MEDNICK, NOSANCHUK & CASADEVALL, 2005), peptídeos antimicrobianos (DOERING *et al.*, 1999) e às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (POLACHECK, PLATT E ARONOVITCH. 1990; JACOBSON & EMERY, 1991; JACOBSON & TINNELL, 1993; EMERY *et al.*, 1995 e ROSAS & CASADEVALL, 1997). Cepas contendo melanina também possuem uma sobrevivência maior dentro de macrófagos (JACOBSON E EMERY, 1991; JACOBSON E TYNNELL, 1993; WANG, AISEN & CASADEVALL 1994; WANG, AISEN & CASADEVALL, 1995, LIU, TEWARI & WILLIAMSON, 1999) e foram capazes de diminuir a resposta imune desencadeada por linfócitos T (HUFFNAGLE *et al.*, 1995). Além disso, essas cepas melanizadas também apresentaram maior resistência a antifúngicos (WANG & CASADEVALL, 1994, IKEDA *et al.*, 2003).

Apesar de não ter sido observado a polimerização de melanina de fato durante o curso da infecção, há fortes indícios de que ela ocorra, pois já foram vistas leveduras melanizadas tanto *in vitro* como em infecções *in vivo* em animais e humanos (NOSANCHUCK *et al.*, 1999; NOSANCHUCK *et al.*, 2000 e ROSAS *et al.*, 2000). As leveduras melanizadas foram isoladas tanto em cérebros de humanos (LEE, DICKSON &

CASADEVALL., 1996), quanto em modelos animais (NOSANCHUK *et al.*, 1998; NOSANCHUK *et al.*, 1999; LIU, WAKAMATUS & WILLIAMSON, 1999). Ainda, a infecção com a levedura causou a produção de anticorpos (ROSAS *et al.*, 2000), assim como peptídeos que alvejavam melanina (NOSANCHUK *et al.*, 1999) e também promoviam a ativação do sistema complemento (ROSAS *et al.*, 2002). Também já foram encontradas leveduras com melanina na excreta de pombos (NOSANCHUK, ROSAS & CASADEVALL, 1999), que é o principal meio de transmissão para criptococose.

A melanização se mostrou um importante fator de proteção ambiental, mas que também contribuiu ao longo da evolução como um fator de virulência para auxiliar na colonização do hospedeiro mamífero. Cepas que produziam melanina se mostraram mais resistentes a mudanças de temperatura (ROSAS & CASADEVALL, 1997) e a radiação ultravioleta (ZHDANOVA, GAVRIUSHINA, & VASILEVSKAIA, 1973; WANG & CASADEVALL, 1994). Todas essas propriedades conferidas pela melanina são importantes para lidar com os estresses ambientais e permitir a sobrevivência do *C. neoformans* em seu habitat, mas também se adaptarem com grande êxito como fatores de virulência, permitindo a colonização do hospedeiro mamífero.

### **1.5. Ativação de inflamassomas por fungos patogênicos e *C. neoformans***

É sabido que a infecção com fungos patogênicos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Microsporium canis* é capaz de promover a ativação do inflamassoma NLRP3 nas células hospedeiras (SAID-DADIER *et al.*, 2010; GANESAN *et al.*, 2014; HISE *et al.*, 2009; MAO *et al.*, 2014; GROSS *et al.*, 2009). A infecção com *C. albicans* também foi capaz de promover ativação de inflamassoma não canônico e ativação de CASP8 (GRINGHUIS *et al.*, 2012).

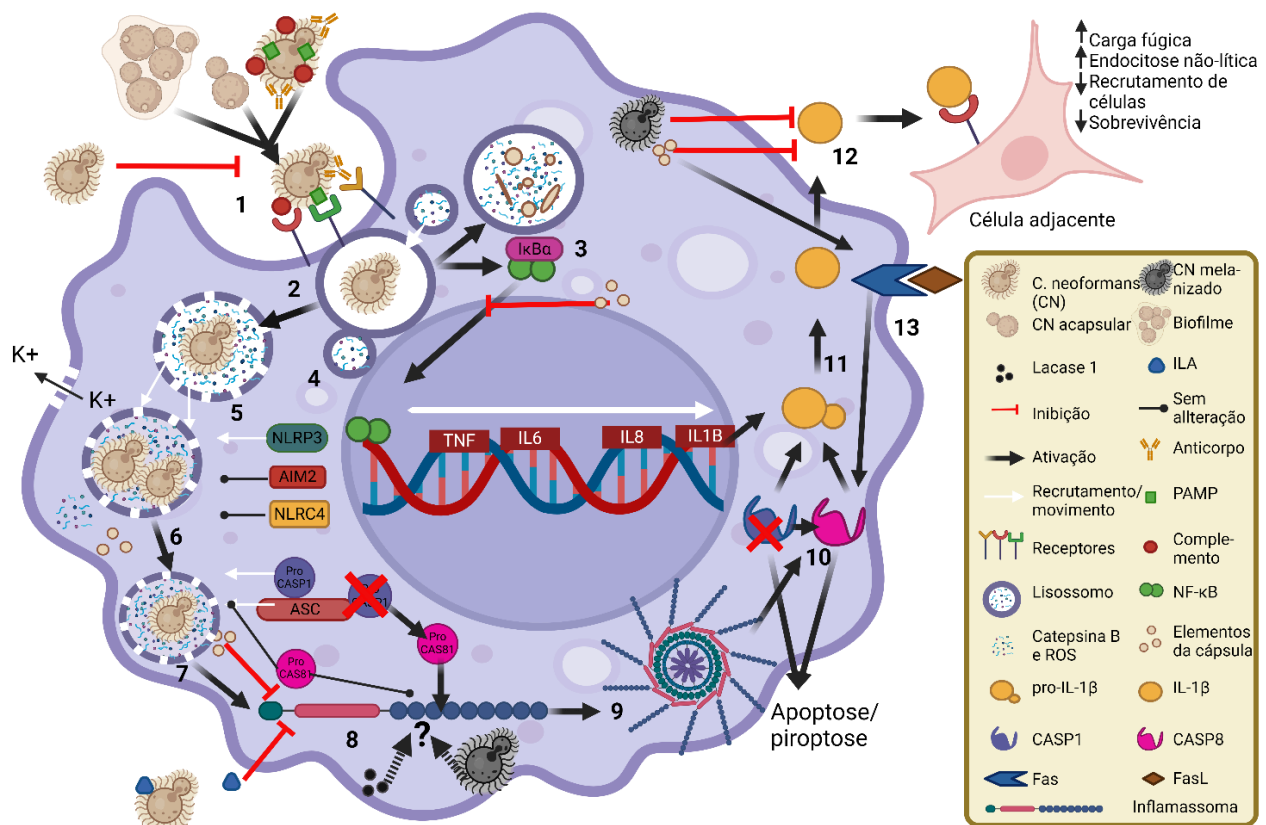
Aparentemente a cápsula de *C. neoformans* possui propriedades que inibem a ativação de inflamassomas, pois cepas sem cápsula causaram maior produção de IL-1  $\beta$  tanto de fagócitos humanos (VECCHIARELLI *et al.*, 1995; GUO *et al.*, 2014), como murinos (LUPO *et al.*, 2008), assim como em modelos *in vivo* (WANG *et al.*, 2011). Cepas sem cápsula também promoveram ativação de inflamassomas, como NLRP3, além de clivagem de caspase 1 e de caspase 8 na ausência de caspase 1, provocando a morte dessas células. Esse fenótipo era dependente de efluxo de K<sup>+</sup> e foi atenuado pela cápsula. Porém, outros inflamassomas como AIM2 e NLRC4 não foram afetados. O zimosan presente na parede de *C. neoformans* provavelmente conseguiria ser reconhecido pelo inflamassoma NLRP3, causando sua ativação, enquanto

Glucuronoxilomanana (GXM) e outros componentes da cápsula e alguns metabólitos secretados pelo fungo, como o Ácido DL-indol-3-láctico (ILA), causava sua inibição (GUO *et al.*, 2014, CHEN T AL., 2015; BÜRGELE *et al.*, 2020). O ILA também provocava uma diminuição da fagocitose e infiltração de leucócitos para pulmões e aumento da carga fúngica e endocitose não lítica (BÜRGELE *et al.*, 2020). Cepas com cápsula só foram capazes de induzir produção de IL-1 $\beta$  pelas células infectadas quando essas foram opsonizadas por soro ou anticorpo (GUO *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2015), ou seja, precisavam ser internalizadas.

Assim como cepas contendo cápsulas, as leveduras capazes de produzir melanina provocavam menor produção de IL-1 $\beta$  em cérebros de camundongos em modelos de infecção intracranial, o que estava relacionado com maior letalidade, maior carga fúngica e aumentava a sobrevivência de animais que depois eram infectados com cepas capazes de melanizar (RHODES, POLACHECK & KWON-CHUNG, 1982; BARLUZZI *et al.*, 2000).

Além disso, a galactoxilomana (GalXM), carboidrato que compõe cerca de 20% da cápsula de *C. neoformans*, provocou a apoptose de linfócitos T via caspase 8. GalXM é capaz de ser reconhecido por CD45 em células do hospedeiro o que induz a expressão de Fas e FasL. Quando essas moléculas são ativadas pelos seus respectivos receptores em outras células, induzem a clivagem da pró-Caspase 8 em caspase 8, o que inicia a cascata de apoptose na célula alvo (PERICOLINI *et al.*, 2006; PERICOLINI *et al.*, 2009; PERICOLINI *et al.* 2010; VECCHIARELLI *et al.*, 2011).

Apesar do conhecimento atual sobre o envolvimento de *C. neoformans*, e mais especificamente, da sua cápsula em processos inflamatórios e de morte celular, ainda não se sabe o papel da melanina ou da enzima responsável pela sua produção, a LAC1, nesses mecanismos. O mecanismo de formação, ativação de inflamassomas e morte celular, assim como componentes do patógeno que influenciam nesses processos são exemplificados na **Figura 7**.



**Figura 7. Mecanismos de fagocitose, reconhecimento intracelular, evasão e indução de morte celular por *C. neoformans*.**

As células de levedura *C. neoformans* só são reconhecidas e fagocitadas se forem acapsulares ou opsonizadas previamente por proteínas do complemento ou anticorpos. O biofilme de *C. neoformans* também pode ser reconhecido por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (1). O reconhecimento do fungo acapsular ou das opsoninas leva à fagocitose das leveduras (2) proporcionar o translocamento de NF-κB para o núcleo e à transcrição e tradução de mediadores inflamatórios como TNF-α, IL-6, IL-8 e IL-1B (3). Componentes da cápsula como GXM pode inibir o translocamento de p65 para o núcleo. Após a fagocitose, as células da levedura ficam presas no fagossomo, que então se funde com o lisossomo (4) para criar o fagolisossomo (5), o que pode levar à morte do agente invasor. *C. neoformans*, entretanto, pode inibir a ação de enzimas e baixar o pH e permeabilizar a membrana do fagolisossomo, levando ao vazamento de material fúngico para o citoplasma como também permitindo sua sobrevivência (6). No citoplasma, o NLRP3 pode reconhecer componentes de *C. neoformans*, como carboidratos da parede celular ou DAMPs causados por permeabilização do fagolisossomo, como catepsina B, espécies reativas de oxigênio (ROS) ou efluxo de íons potássio (K<sup>+</sup>) das células hospedeiras (7). Outros sensores como AIM2 e NLRC4 parecem não participar do reconhecimento de *C. neoformans* dentro da célula hospedeira. Para reconhecer essas moléculas, as proteínas sensoras associam-se à proteína adaptadora ASC e à caspase 1 (CASP1), para formar um complexo proteico (8), que se oligomeriza com outros complexos para se tornar uma plataforma multiproteica chamada inflamassoma (9). O inflamassoma ativo cliva e ativa o CASP1 ou CASP8 (10), que promove morte celular, assim como pode clivar e ativar a pró-IL-1B que foi produzida anteriormente (11), que agora pode ser secretada no meio extracelular e se ligar a receptores nas células-alvo (12), o que provoca alguns efeitos sistêmicos, como aumento de carga fúgica e docitose não-lítica, e diminuição de recrutamento leucocitário além de diminuir a sobrevivência em modelos animais. Na ausência de CASP1, a caspase 8 (CASP8) associa-se ao inflamassoma e controla os mesmos resultados controlados pelo CASP1. Elementos da cápsula como GXM provocam o aumento da expressão de Fas e FasL, o que aumenta a apoptose de células infectadas com *C. neoformans*. Esquema baseado em VECCHIARELLI *et al.*, 1995; PERICOLINI *et al.*, 2006; PERICOLINI *et al.* 2010; VECCHIARELLI *et al.*, 2011 LUPO *et al.*, 2008; PERICOLINI *et al.*, 2009; LEI *et al.*, 2013 GUO *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015, COELHO *et al.*, 2015 HAYES *et al.*, 2016, BURGÜEL *et al.*, 2020). Figura produzida no BioRender



## 2. Justificativa

A criptococose é uma doença em escala mundial, com efeitos incapacitantes e alta letalidade em pessoas imunocomprometidas, e que essa parcela de pessoas vulneráveis tende a se tornar cada vez maior devido a maior incidência de transplantes de órgãos e terapia contra tumores ao longo dos anos. Por se tratar de uma doença infecciosa, o sistema imunológico do hospedeiro desempenha um papel crucial no desenvolvimento da infecção, podendo controlá-la ou auxiliar a propagá-la. Assim, a pesquisa básica acerca do entendimento da interação patógeno-hospedeiro pode ser chave para decifrar como se desenvolve a enfermidade e seus diferentes desfechos no indivíduo. Visto que os fatores de virulência do *C. neoformans* já foram identificados e comprovaram ser imprescindíveis para o estabelecimento da infecção, assim como vias e proteínas do hospedeiro se mostraram preponderantes para promover proteção, alvejar esses fatores tanto no patógeno quanto no hospedeiro poderia ser uma ferramenta valiosa para elucidar várias lacunas de entendimento da patogênese da criptococose. É de suma importância entender como fatores de virulência de patógenos influenciam em vias de inflamação e respostas imunológicas. Visto que a cápsula, um importante e conhecido fator de virulência de *C. neoformans*, mostrou interferir em processos inflamatórios e de morte celular no hospedeiro, outros componentes do fungo, como a melanina, poderiam modular esses processos, o que poderia auxiliar no entendimento da patogênese e/ou estabelecimento da doença.

### **3. Objetivo**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar o papel da melanina e da LAC1 de *Cryptococcus neoformans* na inflamação e morte celular de macrófagos humanos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Investigar se a melanina e LAC1 de *C. neoformans* interferem na taxa de fagocitose de leveduras por macrófagos;
- Avaliar morte lítica e apoptose induzido pelo *C. neoformans* e se melanina e LAC1 modulam essas mortes;
- Analisar indução de proteínas NLRP3 e AIM2 e clivagem CASP1, CASP8, GSDMD e IL-1B pela infecção e como melanina e LAC1 modulam esses processos
- Observar como inibição de NLRP3, AIM2, CASP1, CASP8 interfere na fagocitose de leveduras, morte e ativação de proteínas componentes do inflamassoma de macrófagos.

## 4. Metodologia

### 4.1. Cultivo de THP-1 e diferenciação em macrófagos

Células da linhagem monocítica humana THP-1 foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (código: 0234) e foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

A diferenciação das células THP-1 em macrófagos foi realizada via estímulo com PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) a 100 nM por 72h, seguido de repouso por mais 24-48h em meio sem o estimulante para que as células voltassem ao sem estado basal inflamatório, em densidade de 2-5 x 10<sup>5</sup> células/mL. A constatação da diferenciação dessas células foi feita mediante análise morfológica através de microscopia de luz, verificação da adesão dessas células ao fundo dos poços.

### 4.2. Cultivo de leveduras de *Cryptococcus neoformans*

Leveduras de *C. neoformans* da cepa H99 selvagem (WT) e deficientes em LAC1 ( $\Delta$ LAC1), foram adquiridas pelo *Fungus Genetic Stock Center* (FGST <https://www.fgsc.net/index.htm>), onde o mutante foi desenvolvido em trabalho anterior (LIU *et al.*, 2008). Leveduras foram reativadas da criopreservação pelo estricamento por desgaste de alça em placa de Petri contendo meio Saboraud-ágar 1,5%. Para cultivo e crescimento das leveduras, uma única colônia crescida no meio sólido foi inoculada em 25-50 mL de meio Saboraud líquido e cultivadas a 37°C, sob agitação de 150 rpm por cerca de 24h antes de serem usadas para a produção de melanina (NICOLA *et al.*, 2011 e NICOLA E CASADEVALL, 2012).

### 4.3. Indução de produção de melanina em *C. neoformans*

Para induzir produção de melanina em leveduras de *C. neoformans* selvagens (WT) e  $\Delta$ LAC1, 1 x 10<sup>8</sup> leveduras/mL foram cultivadas em meio mínimo contendo glicina, tiamina e L-DOPA com limitada concentração de glicose (29,4 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, 13 mM de glicina, 15 mM de glicose, 3  $\mu$ M de tiamina, 1 mM de L-DOPA) por 24h, a 37°C a 150 rpm, conforme adaptações em protocolos já estabelecidos (CHASKES E TYDALL, 1975; FRAZÃO *et al.*, 2020).

### 4.4. Infecção de macrófagos por leveduras de *C. neoformans*

Após a diferenciação de macrófagos derivados de THP-1 e da indução de produção de melanina em *C. neoformans*, as leveduras foram interagidas com os macrófagos (10:1 leveduras:macrófagos) na presença de *pool* de soro humano (PSH) a

fim de permitir sua fagocitose (BOLAÑOS & MITCHELL, 1989a; BOLAÑOS & MITCHELL, 1989b; LEVITZ & TABUNI, 1991, KELLY *et al.*, 2005) por até 2, 5 e 24 h.p.i (NICOLA *et al.*, 2011 e NICOLA E CASADEVALL, 2012). O PSH foi obtido do sangue de 4-5 doadores, misturado e armazenado a -80°C até o seu uso. A coleta de sangue foi realizada sob autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, através do Certificado de Apresentação de Apreciação Ética CAAE 53168621.0.0000.5558

#### **4.5. Taxa de fagocitose de macrófagos por *C. neoformans***

A fim de verificar a internalização de leveduras por macrófagos e o papel da melanina neste processo, foi mensurado o número de macrófagos contendo leveduras internalizadas através de coloração com panótico dos macrófagos e contagem de ao menos 100 células por condição sob microscopia óptica. Foram definidos número de macrófagos que realizaram fagocitose (com 1 ou mais levedura internalizadas) e sem fagocitose (sem leveduras internalizadas). Além disso, dentro das células com fagocitose, também foi quantificado o número de leveduras por cada célula.

A fagocitose também foi mensurada pela coloração antes da infecção de macrófagos e leveduras com CellTracker Deep Red e CMFDA, respectivamente. Depois os macrófagos foram recuperados e analisados (Deep Red+) por citometria de fluxo para avaliar a porcentagem de células contendo leveduras (CMFDA+). Os dados foram compensados e analisados através do software FlowJo.

#### **4.6. Morte celular ocasionada por *C. neoformans***

Após a infecção de macrófagos pelas leveduras, as células foram marcadas com anexina-V conjugada a ficoeritina (PE) (proteína com alta afinidade por fosfatidilserina, para constatar apoptose pelo rompimento da membrana plasmática) (KOOPMAN *et al.*, 1994 E VERMES *et al.*, 1995; NAITO *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1996) e 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) (NICOTELLI *et al.*, 1991), afim de constatar se há morte dessas células após infecção e discernir que tipo de morte ocorreria.

#### **4.7. Inibição de proteínas dos inflamassomas e de vias de morte**

Foram utilizando os inibidores Ac-YVAD-cmk (20 µM), Z-IETD-fmk (40 µM), MCC950 (1 µM) e ODN TTAGGG (1 µM) para a inibição das proteínas caspase 1, caspase 8, NLRP3 e AIM2, respectivamente, 1 hora antes da interação com as leveduras

de *C. neoformans* e que foram mantidas durante o curso da infecção. Foi utilizado como controle positivo de morte lítica macrófagos estimulados com LPS (Lipopolissacarídeo) (200 ng/mL) por 2-4 horas e depois adicionado Nigericina (10  $\mu$ M) por mais 1-2 horas e como controle de apoptose macrófagos estimulados com camptotecina a 10  $\mu$ M.

#### **4.8. Avaliação de ativação de inflamassomas**

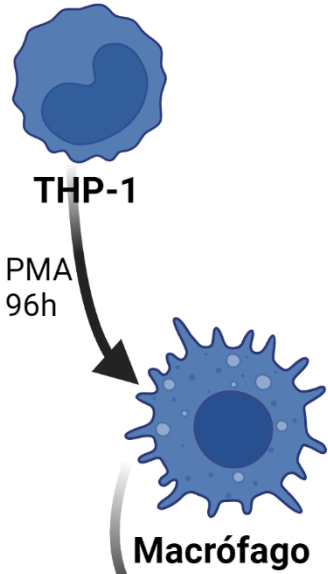
Para avaliar a interferência da melanina no reconhecimento de *C. neoformans* por inflamassomas, macrófagos infectados com leveduras, melanizadas ou não, foram analisados quanto a abundância de proteínas sensoras (NLRP3 e AIM2) e adaptadoras (ASC) de inflamassomas, assim como a expressão e clivagem de proteínas efetoras de morte apoptótica e/ou piroptótica como CASP1, CASP8, GSDMD e IL-1 $\beta$ . Essa análise foi realizada através de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-Page), transferência para membrana de PVDF e Western blotting usando anticorpos comerciais adquiridos para cada uma dessas proteínas, com revelação por quimioluminescência, seguindo protocolo já estabelecido e otimizado em nosso laboratório (JAKOBS *et al.*, 2013). Resumidamente, cerca de 20-30  $\mu$ L de extrato proteico de cada condição foi adicionado por poço em gel de poliacrilamida 15% e submetido a eletroforese de 100 V por cerca de 2 horas. Após esse período, proteínas do gel foram transferidas para membrana de PVDF com poros de 0,2  $\mu$ m em transferência e tanque usando tampão Towbin +0,05% de SDS e 20% de metanol, a 100 V por 30 minutos a 4°C. Após a transferência, os géis eram corados com azul de *Coomassie* e membranas com Ponceau S 5% para atestar transferência bem-sucedida das proteínas. Depois, as membranas foram bloqueadas com solução de tampão TBS + 5% de leite desnatado em pó por pelo menos 30 min a temperatura ambiente. Depois, as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos na diluição de 1:1000 a 4°C por cerca de 16 horas sob agitação. As membranas então foram lavadas 3 vezes com TBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados a peroxidase (HRP) alvejando porção Fc dos respectivos hospedeiros usados em anticorpos primários, por 1-2h a temperatura ambiente na diluição de 1:2000-5000. Após nova lavagem das membranas, foi utilizado substrato de peróxido de hidrogênio adicionando luminol, seguindo recomendações dos fabricantes para revelação de quimioluminescência de proteínas.

#### **4.9. Análise de dados e estatística**

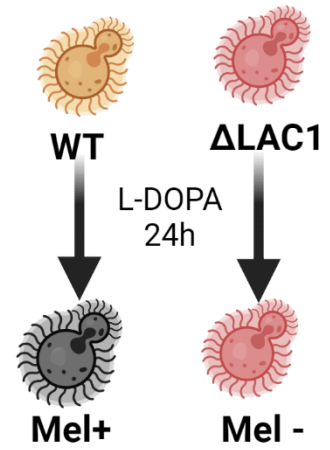
Análises descritivas dos dados assim como análises estatísticas inferenciais foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism.8, utilizando teste do qui-quadrado ou

exato de Fisher para comparar número de eventos, teste T ou ANOVA de um fator para comparação de variáveis quantitativas dentro das diferentes condições.

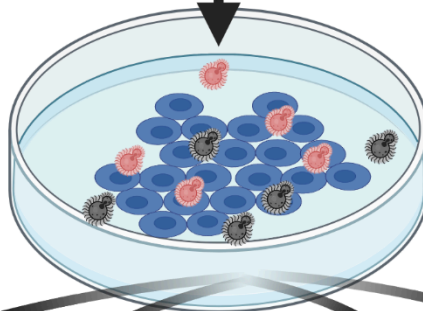
## Monócito humano



## *C. neoformans*



Inibidores  
(NLRP3, AIM2,  
CASP1, CASP8)



### Fagocitose e carga fúngica

CFU  
Laser  
Detector  
Count  
CFMFA  
Macrófagos  
CFMFA+

### Ativação NF-κB e IRF

Absorbância e luminescência

### Morte celular

Captação de PI  
Flow cytometry  
Side light scatter (SSC)  
Forward light scatter (FSC)  
Anexina-V/  
7-AAD

### Formação de inflamassomas

SDS-page/  
Immunoblotting

**Figura 8. Fluxograma das etapas e metodologias aplicadas para diferentes estágios do trabalho realizado.**

Monócitos humanos da linhagem THP-1 foram cultivados e diferenciados em macrófagos através do estímulo com 13-Acetato 12-miristato forbol (PMA da sigla em inglês para *Phorbol 12-myristate 13-acetate*) por 48-72h, seguido cultivo por mais 24-48h sem a presença de PMA. Concomitantemente, leveduras de *C. neoformans* da cepa H99 tanto da cepa selvagem (WT) como deficiente em LAC1 ( $\Delta$ LAC1) foram cultivadas e depois incubadas em meio mínimo contendo L-DOPA por 24h, a 37°C, 150 rpm, a fim de estimular a produção de melanina. Uma vez obtido os macrófagos e as leveduras produzindo melanina, ambas foram interagidas com um MOI 10, por 2, 5 ou 24h na presença ou na ausência de inibidores para proteínas relacionadas com inflamação morte, como AIM2, NLRP3, CASP1 e CASP8. Depois da interação foram realizadas análises em 3 blocos entre as diferentes condições: fagocitose e sobrevivências das leveduras, morte celular e formação de inflamassomas. Para mensurar a fagocitose, foi analisado macrófagos que fagocitam leveduras pela coloração de leveduras com corantes fluorescente e aquisição de macrófagos por citometria de fluxo. Com o intuito de analisar a ativação de vias ligadas a produção de mediadores inflamatórios como NF- $\kappa$ B e IRF, macrófagos derivados de THP-1 dual contendo genes repórteres para duas vias foram infectadas com *C. neoformans* e seu sobrenadante foi avaliado por absorvância e luminescência para constatar a ativação dessas vias pela produção de fosfatase alcalina e luciferase. A fim de analisar morte celular e o tipo de morte causada pela infecção com *C. neoformans*, macrófagos foram corados com anexina V-PE e 7-AAD e analisado por citometria de fluxo, além disso, Para avaliar a formação de inflamassomas e proteínas destes envolvidas na infecção e a interferência da melanina e da LAC1 neste processo, após a interação macrófagos foram lisados e o extrato proteico foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-page), com subsequente transferência das proteínas para membrana de PVDF, bloqueio e marcação com anticorpos comerciais para proteínas como AIM2, NLRP3, CASP1, CASP8, CASP3, ASC, GSDMD e IL1B. Figura criada no BioRender.



## 5. Resultados

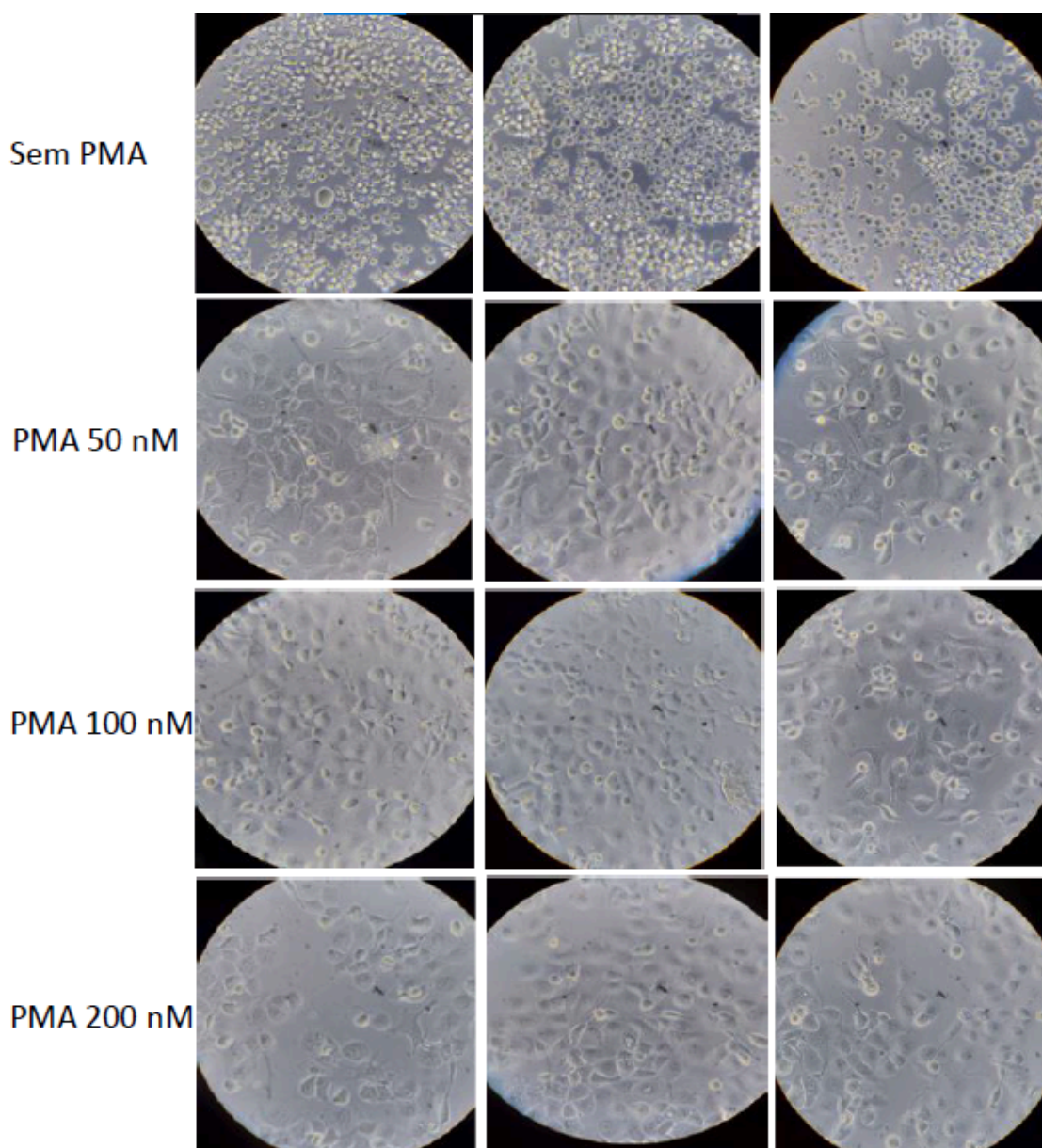
### 5.1. Padronização de experimentos

#### 5.1.1 Obtenção de macrófagos a partir de monócitos de THP-1

Primeiramente, foi verificado se houve diferenciação dos monócitos da linhagem THP-1 em macrófagos através de indução com forbol miristato acetato (PMA – da sigla em inglês *Phorbol 12-myristate 13-acetate*). Foram testados diferentes protocolos, como os que utilizaram 50 ng/mL por 48h, porém, não foi notado diferença na morfologia, tampouco na aderência das células após esse período, mesmo utilizando diferentes densidades de células ( $10 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ ;  $1,25 \times 10^5$  e  $0,75 \times 10^5$  cels/mL) (dados não mostrados).

Portanto, foi testado a concentração de 100 nM de PMA, amplamente utilizado na literatura, e mais duas concentrações, duas vezes mais concentrado e diluído (200 e 50 nM, respectivamente), por 2-3 dias utilizando uma densidade celular de  $2 \times 10^5$  células/mL (densidade que mostrou confluência apropriada até o último dia de diferenciação). Após 3 dias, o meio antigo era substituído por um novo sem PMA, a fim de permitir o repouso das células, as quais ficam com um fenótipo altamente inflamatório após estímulo com PMA, por mais 24-48h (PARK *et al.*, 2007; LUND *et al.*, 2016).

No segundo e terceiro dia, já era possível visualizar mudanças drásticas na morfologia das células. A grande maioria se apresentava alongada e espalhada em todas as concentrações testadas, além de parecerem aderidas ao fundo dos poços, conforme pode ser visto na **Figura 9**, após incubação com PMA por 72h. Já as células não tratadas com PMA mantiveram sua morfologia arredondada e em suspensão, além do fato de parecer ter se multiplicado muito mais quando comparada com as células tratadas.



**Figura 9. Macrófagos obtidos a partir da diferenciação de células THP-1 estimulado com PMA por 72h.**

Células THP-1 com densidade de 200 mil células/ mL foram plaqueadas e incubadas sem ou com PMA nas concentrações de 50, 100 e 200 nM por 72h a 37° C, 5% CO<sub>2</sub>. As morfologias das células foram averiguadas através de microscopia óptica. Fotos do fundo dos poços mostrando densidade e morfologia das células após 72h de estímulo com PMA de três réplicas por condição. Cada foto é referente a uma réplica do mesmo experimento feito no mesmo dia. Aumento de 400x.

Ao contar as células no sobrenadante que estavam suspensas, ou seja, aquelas não aderidas, notou-se que quase não há diferença entre o número de células que foram estimuladas com 100 e 200 nM (18,3 mil e 8,3 mil células/mL, respectivamente), enquanto houve um aumento de células suspensas em 50 nM (48,3 mil células/mL). Porém, o número médio de células não aderidas era de 830 mil/mL nas condições em que não houve estímulo com PMA, e conseqüentemente, não se diferenciaram. O número de células em suspensão foi 17 vezes a mais comparado com 50 nM de PMA, conforme ilustrado na **Figura 10**. Portanto, concluiu-se que as células THP-1 sob estímulo por 72h

com 100 e 200 nM de PMA diferenciaram-se em macrófagos, levando em consideração sua morfologia e aderência. Optou-se por utilizar 100 nM de PMA para a diferenciação de THP-1 em macrófagos para os próximos experimentos, por ser amplamente empregado na literatura e ser o suficiente para promover sua diferenciação.

### Células em suspensão após estímulo com PMA

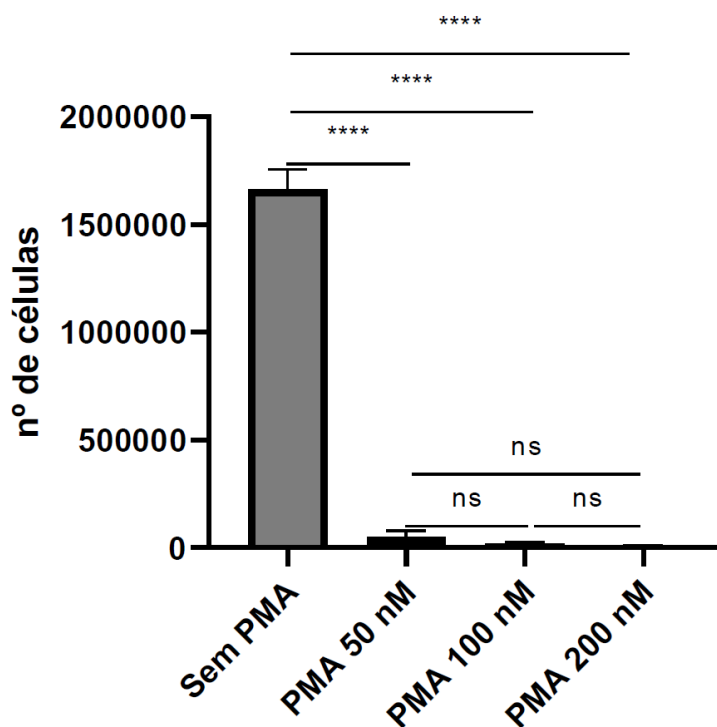


Figura 10. Número de células suspensas no sobrenadante após estímulo com PMA.

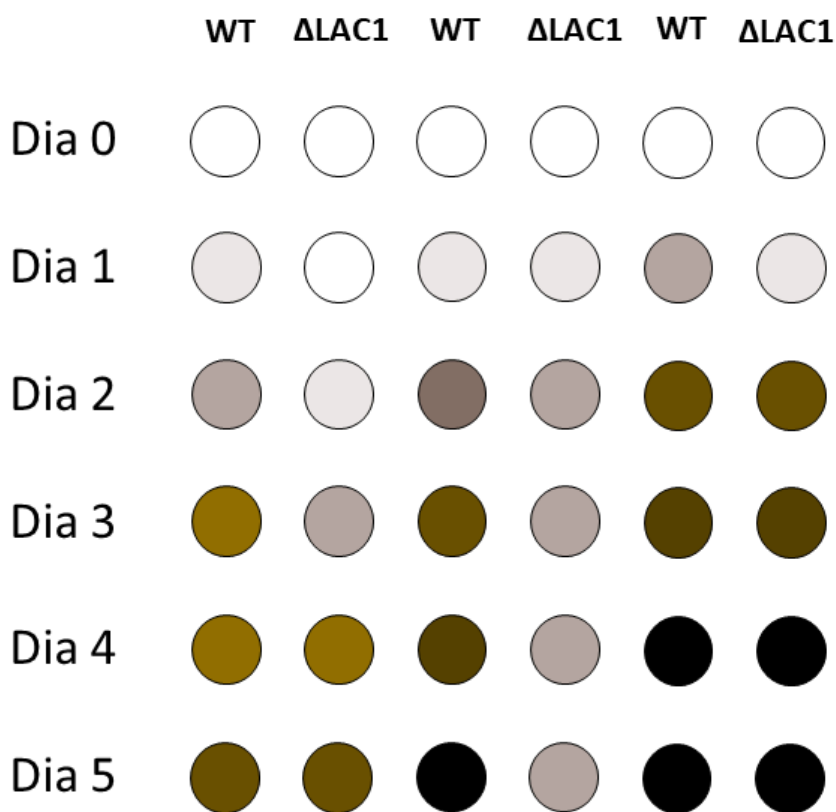
Células THP-1 foram incubadas sem ou com 50, 100 e 200 nM de PMA por 72h com densidade de 200 mil células/mL. Após esse período, foi coletado o sobrenadante das diferentes condições e foram contabilizadas células vivas em câmara de Neubauer utilizando técnica de exclusão por Azul de Tripán 0,4%. Gráficos de barra representando a média e o erro padrão de 3 réplicas referentes a um experimento. Valores de P foram calculados utilizando teste T de Student comparando duas condições por vez. \* < 0,05, \*\* < 0,01; \*\*\* < 0,001

#### 5.1.2 Melanização de *C. neoformans* H99 selvagem e $\Delta$ LAC1

A segunda etapa do trabalho foi testar e padronizar o processo de produção de melanina pelo *Cryptococcus neoformans* da cepa H99 e do seu respectivo mutante deletado para LAC1 ( $\Delta$ LAC1) em meio contendo glicina (como fonte de nitrogênio) e L-dopamina (L-DOPA), (como precursor da melanina). Esse meio é muito utilizado para induzir melanização em *C. neoformans* e a glicina se mostrou eficiente para promover a melanização em menos tempo (CHASKES & TYNDALL, 1975).

A Figura 11 mostra um esquema com as colorações obtidas das culturas de leveduras em meio mínimo contendo glicina e L-DOPA ao longo de 5 dias de três

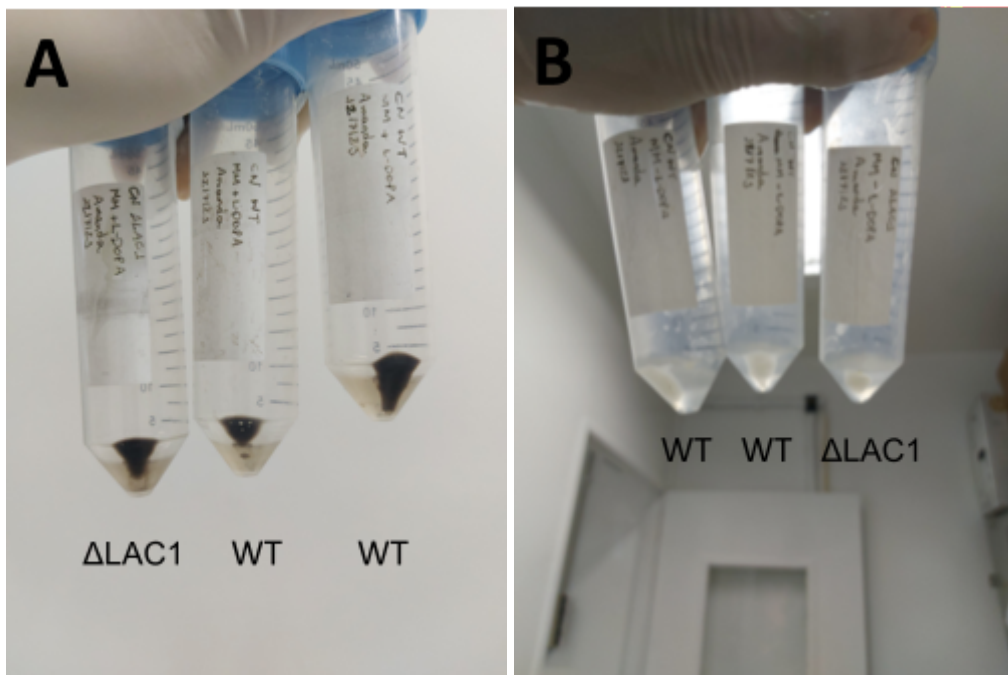
experimentos realizados em dias diferentes. Todas as condições apresentaram coloração esbranquiçadas no dia 0, coloração típica das leveduras de *C. neoformans*. É possível notar que a cepa H99 selvagem produz melanina ao longo do tempo e adquire coloração cada vez mais escura, atingindo uma cor próxima do preto nos dias 4-5. Percebeu-se também que, apesar de a cepa  $\Delta$ LAC1 não possuir a enzima LAC1, essa ainda é capaz de produzir melanina, porém, aparentemente numa velocidade menor que a cepa selvagem. Todavia, pode atingir uma coloração parecida com o do selvagem após o quarto dia de indução de melanização.



**Figura 11. Esquema de coloração adquirida por *C. neoformans* selvagem (WT) e  $\Delta$ LAC1 durante melanização.**

Leveduras foram incubadas em meio mínimo contendo, glicina 13 mM, L-DOPA 1 mM, a 37°C, 150 rpm, por 5 dias. Coloração adquirida por células foram observadas e fotografadas a cada dia por 5 dias em 3 experimentos distintos.

Mesmo após precipitar as leveduras no fundo dos tubos, notou-se que não era apenas um escurecimento do meio, que poderia se dar devido a auto-polimerização da L-DOPA, mas sim que as próprias leveduras adquiriram coloração escura, como mostra a **Figura 12**. Portanto, mesmo na ausência de LAC1, *C. neoformans* ainda é capaz de produzir melanina, sugerindo que outras enzimas do fungo possam ser responsáveis pela conversão de L-DOPA em melanina.



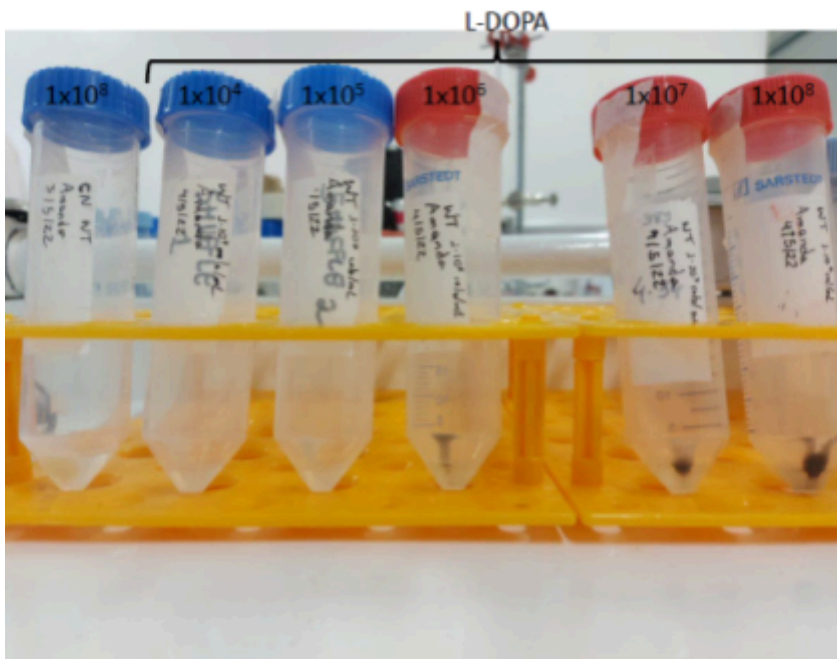
**Figura 12. Melanização de *C. neoformans* H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1 e meio contendo glicina e L-DOPA após 5 dias.**

Fotos de tubos após centrifugação com leveduras precipitadas de *C. neoformans* H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1 cultivadas com (A) ou sem L-DOPA (B), mostrando coloração adquiridas após 5 dias em processo de melanização.

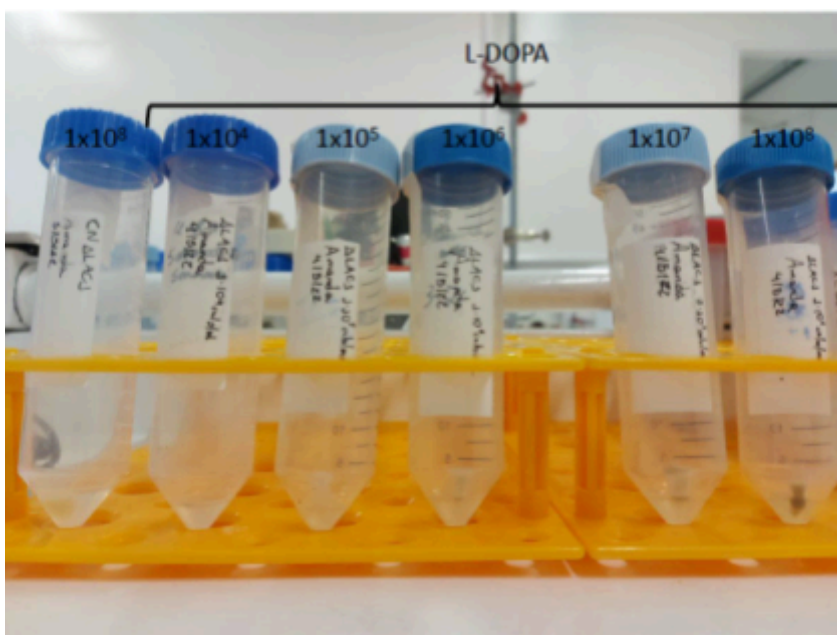
Visto que foram necessários vários dias até que as leveduras selvagens produzissem melanina, a fim de acelerar esse processo, tentamos otimizar o protocolo. Foi possível perceber também ao longo dos testes que quanto maior a densidade de leveduras, mais rápido se dava a melanização de *C. neoformans.*, como pode ser observado na **Figura 13**.



## A *C. neoformans* H99 selvagem



## B *C. neoformans* H99 $\Delta$ LAC1

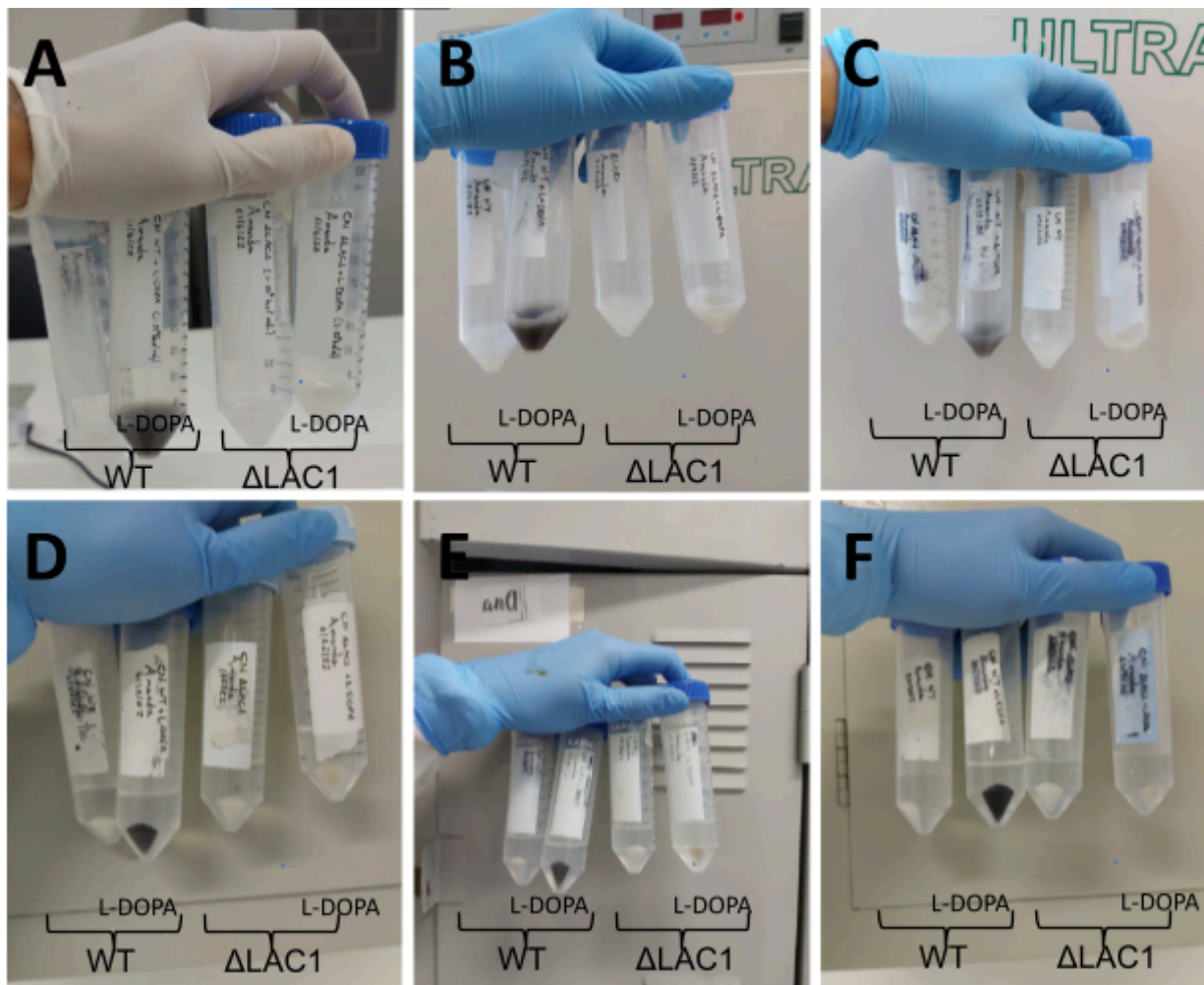


**Figura 13. Melanização acelerada em *C. neoformans* H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1 a medida que se aumenta a densidade de leveduras.**

Fotos mostrando coloração de leveduras precipitadas de *C. neoformans* selvagem (A) e  $\Delta$ LAC1 (B) após incubação por 48h com L-DOPA em densidades de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^8$  leveduras/mL.

Viu-se que utilizando o inóculo de  $1 \times 10^8$  leveduras/mL para melanização com L-DOPA por 24h, era possível obter a cepa selvagem com coloração quase preta, sem tanta alteração na coloração da cepa  $\Delta$ LAC1, permanecendo basicamente esbranquiçada. Portanto, por ser um protocolo menos dispendioso e mais prático onde

não havia melanização da cepa  $\Delta$ LAC1, optou-se por esse protocolo nos experimentos seguintes. A **Figura 14** mostra a coloração das leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1 obtidas após incubação com ou sem L-DOPA por 24h em três dias diferentes.



**Figura 14.** Melanização de *C. neoformans* H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1 com densidade de  $1 \times 10^8$  leveduras/mL em meio contendo glicina e L-DOPA após 24h.

Fotos de tubo com leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1 cultivadas em meio mínimo contendo glicina 13 mM, na presença ou não de L-DOPA a 37°C, 150 rpm por 24h. Foto de leveduras em suspensão (A, B e C) e precipitadas (D, E e F), mostrando coloração adquiridas após 24h em processo de melanização com inóculo de  $1 \times 10^8$  leveduras/mL em experimentos feitos em dias diferentes.

### 5.1.3. Oponização e fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos-THP-1

O próximo passo foi avaliar as condições de interação dos macrófagos diferenciados dos monócitos THP-1 e das leveduras com melanina, permitindo a internalização dos fungos. Devido a presença de uma cápsula polissacarídica em volta das leveduras de *C. neoformans* H99, a fagocitose desses fungos é drasticamente reduzida, quase inexistindo. Portanto, é necessário a oponização das leveduras antes ou

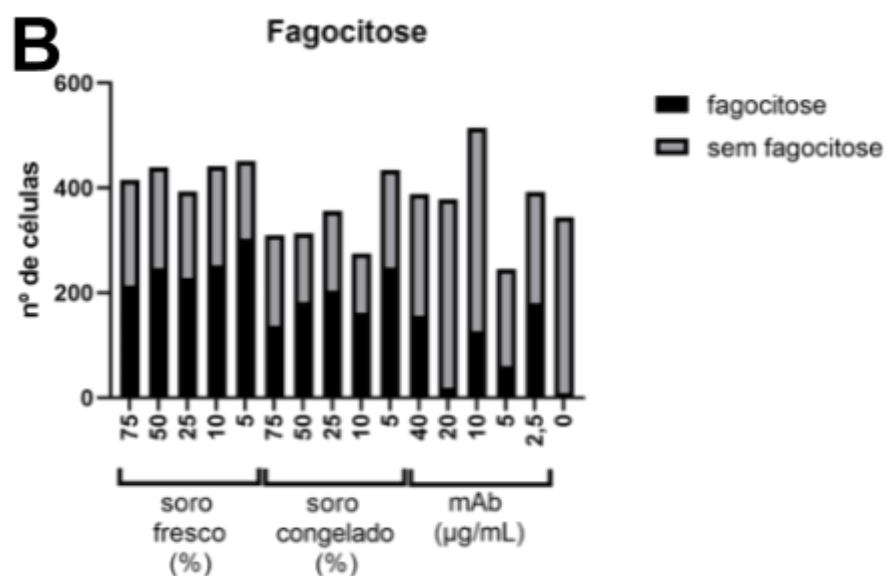
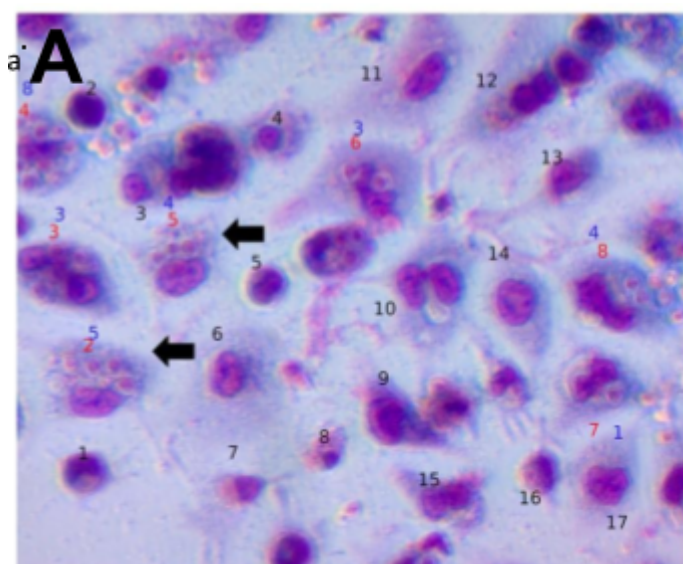
durante a interação com as células hospedeiras para que haja sua internalização. A grande maioria dos estudos de infecção com *C. neoformans* são feitos em modelos murinos, nos quais utilizam-se anticorpos oriundos de camundongos contra epítomos presentes na cápsula do fungo. Assim, este será opsonizado e permitirá seu reconhecimento e fagocitose por células do hospedeiro. Entretanto, por se tratar de um anticorpo murino, não seria um modelo viável para ser usado em células humanas.

Alguns estudos utilizam soro do hospedeiro para permitir a fagocitose de *C. neoformans*, onde as proteínas do sistema complemento opsonizam as leveduras e permitem sua internalização pelas células hospedeiras (LEVITZ & TABUNI, 1991; ZARAGOVA, TABORDA & CASADEVALL, 2003; VAN ASBECK *et al.*, 2008). Tendo isso em mente, foi analisada a proporção de internalização de leveduras de *C. neoformans* H99 por macrófagos de THP-1 na presença de diferentes concentrações de soro humano misturado de diferentes doadores (PSH - pool de soro humano).

Após aprovação pelo CEP, foi então comparado se haveria diferença na proporção de macrófagos com leveduras internalizadas quando usado soro fresco (recém coletado de doadores) ou congelado (coletado anteriormente e armazenado a -80°C até o uso) no momento da infecção. Também foi comparado essas condições utilizando diferentes concentrações do anticorpo monoclonal murino 18B7 (mAb) como controle, que reconhece Glucuronoxilomanana (GXM) de *C. neoformans* e é amplamente utilizado na literatura para sua opsonização e internalização das leveduras.

Após 2 horas de infecção (h.p.i), os macrófagos foram lavados para retirar leveduras extracelulares e corados com panótico para visualizar tanto os macrófagos como as leveduras em seu interior. Em seguida, os macrófagos foram visualizados sob microscopia óptica e foram contadas pelo menos 100 células por condição, analisando quantas continham ou não leveduras internalizadas. Também foi contabilizado o número de leveduras dentro de cada célula que havia realizado fagocitose. É possível visualizar que após 2 horas de interação há macrófagos com leveduras fagocitadas, conforme pode ser visto na **Figura 15**.



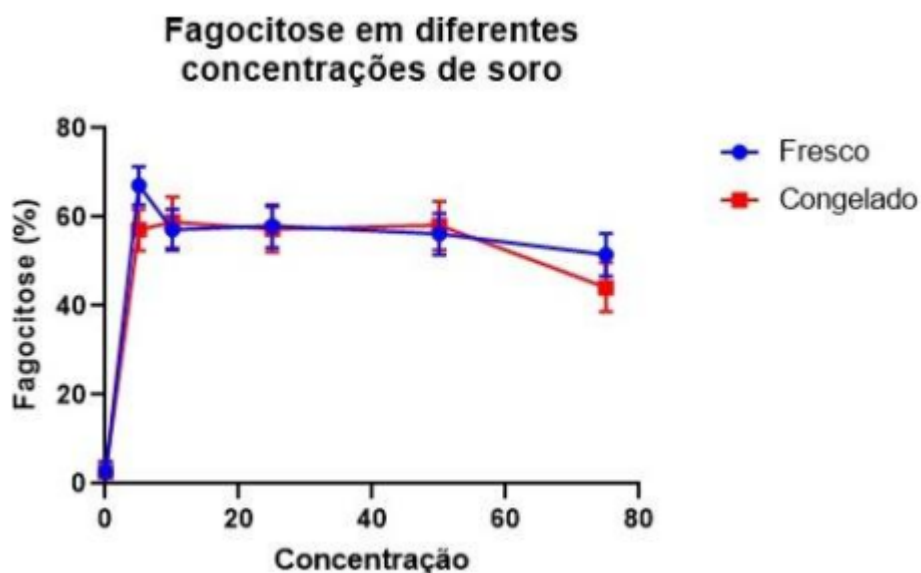


**Figura 15. Fagocitose de leveduras de *C. neoformans* selvagem por macrófagos com diferentes concentrações de distintos agentes opsonizantes**

Macrófagos diferenciados de THP-1 foram interagidos com leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem, na proporção de 10 leveduras para 1 macrófago (MOI 10) por 2h A 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, na presença de diferentes agentes opsonizantes em diferente concentrações. Leveduras extracelulares foram lavadas e os macrófagos foram corados com panótico. Foto obtida sob microscopia óptica. Setas mostram macrófagos com leveduras fagocitadas. Algarismos em vermelho representam o número de macrófagos com leveduras internalizadas, enquanto números em pretos são a contagem de macrófagos sem leveduras. Números em azul representam a quantidade de leveduras dentro de cada macrófago (A). Número de macrófagos que realizaram ou não fagocitose das leveduras na presença de soro fresco ou congelado, nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 75% ou com anticorpo monoclonal 18b7 (mAb) nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20 µg/mL. Gráficos de barras mostrando o número total de células com ou sem fagocitose somado de 3 réplicas do mesmo experimento. (B). Como controle, não foi adicionado nenhum agente opsonizante no momento da interação entre macrófagos e as leveduras.

Observou-se que a maioria dos macrófagos fagocitaram leveduras em todas as concentrações utilizadas, tanto no soro fresco quanto no que estava congelado. Já na presença do mAb como agente opsonizante, houve uma redução da fagocitose de leveduras. Como já era esperado, na ausência de qualquer agente opsonizante basicamente não houve fagocitose de leveduras. Fazendo uma regressão logística, pode-se ver que a presença de soro aumenta significativamente a fagocitose em mais de 50 vezes.

Comparando a taxa de fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos nas diferentes concentrações testadas de soro fresco e congelado, pode-se notar que não há diferença entre as duas condições, conforme mostrado na **Figura 16**. Segundo o cálculo de razão de chance, o soro fresco aumentou em 64 vezes a chance de haver fagocitose e o soro congelado em 56 vezes. Já as diferentes concentrações de soro não contribuíram para haver mais fagocitose, visto que a razão de chance é quase igual a 1.



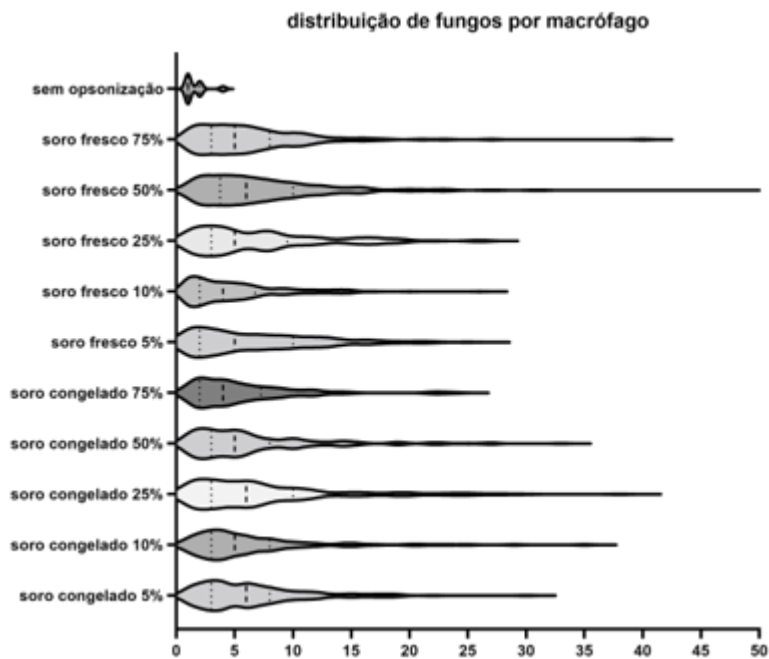
Odds ratio	Variável	Estimativa	Intervalo de confiança (95%)
$\beta_0$	Intersecção	0,02687	0,01282 a 0,04095
$\beta_1$	Soro fresco	64,04	34,70 a 135,3
$\beta_2$	Soro congelado	56,40	30,53 a 119,3
$\beta_3$	Concentração	0,9936	0,9911 a 0,9960

Significância diferente de 0	Variável	Z	Valor de P	Sumário valor de P
$\beta_0$	Intersecção	10,71	< 0,0001	****
$\beta_1$	Soro fresco	12,12	< 0,0001	****
$\beta_2$	Soro congelado	11,74	< 0,0001	****
$\beta_3$	Concentração	5,185	< 0,0001	****

**Figura 16: Comparação de fagocitose de leveduras de *C. neoformans* selvagem por macrófagos em diferentes concentrações do soro fresco e congelado.**

Macrófagos foram interagidos com leveduras na presença de soro fresco ou congelado (concentrações de 5, 10, 25, 50 e 75% final) ou sem soro por 2h, MOI 10. Depois, leveduras extracelulares foram lavadas e macrófagos foram corados com coloração de panótico. Ao menos 100 células de cada condição foram contadas sob microscopia óptica para avaliar a presença ou ausência de leveduras fagocitadas. Gráfico de linhas representando a média e erro padrão da proporção de macrófagos que fagocitaram leveduras em três réplicas em cada concentração de soro fresco (azul) e congelado (vermelho). Análise de regressão logística entre soro fresco ( $\beta_1$ ), congelado ( $\beta_2$ ) e suas diferentes concentrações ( $\beta_3$ ), com seus respectivos valores de p e significância, estabelecido  $\alpha = 0,05$ . Análise referente a três réplicas de cada condição do mesmo experimento.

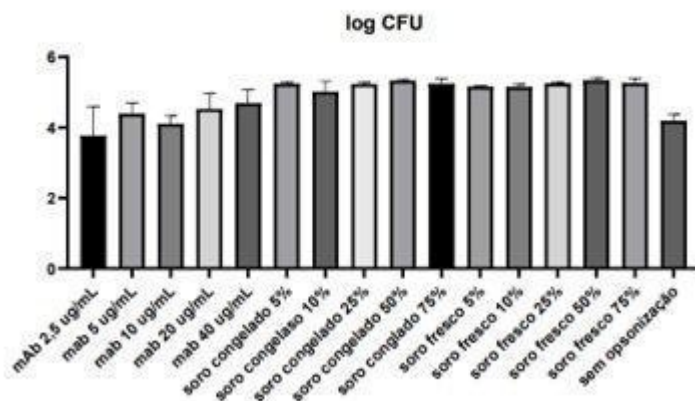
Também foi contabilizado o número de leveduras que havia dentro de cada célula infectada e comparada a cada condição. Não foi possível notar diferença no número de leveduras por célula usando soro fresco ou congelado em diferentes concentrações, conforme podemos observar no gráfico da **Figura 17**, onde mostra a mediana e distribuição do número de leveduras/células. Portanto, foi escolhida a concentração de 10% de soro congelado para os próximos experimentos, visto que é uma concentração suficiente para permitir a fagocitose. O fato de o soro poder ser congelado torna mais praticável a execução das interações, pois evita a convocação de doadores, coleta de sangue, separação do soro, junção de soros obtidos no mesmo dia dos experimentos de interação.



**Figura 17. Número de leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem fagocitadas por macrófago.**

Macrófagos foram interagidos com leveduras na presença de soro fresco ou congelado (concentrações de 5, 10, 25, 50 e 75% final) ou sem soro por 2h, MOI 10. Depois, leveduras extracelulares foram lavadas e macrófagos foram corados com panótico. Ao menos 100 células de cada condição foram contadas sob microscopia óptica para avaliar a presença ou ausência de leveduras fagocitadas e o número de leveduras presentes em cada macrófago que realizou fagocitose foi mensurado. Gráficos de violino representando a distribuição e mediana de número de leveduras por macrófago referentes a três réplicas realizadas no mesmo dia.

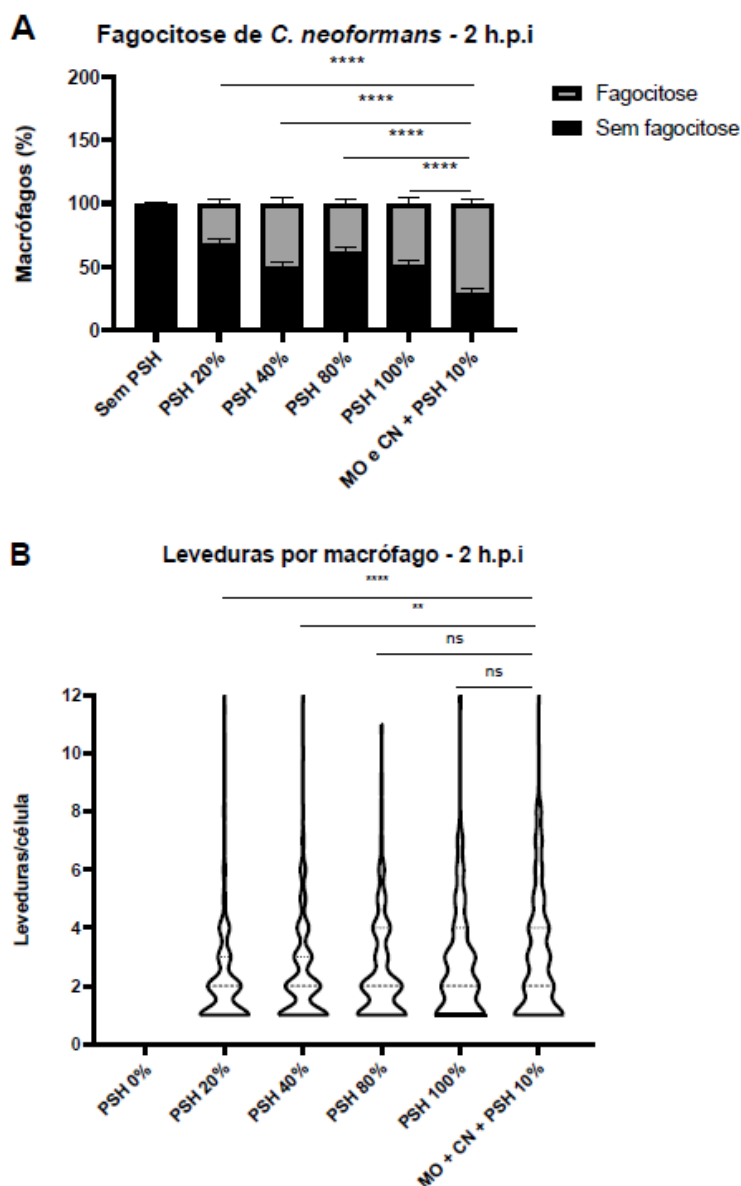
Foi analisado também o número de unidades formadoras de colônias (da sigla em inglês, CFU) a partir das leveduras recuperadas que foram internalizadas por macrófagos após sua lise, a fim de corroborar os dados obtidos por coloração de panótico por intermédio de outra técnica. Como pode-se observar na **Figura 18**, não houve diferença no log de CFU das leveduras fagocitadas quando incubadas com diferentes concentrações de soro fresco ou congelado. Mas há apenas uma ligeira diminuição no log de CFU de leveduras fagocitadas na presença do mAb 18b7. Portanto, os dados de CFU reiteram os dados obtidos com a coloração de panótico e contagem e sugere com mais consistência que não há diferença na fagocitose de *C. neoformans* quando este é opsonizado com soro fresco ou congelado, independente da concentração destes.



**Figura 18. Unidades formadoras de colônia (CFU) de leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem internalizadas por macrófagos sob diferentes agentes opsonizantes.**

Interação de macrófagos com leveduras *C. neoformans* selvagem por 2h na presença de soro humano fresco ou congelado nas concentrações de 5, 10, 25, 50 ou 75% ou na presença de mAb a 2,5; 5; 10; 20 e 40 ug/mL. As leveduras extracelulares foram lavadas e os macrófagos foram lisados a fim das leveduras intracelulares serem liberadas e plaqueadas em placas de Petri contendo meio Saboraud-ágar 1,5%. Placas então foram incubadas por 48h a 37°C e colônias formadas foram contadas em triplicata para cada condição a fim de se determinar o log de CFU. Gráficos em barras representando a média e o erro padrão do Log<sub>10</sub> de CFU de 3 réplicas dentro do mesmo experimento.

Além disso, também foi avaliado se haveria fagocitose das leveduras de *C. neoformans* pelos macrófagos derivados de THP-1 se essas fossem opsonizadas anteriormente com o PSH ao invés de presente na cultura no momento da interação (pré-opsonização), visto que haveria experimentos posteriores em que o soro humano não poderia ser adicionado ao meio para recuperação do sobrenadante. Observou-se que a opsonização prévia de *C. neoformans* com diferentes concentrações de PSH por 30 min a 37°C antes da interação com macrófagos permitiu sua fagocitose, comparando com a condição sem PSH. Porém, opsonizar o fungo antes causou uma menor taxa de fagocitose quando comparado com o fungo sendo opsonizado no momento da interação com 10% de PSH, conforme pode ser visualizado na figura 19.



**Figura 19. Proporção de macrófagos contendo leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem internalizadas (fagocitose) ou não (sem fagocitose) e número de leveduras fagocitadas por macrófago.**

Leveduras de *C. neoformans* foram incubadas com meio RPMI contendo 0, 20, 40, 80 ou 100% de PSH por 30 min a 37°C antes da interação com macrófagos (pré-opsonização) por 2h. Após esse período, leveduras extracelulares foram lavadas e macrófagos foram corados com panótico. Pelo menos 100 macrófagos foram contados por condição e foi avaliado a proporção de macrófagos que haviam realizado fagocitose das leveduras ou não (A) e o número de leveduras internalizadas por cada macrófago que realizou fagocitose (B). Leveduras também foram interagidas com macrófagos contendo 10% de PSH no momento da interação, onde não houve pré-opsonização, como controle. Gráficos de barras demonstrando a média e o erro padrão da percentagem de macrófagos que realizaram ou não fagocitose (A) e gráfico de violino mostrando distribuição e mediana do número de leveduras fagocitadas por cada macrófago de 3 réplicas dentro do mesmo experimento. Diferença entre grupos analisadas pelo teste exato de Fisher comparando grupos par a par (A) e de Kruskal-Wallis não pareado com pós-teste de Dun (B), comparando todas as condições com a controle (MO + CN + PSH 10%). Asteriscos representam valor de significação de P, estabelecendo  $\alpha$  como 0,05. \* =  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns = não significativo.

Ao avaliar o número de leveduras por macrófago, é possível notar que não há diferença significativa em opsonizar as leveduras previamente a interação com 80 e 100%

de PSH quando comparado com a presença de 10% de PSH à cultura no momento da interação. Pode-se concluir então que utilizar o PSH como agente opsonizante no momento da interação aumenta a proporção de macrófagos que fagocitaram as leveduras de *C. neoformans*, mas usando 80-100% de PSH para opsonizar as leveduras antes da interação, não altera o número de leveduras fagocitadas por macrófago. Portanto, para ensaios em que o soro humano pode conferir um empecilho para a análise, é preferível opsonizar as leveduras com 80-100% de PSH, pois apesar de menor, ainda permite a fagocitose de forma significativa.

#### **5.1.4. Viabilidade de macrófagos-THP-1 e leveduras de *C. neoformans* na presença de PSH**

Usando o PSH para a opsonização de leveduras juntamente com os macrófagos e devido ao fato de o trabalho propor análise de morte das células hospedeiras pelo agente etiológico em estudo, surgiu a dúvida se o PSH poderia interferir na viabilidade tanto das leveduras de *C. neoformans* quanto de macrófagos, portanto, podendo produzir um artefato nas análises. Pelo fato de o soro ser rico em proteínas do sistema complemento e essas não terem sido inativadas ao longo do processo, além do fato de não ser autólogo, essas poderiam ser tóxicas para células humanas.

A fim de investigar essa questão, foi avaliado se as diferentes concentrações de PSH testadas anteriormente seriam capazes de diminuir a viabilidade de *C. neoformans* da cepa H99 selvagem. Então após a incubação das leveduras com as distintas concentrações de PSH por 30 min a 37°C, as leveduras foram plaqueadas em placas de Petri com meio Saboraud-ágar 1,5% e incubadas por 2 dias a 37°C para observar a formação de colônias e contagem de unidades formadoras de colônia. Pode-se notar que não há diferença de CFU de *C. neoformans* H99 selvagem incubadas com diferentes concentrações de PSH por 30 min a 37°C, portanto, o soro humano não alterou a viabilidade das leveduras mesmo em diferentes concentrações de PSH, conforme é mostrado na **Figura 20**.

## CFU *C. neoformans* H99 em PSH - 30 min

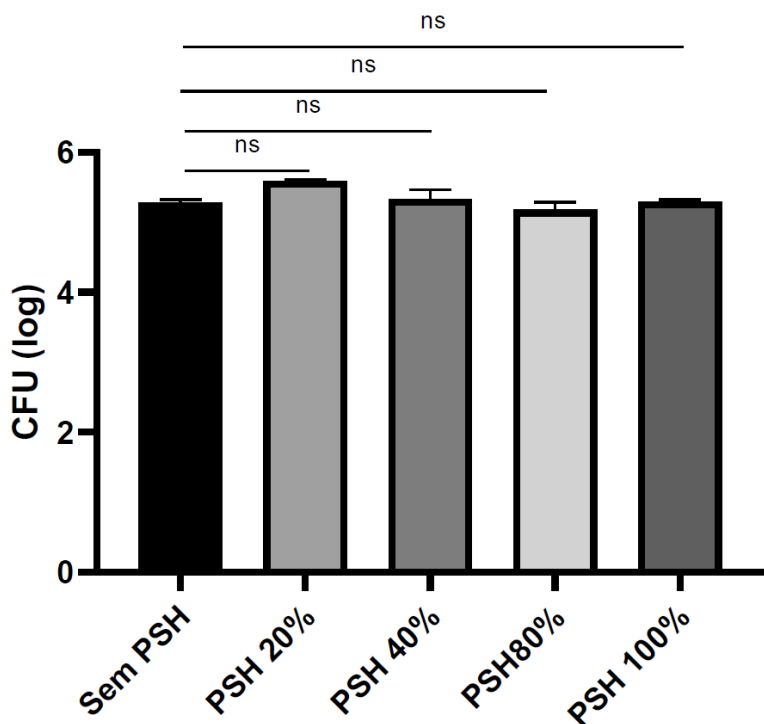
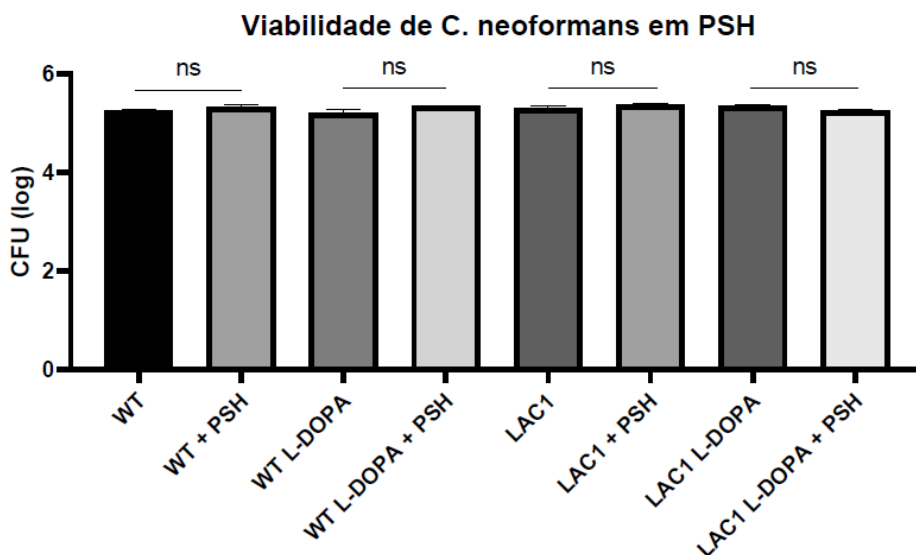


Figura 20. Viabilidade de *C. neoformans* H99 selvagem incubado em diferentes concentrações de PSH por 30 min.

Leveduras foram incubadas com meio RPMI contendo 0, 20, 40, 80 e 100% PSH por 30 min a 37°C, 150 rpm. Após esse período, leveduras foram diluídas e inoculadas em cerca de 10-50 uL/placa e espalhadas em placa contendo meio Saboraud-ágar 1,5%. As placas foram incubadas a 37°C por 48h. Após esse período, número de colônias que surgiram nas placas foram contadas e foi determinado  $\log_{10}$  de CFU de cada condição. Gráfico de barras representando a média e o erro padrão do log de CFU de 3 réplicas de cada condição dentro do mesmo experimento. Diferenças de log de CFU entre os diferentes grupos foram analisados com teste ANOVA não pareado two-tailed com pós-teste de Dunn, comparando todos os grupos com a condição controle (sem PSH), estabelecendo  $\alpha$  como 0,05. \* =  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ;  $p < 0,0001$ ; ns = não significativo.

Também foi avaliado se essa viabilidade de *C. neoformans* com PSH poderia ser influenciada pela presença da melanina e da LAC1 na concentração que foi definida anteriormente como a que promove melhor fagocitose (100%). Foi notado que a presença da melanina assim como da LAC1 também não interferiram na viabilidade das leveduras na presença de PSH, como foi ilustrado na **Figura 21**. Após essas análises, poder-se-ia garantir que diferenças na taxa de fagocitose, de morte e formação de inflamassomas dos experimentos posteriores seriam provavelmente pelas variáveis de interesse estudadas aqui neste trabalho e não estariam atreladas à viabilidade do patógeno.

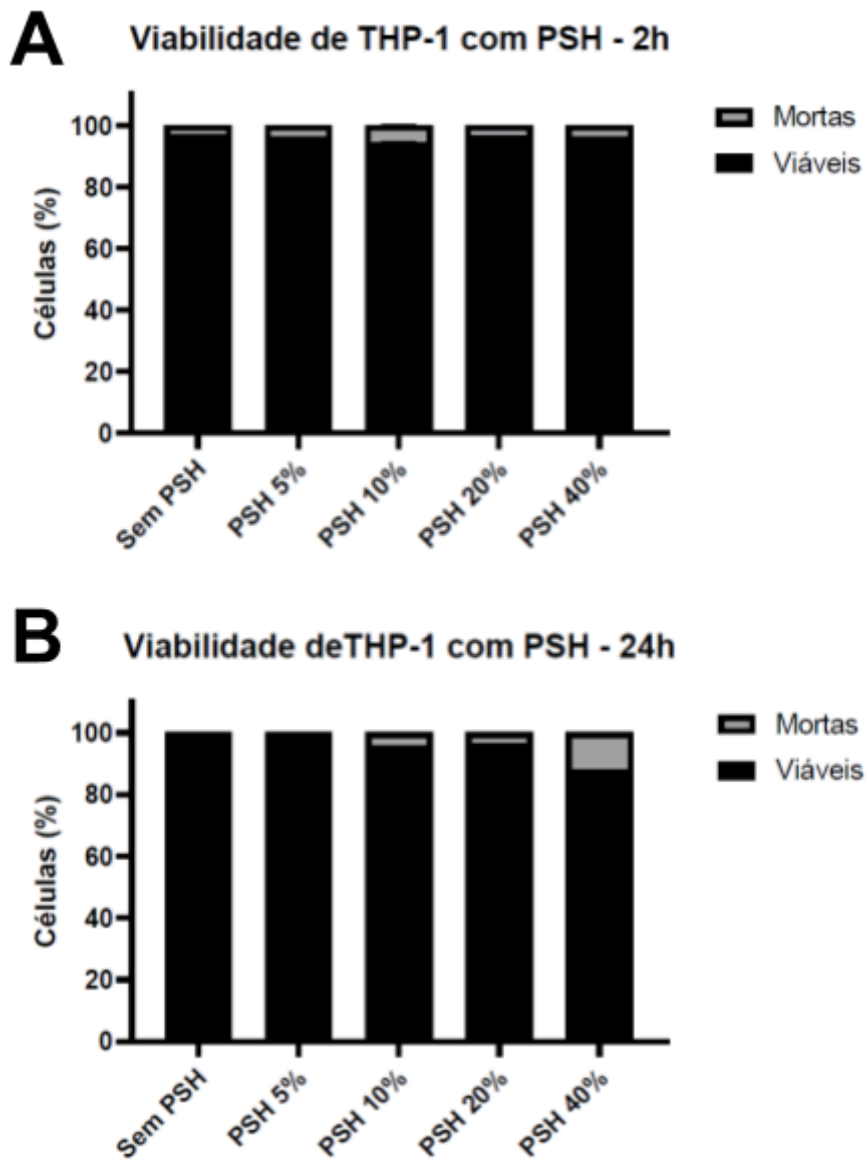




**Figura 21. Viabilidade de *C. neoformans* H99 selvagem ao PSH na presença de melanina e LAC1.**

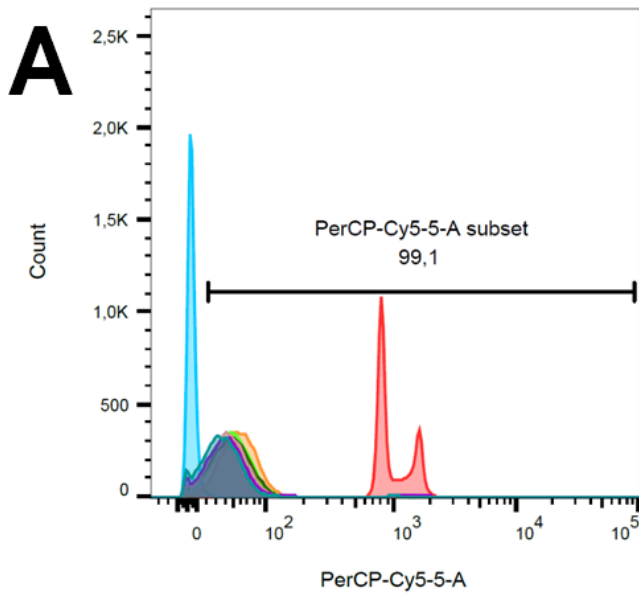
Leveduras de *C. neoformans* WT e deficientes em LAC1 foram incubadas em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por 24h. Após esse período, as leveduras foram incubadas em PSH 100% por 30 min a 37°C. Depois as leveduras foram diluídas para 1000 leveduras/ mL e inoculadas 50 uL/ placa contendo meio Saboraud-ágar 1,5%. As placas foram incubadas a 37°C por 72h. Após esse período, número de colônias que surgiram nas placas foram contadas e foi determinado o log<sub>10</sub> de CFU de cada condição. Gráfico de barras representando a média e o erro padrão do log de CFU de 3 réplicas de cada condição dentro do mesmo experimento. Diferenças de CFU entre os diferentes grupos foram analisados com teste T de Student não pareado two-tailed comparando cada condição par a par com e sem PSH. Valores de P calculados estabelecendo  $\alpha$  como 0,05. \* =  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ;  $p < 0,0001$ ; ns = não significativo.

Além disso, foi analisada a provável interferência do PSH na viabilidade dos monócitos THP-1 e macrófagos, avaliados por coloração de Azul de Tripán e exclusão de células viáveis (**Figura 22**) e mortas e por 7-AAD através de citometria de fluxo (**Figura 23** e **Figura 24**). O 7-AAD é uma sonda que fluoresce ao se ligar ao DNA, entretanto este só consegue entrar na célula e alcançar seu DNA se houver perda de integridade de membrana, pois não é permeável a camada fosfolipídica. Com exceção da concentração de 40% de PSH após 24h, não houve morte aumentada nas diferentes concentrações de PSH em THP-1 tampouco em seus macrófagos, tanto na citometria de fluxo quanto na viabilidade por coloração com Azul de Tripán (análise feita apenas para THP-1). Como foi escolhido 10% de PSH para os experimentos, essa concentração ainda se mostrou segura para ser utilizada nos ensaios de interação sem alterar viabilidade de células hospedeiras nem dos patógenos.

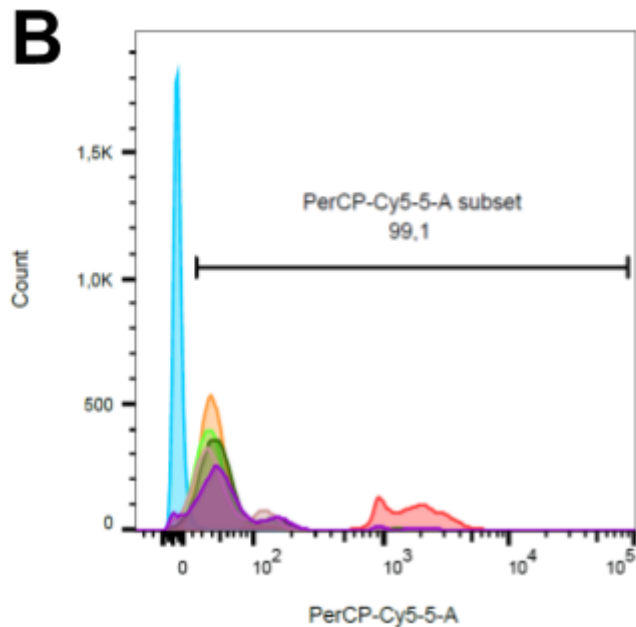


**Figura 22.** Porcentagem de células THP-1 vivas e mortas após incubação por 2 e 24h com PSH em diferentes concentrações.

Macrófagos foram incubados com diferentes concentrações de PSH (0, 5, 10, 20 e 40%) por 2h (A) e 24 h (B) e analisadas através da técnica de exclusão por azul de Tripán, onde células azuis foram consideradas mortas e células refringentes, sem coloração, foram consideradas vivas dentro do número total de células contadas por condição. Gráficos de barras referente a média e erro padrão de três réplicas do mesmo experimento.



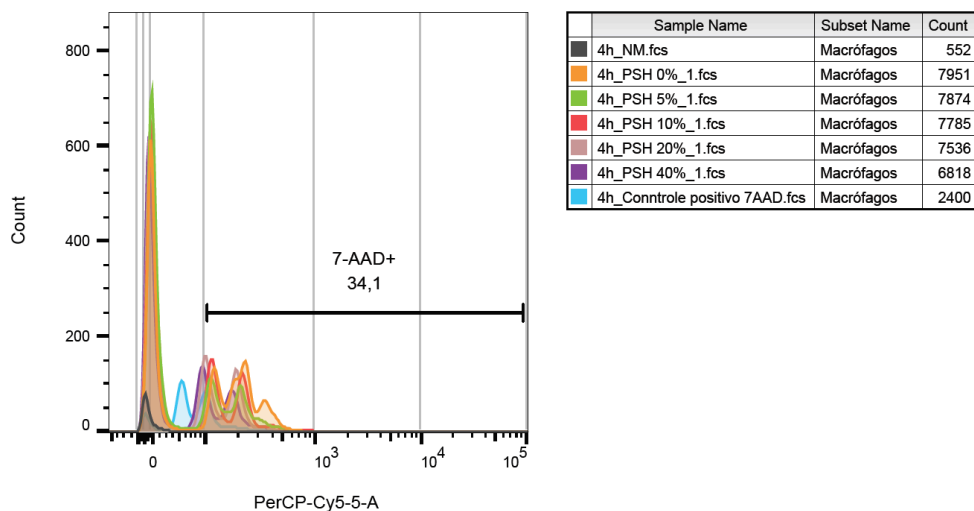
	Sample Name	Subset Name	Count
■	2h_THP-1_PHS 40%_2.fcs	THP-1	9118
■	2h_THP-1_PHS 40%_1.fcs	THP-1	9046
■	2h_THP-1_PHS 20%_1.fcs	THP-1	9237
■	2h_THP-1_PHS 10%_1.fcs	THP-1	9230
■	2h_THP-1_PHS 5%_1.fcs	THP-1	9231
■	2h_THP-1_PHS 0%_1.fcs	THP-1	9167
■	2h_THP-1_NM.fcs	THP-1	9365
■	2h_THP-1_Controle positivo.fcs	THP-1	9054



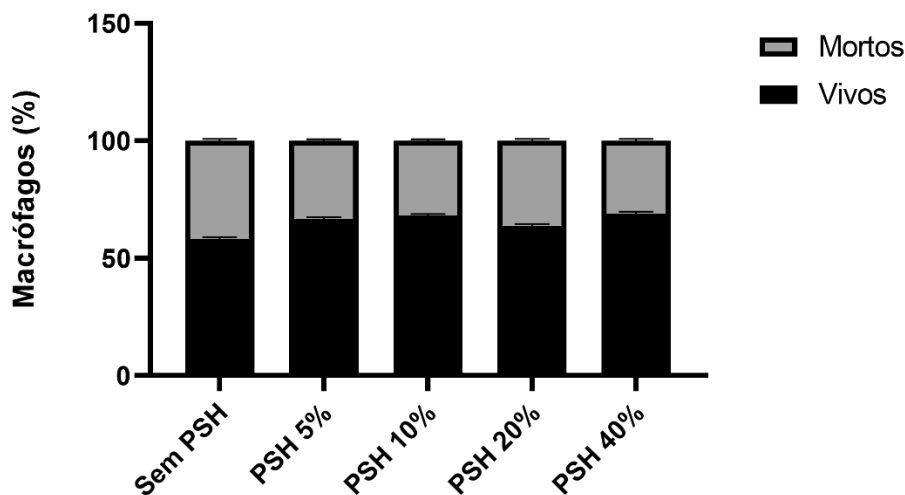
	Sample Name	Subset Name	Count
■	24h_THP-1_PHS 40%_1.fcs	THP-1 24h	7721
■	24h_THP-1_PHS 20%_1.fcs	THP-1 24h	8342
■	24h_THP-1_PHS 10%_1.fcs	THP-1 24h	8920
■	24h_THP-1_PHS 5%_1.fcs	THP-1 24h	9144
■	24h_THP-1_PHS 0%_1.fcs	THP-1 24h	9578
■	24h_THP-1_NM.fcs	THP-1 24h	9523
■	24h_THP-1_Controle positivo.fcs	THP-1 24h	5103

**Figura 23. Número de células THP-1 mortas após incubação com PSH.**

Células THP-1 foram incubados com 5, 10, 20 e 40% de PSH ou sem por 2 (A) e 24h (B), coradas com 7-ADD e analisadas por citometria de fluxo. Histogramas mostrando número de células fluorescente ou não para 7-AAD (PerCP-Cy5-5) referentes à um ensaio representativo.



### Macrófagos com PSH - 4h



**Figura 24. Número de macrófagos derivados de THP-1 mortos após incubação com PSH por 4h.**

Macrófagos foram incubados com 5, 10, 20 e 40% de PSH ou sem por 4h, corados com 7-ADD e analisados por citometria de fluxo. Histogramas mostrando número de células fluorescentes ou não para 7-AAD (PerCP-Cy5-5) referentes à um ensaio representativo (A). Porcentagem de macrófagos vivos (7-AAD-) e mortos (7-AAD+) em diferentes concentrações de PSH (B). Gráfico de barras mostrando média e erro padrão das réplicas realizadas do mesmo experimento.

## 5.2. Influência da melanina e LAC1 de *C. neoformans* na sua fagocitose por macrófagos de THP-1

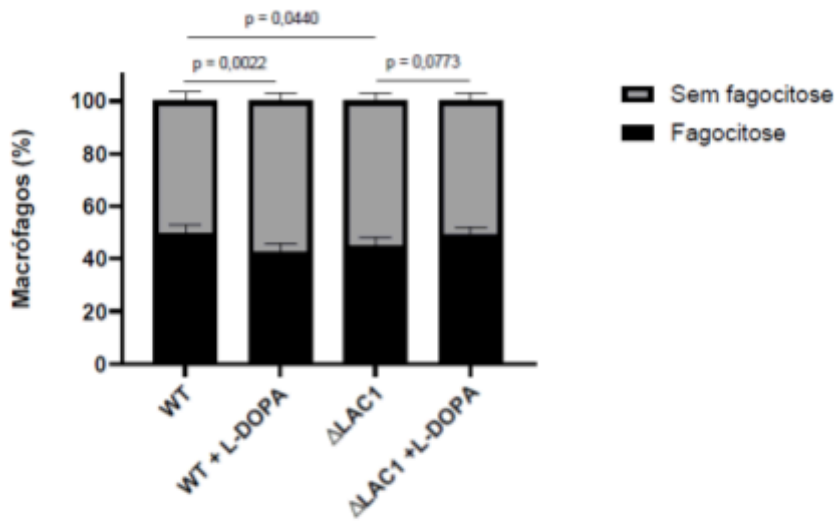
Depois de padronizada a diferenciação dos macrófagos, a melanização das cepas H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1, o agente opsonizante na concentração mais adequada, condições para sua interação, o próximo passo foi avaliar se haveria diferença na fagocitose de leveduras que produziam melanina ou na ausência de LAC1. Para isso ,

leveduras de *C. neoformans* selvagem e  $\Delta$ LAC1 foram cultivadas com e sem L-DOPA por 24h, e depois

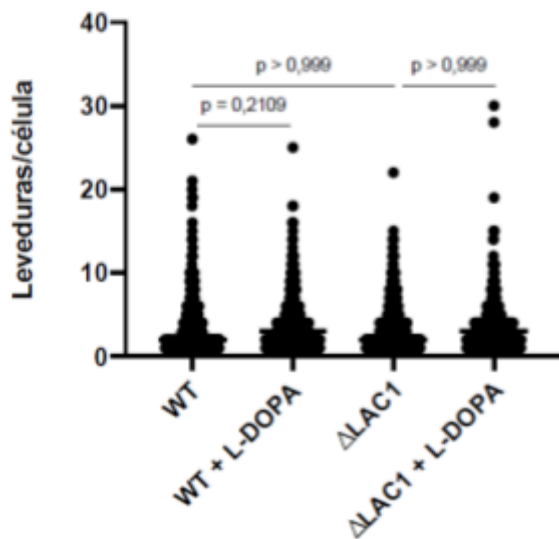
foram interagidas com macrófagos por 2 e 24h na presença de PSH 10%. Depois foi avaliado a proporção de macrófagos que internalizaram leveduras, assim como também quantas leveduras foram fagocitadas por cada macrófago. Observa-se na **Figura 25**

que houve menos fagocitose de leveduras por macrófagos após 2h de interação na presença de melanina, assim como na ausência de LAC1 ( $\Delta$ LAC1), mas não houve diferença na quantidade de leveduras internalizadas por cada macrófago que realizou fagocitose em nenhuma das condições analisadas. Como era esperado, a fagocitose foi praticamente abolida sem a presença de PSH como agente opsonizante, independente de melanina e LAC1, conforme é mostrado na **Figura 26**, e não houve diferença de fagocitose na presença de melanina e LAC1 quando não há um agente opsonizante. Portanto, nem a melanina nem a LAC1 interferiram na deposição de complemento e na sua respectiva opsonização.

## A Fagocitose de *C. neoformans* - 2 h.p.i



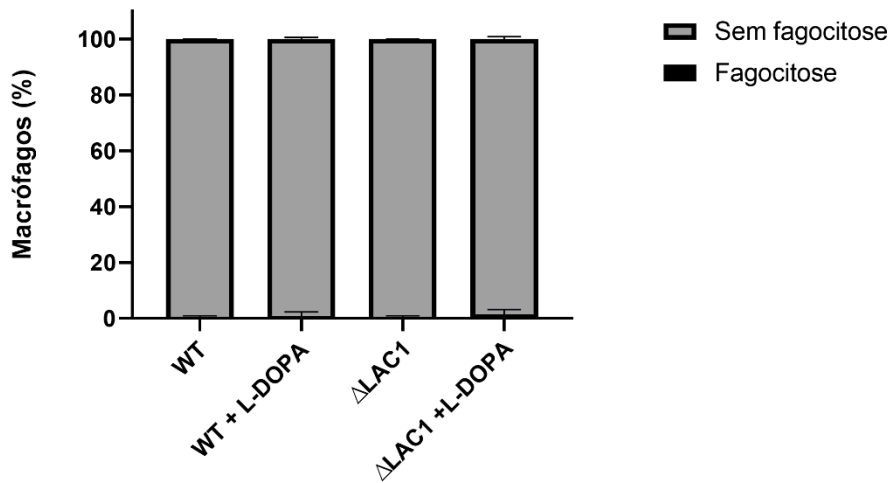
## B Leveduras por célula - 2 h.p.i



**Figura 25. Porcentagem de macrófagos que fagocitaram leveduras de *C. neoformans* que produzem ou não melanina e LAC1 e número de leveduras por macrófago na presença de PSH.**

Leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas ou não com L-DOPA por 24h e depois foram interagidas com macrófagos de THP-1 na presença de PSH 10% por 2h, MOI 10. Depois, leveduras extracelulares foram lavadas e macrófagos corados com panótico e visualizadas sob microscopia óptica. Ao menos 100 macrófagos foram contados por cada réplica de cada condição e a porcentagem de macrófagos que tinha leveduras internalizadas ou não foram aferidas (A) Gráficos de barras representando média e erro padrão de três réplicas referentes a três réplicas de dois experimentos realizados em dias distintos. Número de leveduras por macrófagos que realizou fagocitose (B) Gráfico de dispersão mostrando cada macrófago analisado e quantas leveduras cada um havia internalizado. Valores de P referentes ao teste de exato de Fisher comparando duas condições por vez (A) e teste de Kruskal- Wallis com pós-teste de Dunn duas caudas não- pareados para o número de leveduras/macrófagos (B). Análise estatística referente a três experimentos independentes realizados em dias diferentes.

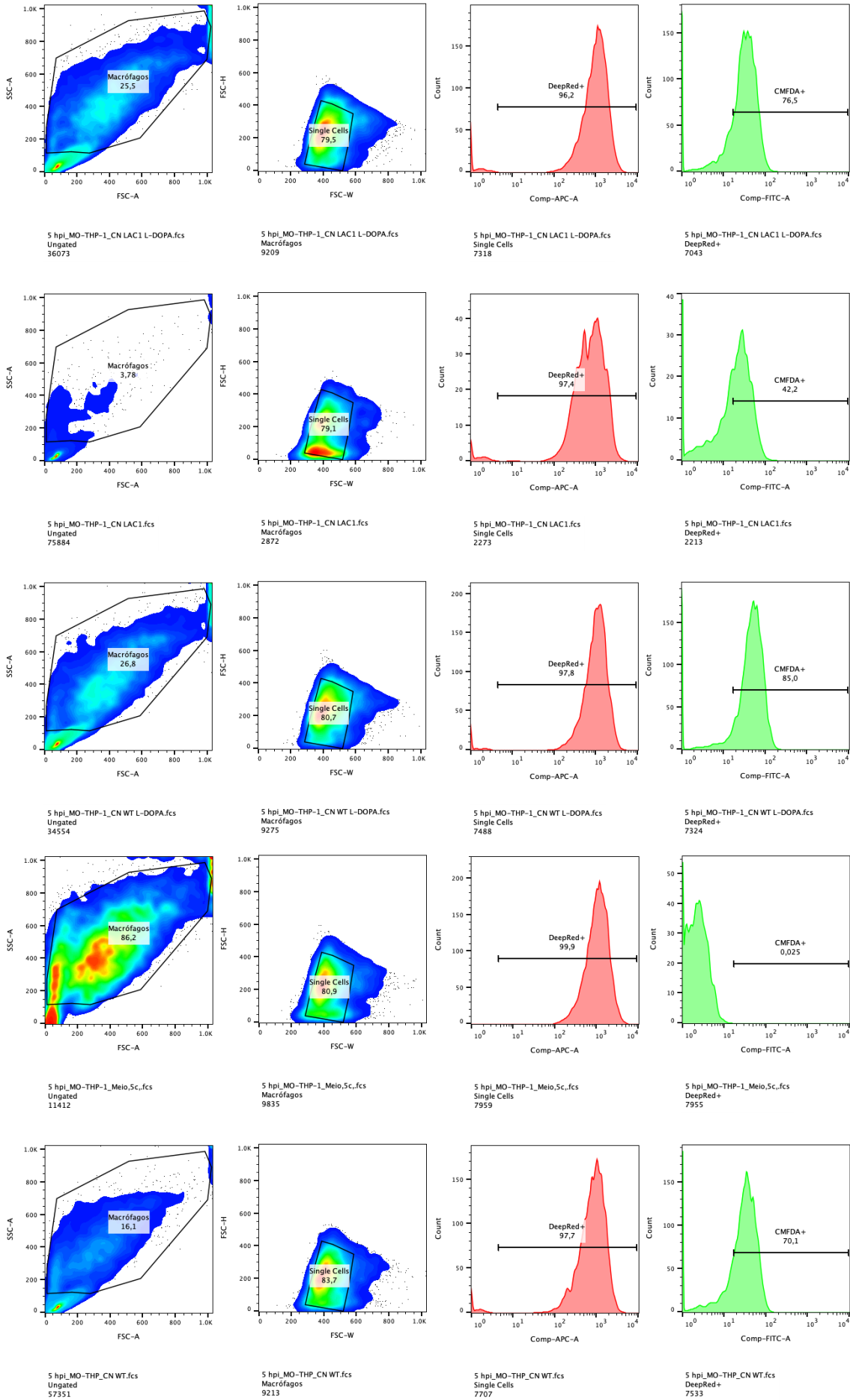
### Fagocitose de *C. neoformans* (sem PSH) - 2 h.p.i



**Figura 26. Porcentagem de macrófagos que fagocitaram leveduras de *C. neoformans* que produziam ou não melanina e LAC1 na ausência de PSH.**

Leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas ou não com L-DOPA por 24h e depois foram interagidas com macrófagos de THP-1 na ausência de PSH por 2h, MOI 10. Depois, leveduras extracelulares foram lavadas e macrófagos corados com panótico e visualizadas sob microscopia óptica. Ao menos 100 macrófagos foram contados por cada réplica de cada condição e a porcentagem de macrófagos que tinham leveduras internalizadas ou não foram aferidas.

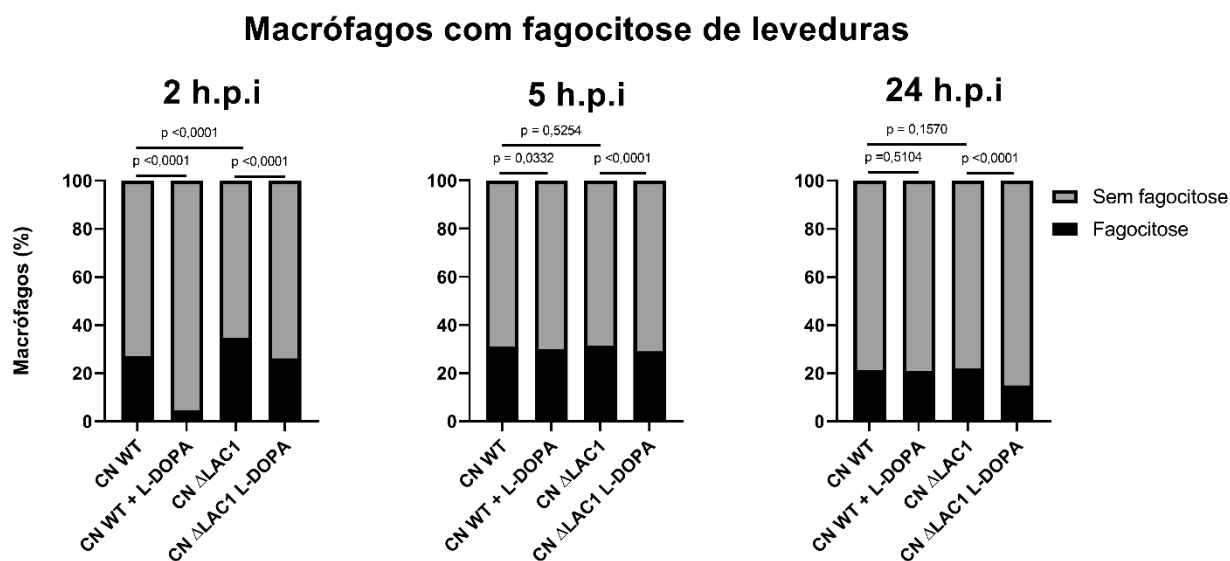
Também foi analisada a fagocitose das leveduras por meio de citometria de fluxo. Para isso, os macrófagos foram corados com CellTracker Deep Red 1 uM 48h antes da infecção e foram usadas leveduras de *C. neoformans* H99 previamente corados com CMFDA 2 uM. Depois disso, macrófagos e leveduras foram interagidos. Após 2, 5 e 24 h.p.i, os macrófagos foram recuperados, adquiridos e analisados por citometria de fluxo. A estratégia para definir as populações a serem analisadas e os resultados estão resumidos na **Figura 27**. Como pode ser notado, a presença de melanina reduziu o número de macrófagos que fagocitaram as leveduras de *C. neoformans* nas horas iniciais da infecção, entretanto, quase não há diferença na proporção de fagocitose em períodos mais tardios. A presença da melanina reduziu drasticamente a fagocitose, comparando a presença de LAC1. A melanina parece retardar a fagocitose de *C. neoformans*, mas não impedi-la





**Figura 27. Estratégia de definição de população para MO-THP1 e definição de MO-THP1 infectados com leveduras de *C. neoformans* ou não.**

Leveduras de *C. neoformans* cepa H99 selvagem (WT) e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas na ausência ou na presença de L-DOPA por 24h em meio mínimo, 37°C, 150 rpm. Depois essas leveduras foram coradas com CellTracker CMFDA por 30 min, 37°C e foram interagidas com MO-THP1 previamente corados com CellTracker Depp Red, MOI 10, por 2, 5 e 24h. Após esse período as leveduras extracelulares foram lavadas e os macrófagos foram recuperados e adquiridos por citômetro de fluxo. Os dados foram analisados pelo software FlowJo, onde primeiramente os dados foram compensados para cada canal de fluorescência analisado usando seus respectivos controles. Depois, o gate referente aos macrófagos foram definidos em amostra cotendo apenas essas células no gráfico de FSC x SSC. Afim de descartar eventos que não fossem únicos para não enviesar a análise, foi determinado o gate de células únicas para ser analisado. Então, foi criada uma gate dentro das células únicas referentes as células positivas para CellTracker Deep Red a partir de uma amostra contendo macrófagos não corados com esse corante. Das células Deep Red+, foi criado um gate de macrófagos positivos para CMFDA+ a partir de uma amostra de células não contendo o corante. Com isso, conseguiu se determinar a porcentagem de células CMFDA+, ou seja, que haviam fagocitado leveduras.

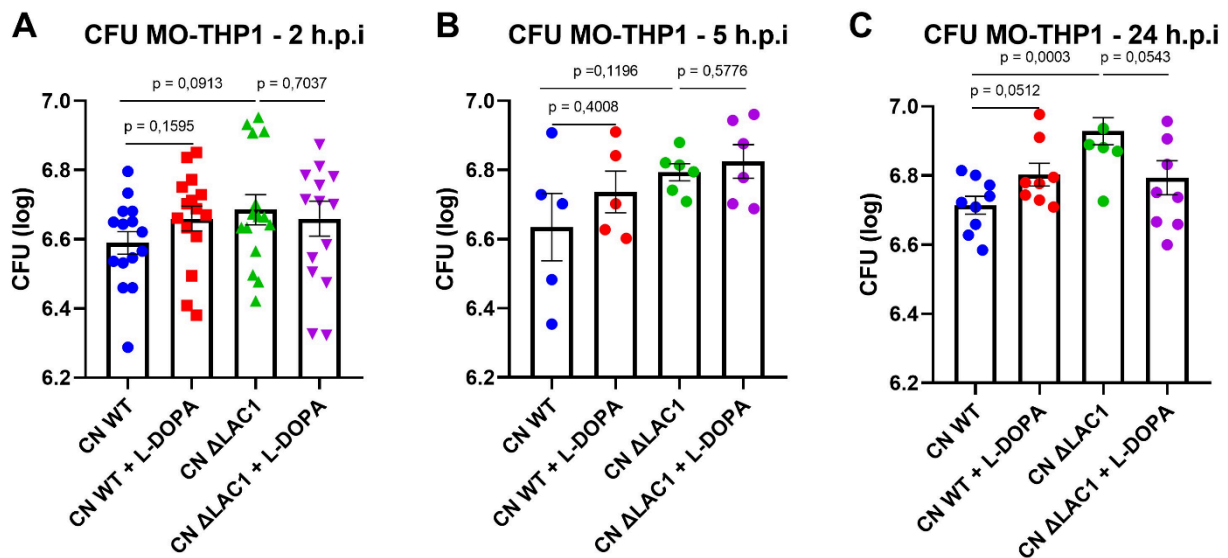


**Figura 28. Fagocitose de leveduras de *C. neoformans* H99 na presença ou ausência de melanina e LAC1 por MO-THP1 através de citometria de fluxo em 2, 5 e 24 h.p.i.**

Porcentagem de MO-THP1 com ou sem leveduras de *C. neoformans* definidos a partir da estratégia de gates adotada na **Figura 27**. Gráficos de barras representando porcentagem de macrófagos que realizaram ou não fagocitose de leveduras em 2, 5 e 24 h.p.i referente a soma do número de eventos de 3 experimentos realizados em dias diferentes. Valor de p calculado por teste exato de Fisher comparando duas condições por vez.

A fim de analisar se a presença da melanina e da LAC1 interferem na sobrevivência das leveduras fagocitadas, foi contabilizado o número de leveduras viáveis de *C. neoformans* internalizadas pelos macrófagos, após estes serem lisados e as leveduras liberadas de dentro deles serem plaqueadas para se determinar o CFU após 48h a 37° C. Pode-se notar que apesar de ter sido averiguado anteriormente que a melanina reduziu a fagocitose em cerca de 4 vezes após 2 h.p.i no ensaio anterior (**Figura 28**), não foi visto uma redução significativa no CFU de leveduras que produziram melanina, mostrado na **Figura 29**, o que poderia ser esperado. Além disso, nota-se um

aumento da sobrevivência de leveduras com melanina nas horas tardias de infecção (24 h.p.i), quase se mostrando significativo, com valor de P muito próximo a 0,05. Já em relação a presença da LAC1, esta parece ter diminuído a sobrevivência das leveduras em períodos tardios da infecção, visto que a fagocitose não foi muito alterada (**Figura 29**), mas a sobrevivência foi consideravelmente afetada quando há LAC1.



**Figura 29. Sobrevivência de *C. neoformans* H99 na presença ou ausência de melanina e LAC1 fagocitados por macrófagos derivados de THP1 após 2, 5 e 24 h.p.i.**

Leveduras de *C. neoformans* (CN) H99 WT e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas com ou sem L-DOPA por 24h, 37° C, 150 rpm. Depois dessas leveduras foram usadas para infectar macrófagos derivados de THP-1, MOI 10, por 2 (A), 5 (B) e 24 h (C). As leveduras extracelulares foram lavadas e os macrófagos foram lisados para liberar as leveduras fagocitadas, que foram inoculadas em placa de Petri contendo Sabouraud-ágar. As placas então foram incubadas a 37C por 48h. Depois desses períodos, as colônias crescidas nas placas foram contadas e foi determinada o log CFU para cada condição. Gráficos de barras representando média de 12, 6 e 9 réplicas derivadas de 4, 2 e 3 experimentos feitos em dias diferentes, respectivamente para 2, 5 e 24 h.p.i. Barras de erro representam o erro padrão da média. Valores de P calculados usando teste T não pareado com análise nas duas caldas (two-tailed) para comparar dois grupos por vez.

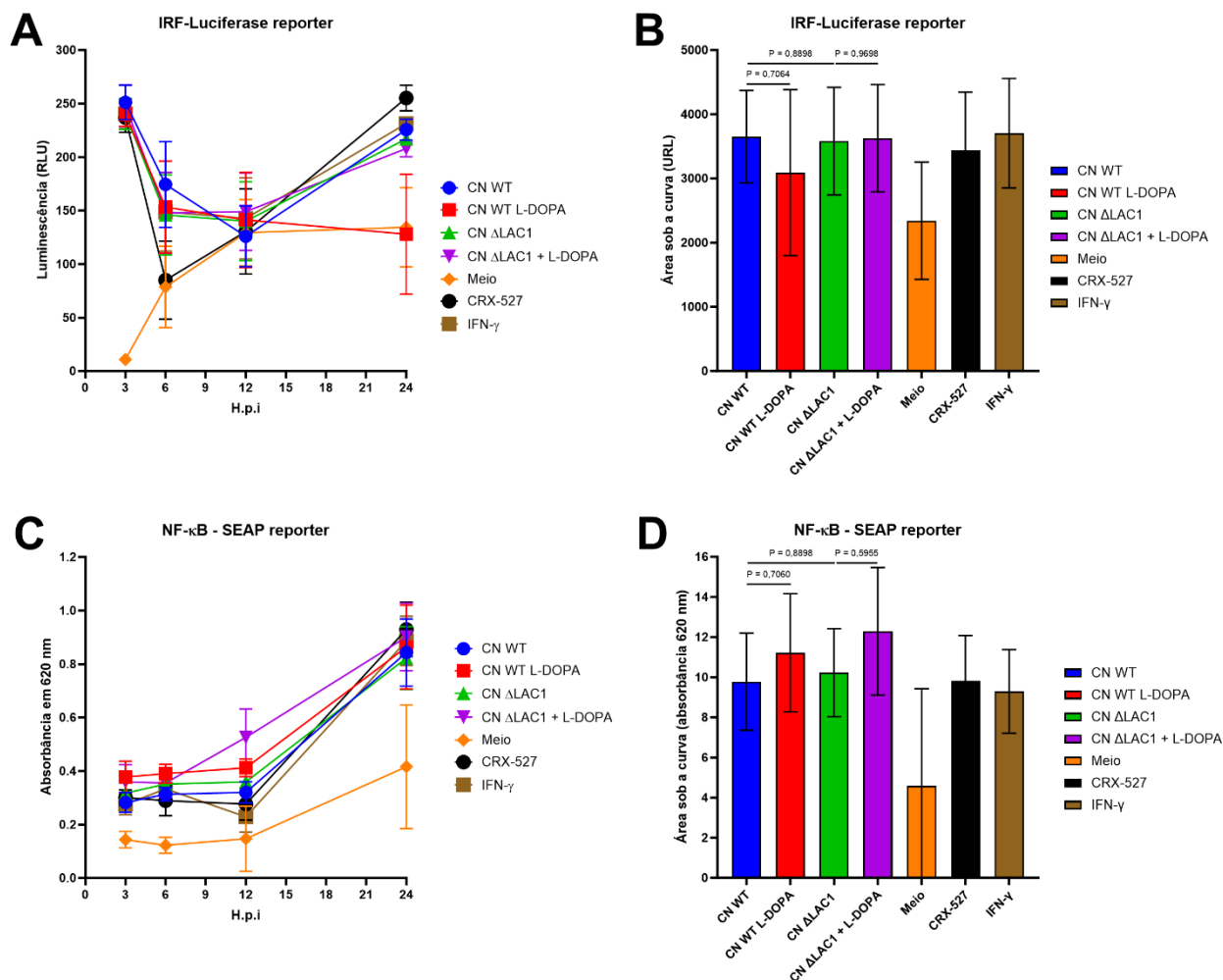
### 5.3. Reconhecimento e ativação da via do NF- $\kappa$ B e IRFs por *C. neoformans* e a interferência da melanina e da LAC1 nesses mecanismos

Visto que leveduras de *C. neoformans* estavam sendo fagocitadas conforme foi visualizado nos experimentos anteriores e tanto a melanina quanto a LAC1 interferiram nesse processo, nosso próximo questionamento era se a fagocitose desse patógeno conseguia promover a ativação de vias posteriores após reconhecimento. As vias mais clássicas que são ativadas após reconhecimento de PAMPs e patógenos, são as vias que ativam os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e os Fatores Regulatórios de Interferon (IRFs, da sigla em inglês para *interferon regulatory factors*). Esses fatores de transcrição então se

deslocam para o núcleo e permitem a expressão e produção de citocinas com ações anti-inflamatórias e antivirais (HISCOTT, 2007; NEGISHI, TANIGUCHI & YANAI, 2018).

A fim de observar se essas duas vias são ativadas e se a melanina e a LAC1 de *C. neoformans* poderiam interferir nestas células THP1-Dual (que possuem genes repórteres para a via do NF- $\kappa$ B e IRFs, produzindo enzimas que convertem substratos que podem ser analisados por absorvância e luminescência, respectivamente) foram usadas para a diferenciação em macrófagos e posterior interação com as leveduras. Ao avaliar a infecção de macrófagos derivados de THP-1-Dual com leveduras de *C. neoformans* selvagem e LAC1, podemos observar que o fungo causou tanto um aumento na ativação de NF- $\kappa$ B como de IRF, mas com cinéticas distintas, onde a ativação de IRF foi mais precoce, sendo observada maior ativação em 3 h.p.i e caindo ao longo do tempo, enquanto NF- $\kappa$ B apresentou uma ativação mais tardia, apresentando uma ativação maior do que as células não infectadas nas primeiras horas, mas apresentando uma ativação muito exacerbada após 24 de infecção, como é observado na **Figura 30**. A molécula CRX-527 e a citocina IFN- $\gamma$  foram usadas de estímulo como controles positivos para a ativação da via do NF- $\kappa$ B e do IRF, respectivamente.

A presença da melanina parece diminuir a ativação da via de IRF apenas na infecção mais tardia (24 h.p.i), se assemelhando a ativação vista em macrófagos sem infecção (meio), já a presença de LAC1 não interferiu nesses mecanismos de ativação.



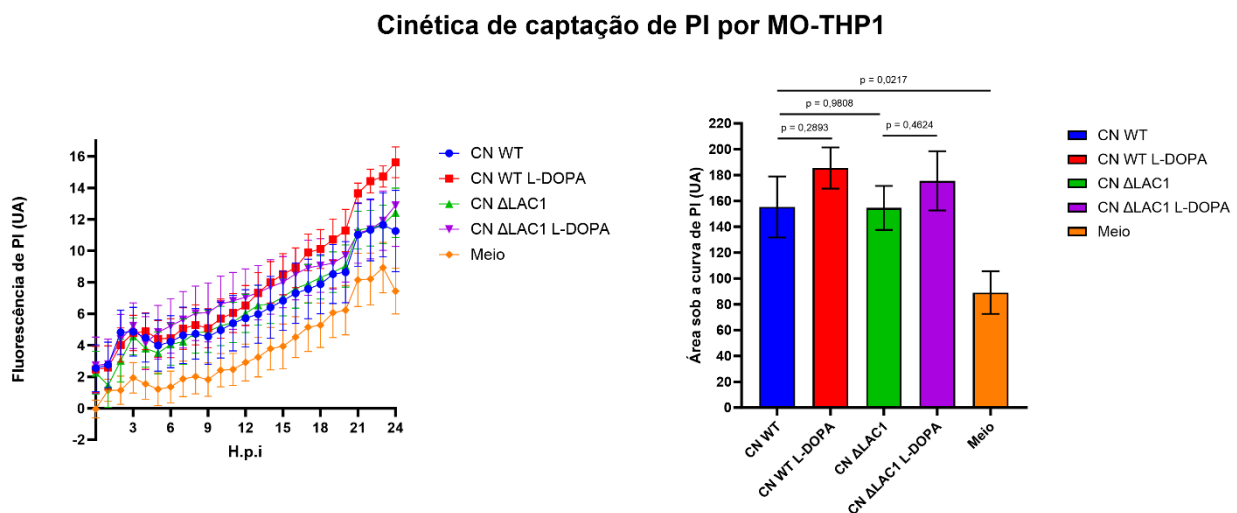
**Figura 30. Ativação da via do NF-κB e IRFs por MO-THP1 infectados com *C. neoformans* e influência da melanina e da LAC1 no processo.**

Macrófagos foram diferenciados a partir de THP-1-Dual contendo gene repórteres para a via do NF-κB associado a fosfatase alcalina embrionária secretada (SEAP, da sigla em inglês para *secreted embryonic alkaline phosphatase*) ao mesmo promotor e para a via dos IRFs sobre o controle do promotor ISG54, também contendo a sequência para expressão e produção de Lucia luciferase. Em paralelo, leveduras de *C. neoformans* H99 WT e  $\Delta$ LAC1 foram cultivadas em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por cerca de 24h, 37°C, 150 rpm. Depois macrófagos e *C. neoformans* foram interagidos por 24h e sobrenadante dos períodos de 3, 6, 12 e 24 h.p.i foram coletadas para avaliação da atividade de SEAP e Lucia Luciferase, interagindo o sobrenadante com o substrato quanti-Blue e quanti-Luc, respectivamente. A conversão de quanti-Blue foi medida pela absorbância em 620 nm e a de quanti-Luc através de luminescência em todos os comprimentos de onda. Gráficos de linhas representam a média e o erro padrão de valores de luminescência para quanti-Luc (A) e de absorbância a 620 nm para quanti-Blue (C) em 3, 6, 12 e 24 h.p.i. Gráficos de barras representam a média da área sob a curva dos gráficos de linhas anteriores, mostrando a atividade total de Lucia luciferase (B) e de SEAP (D) ao longo de 24 horas de infecção. CRX-527 e IFN- $\gamma$  foram usados como controles positivos para ativação de NF-κB e IRFs, respectivamente. Valores de P calculados a partir de teste T não-pareado de duas caldas comparando duas condições por vez. Dados referentes à 3 réplicas de 3 experimentos realizados em dias distintos.

## 5.4. Influência da melanina e LAC1 de *C. neoformans* na morte de macrófagos de THP-1

### 5.4.1 Cinética de morte por captação de iodeto de propídio (PI)

Após avaliar a taxa de fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos, foi averiguado se a infecção pelas leveduras ocasionaria a morte de macrófagos, assim como se a presença da melanina e de LAC1 poderiam interferir nesse processo. Foi avaliado a cinética de captação de iodeto de propídio (PI, da sigla em inglês para *iodide propidium*) por macrófagos controle e infectados por *C. neoformans* selvagem e  $\Delta$ LAC1 (previamente incubados com ou sem L-DOPA) por 24h, analisando a fluorescência de PI no intervalo de 1 hora. O PI é uma sonda que se liga e fluoresce na presença de DNA, porém esse só consegue se ligar ao DNA se houver algum comprometimento da membrana plasmática da célula hospedeira, caso contrário, o PI não consegue atravessar a célula, tampouco fluorescer. Como pode ser visto na **Figura 31**, a infecção com *C. neoformans* promoveu a maior morte de macrófagos quando comparado com os macrófagos controles. Porém, não foi possível notar diferença significativa na morte de macrófagos na presença de melanina ou LAC1 comparando toda morte do período de 24h, apesar de se observar um acréscimo de morte nas horas finais na presença de melanina quando comparado na sua ausência.



**Figura 31. Cinética de morte de macrófagos por *C. neoformans* H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1 por 24 horas.**

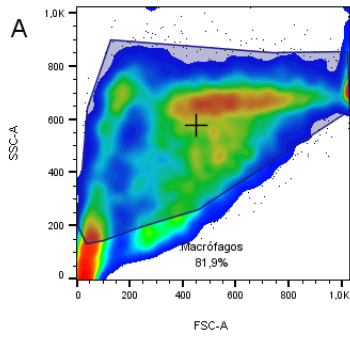
Leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem (WT) e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas com ou sem L-DOPA por 24h. Depois foram interagidas com macrófagos de THP-1 na presença de PSH 10%, MOI 10, por 24 horas em meio contendo iodeto de propídio (PI). Macrófagos contendo as leveduras foram incubados a 37°C em fluorímetro e a mensuração de fluorescência de PI era realizada a cada 1h. (A) Cinética de captação de PI por macrófagos infectados ou não por 24h. (B) Área sob a curva de fluorescência de PI captada por macrófagos ao longo de 24h para cada condição. Gráficos de barras representando média de 15 réplicas derivadas de 5 experimentos feitos em dias diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Valores de P calculados usando teste T não pareado com análise nas duas caldas (two-tailed) para comparar dois grupos por vez.

#### 5.4.2. Análise de morte por coloração com Anexina V-PE e 7-AAD

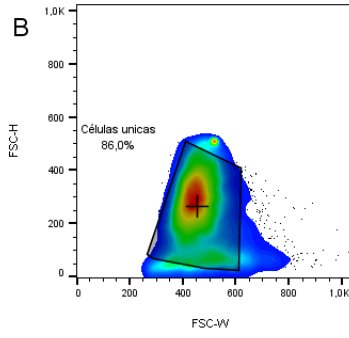
A fim de corroborar os dados da cinética de captação de PI, a morte de macrófagos infectados por *C. neoformans* por 24 h também foi averiguada por citometria de fluxo, analisando células positivas para 7-AAD (sonda fluorescente análoga ao PI), indicando morte celular. Também foi analisado com mais detalhes que tipo de morte celular poderia estar acontecendo e se haveria diferenças entre as condições de infecção. Foi analisado após a interação com *C. neoformans*, se os macrófagos estavam sofrendo apoptose ou morte lítica através da análise de células que eram positivas para anexina V-PE (apoptóticas) ou positivas para 7-AAD e 7-AAD + Anexina V-PE (morte lítica) pela aquisição em citometria de fluxo em 2, 5 e 24 h.p.i. A **Figura 32** mostra a estratégia de gates adotada para a análise de morte celular, já os resultados obtidos foram sumarizados na **Figura 33**.

Interessantemente, há um número maior de células viáveis na presença de *C. neoformans* nas horas iniciais de infecção, enquanto não há diferença em 5 h.p.i. Há um ligeiro aumento de morte em macrófagos em infecções mais tardias com *C. neoformans*, corroborando os dados de cinética de morte por PI. A presença da melanina de *C. neoformans* causou maior morte no início da infecção, porém, apresentou uma morte significativamente menor nos outros tempos analisados, apesar da diferença muito pequena. Já a presença de LAC1 não mostrou interferir na morte dos macrófagos, como pode ser notado na figura 33a.

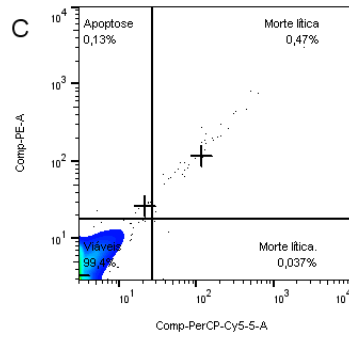
Em relação ao tipo de morte sofrido, é possível observar que há um aumento de apoptose dos macrófagos quando estes foram infectados com *C. neoformans* nos momentos iniciais (5 h.p.i) quando comparado às células controles, porém essa apoptose em células infectadas diminui ao longo do tempo até se tornar menor em estágios mais avançados da infecção (24 h.p.i), reduzindo mais da metade. A presença de melanina promoveu mais morte lítica em todos os tempos analisados. Já a presença de LAC1 promoveu maior apoptose nos momentos iniciais da infecção, porém a apoptose foi reduzida em períodos mais longos. Nos momentos mais tardios da infecção (24 h.p.i), a morte lítica é o tipo predominante, principalmente na presença da melanina e de LAC1 de *C. neoformans*.



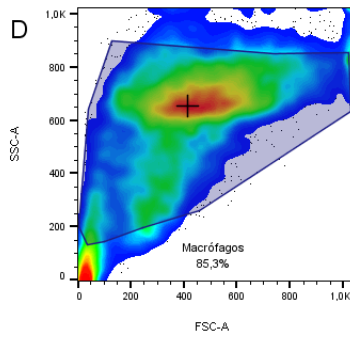
24 hpi\_25-8-22\_MO-THP1 NM.fcs  
Ungated  
11579



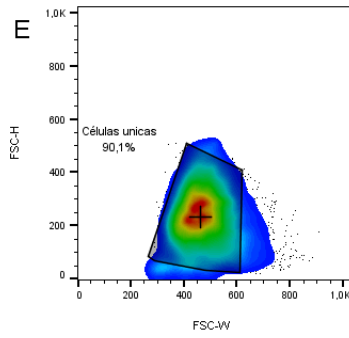
24 hpi\_25-8-22\_MO-THP1 NM.fcs  
Macrófagos  
9478



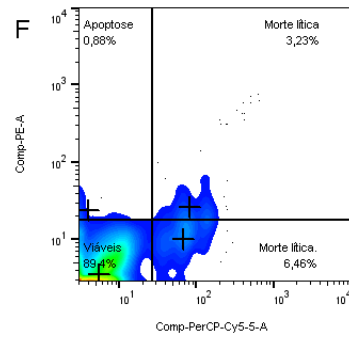
24 hpi\_25-8-22\_MO-THP1 NM.fcs  
Células unicas  
8152



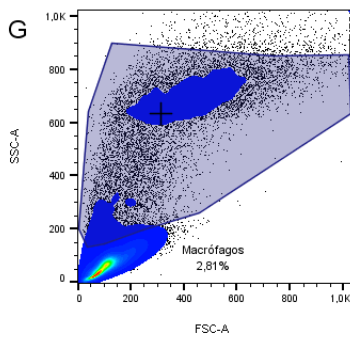
24 hpi\_25-8-22\_MO-THP CTR.fcs  
Ungated  
11803



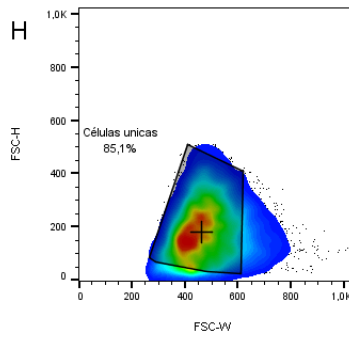
24 hpi\_25-8-22\_MO-THP CTR.fcs  
Macrófagos  
10063



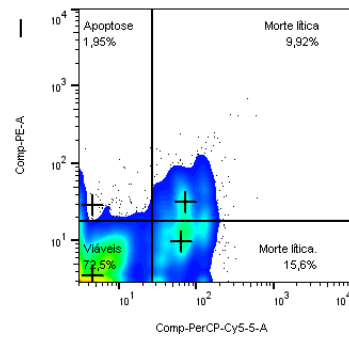
24 hpi\_25-8-22\_MO-THP CTR.fcs  
Células unicas  
9069



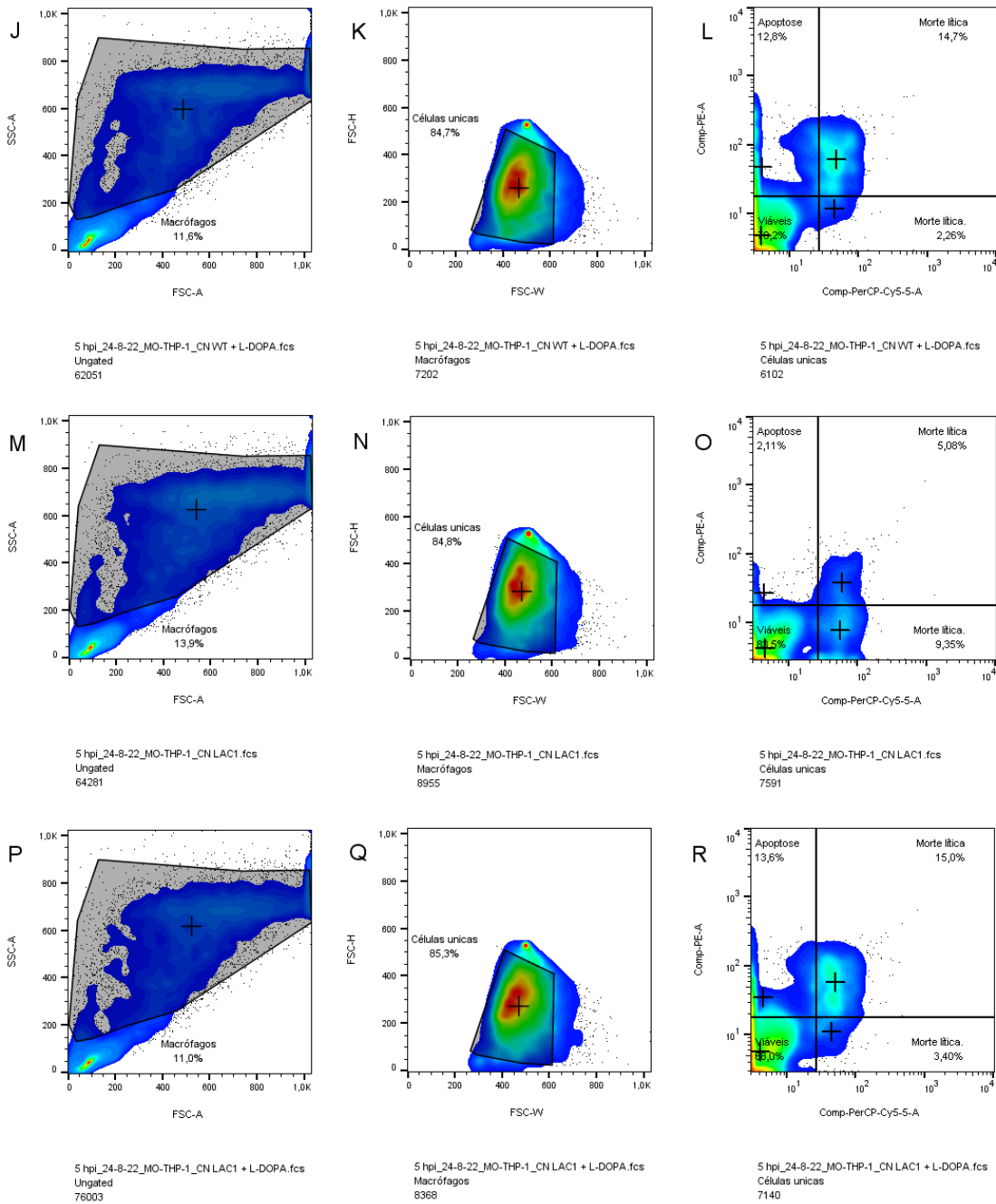
24 hpi\_25-8-22\_MO-THP-1\_CN.WT.fcs  
Ungated  
370483



24 hpi\_25-8-22\_MO-THP-1\_CN.WT.fcs  
Macrófagos  
10427



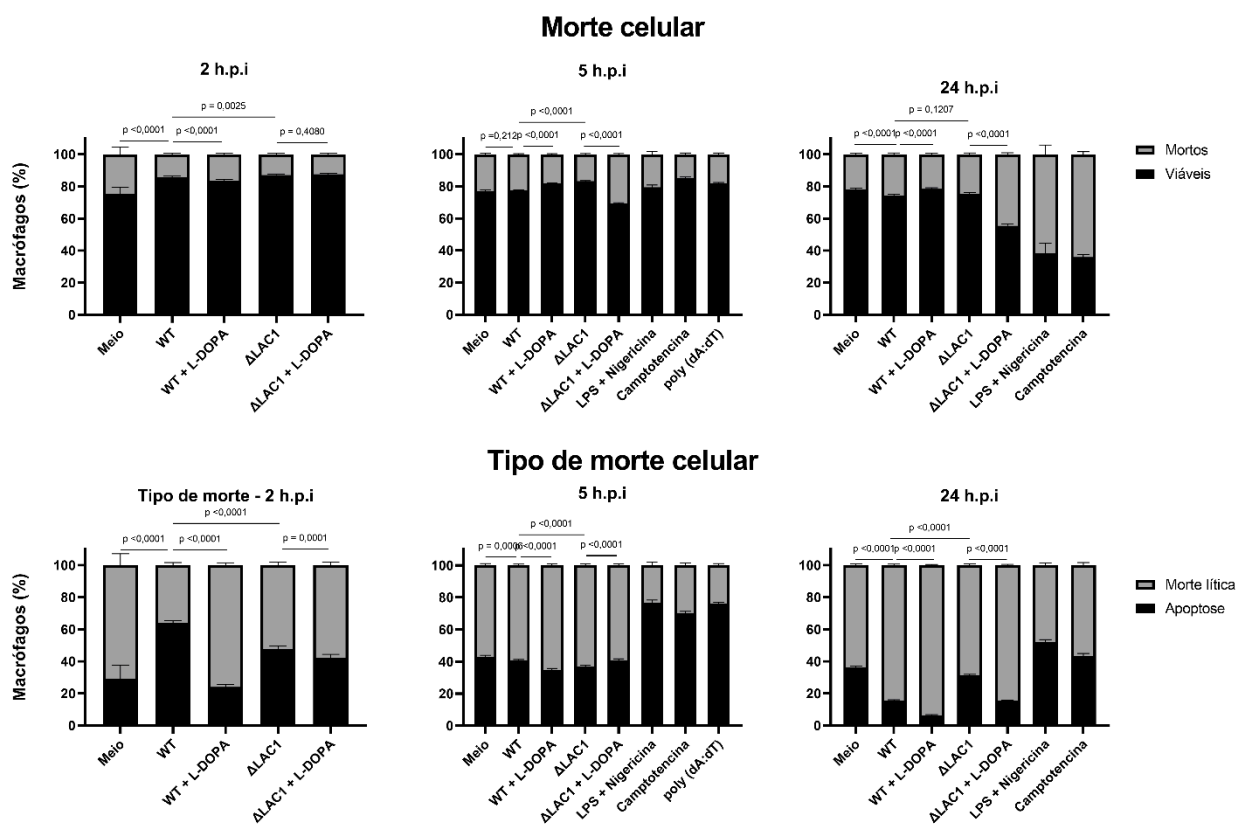
24 hpi\_25-8-22\_MO-THP-1\_CN.WT.fcs  
Células unicas  
8873



**Figura 32. Estratégia de gates para citometria de fluxo adotado para definir células mortas e viáveis, assim como células que sofreram apoptose e morte lítica pela infecção pelo *C. neoformans* H99 que produziam ou não melanina e LAC1.**

Macrófagos foram diferenciados a partir de THP-1 e corados com CeelTracker Deep Red 1  $\mu$ M 2. Leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem (WT) e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas ou não com L-DOPA por 24h e depois foram coradas com CellTracker CMFDA 2  $\mu$ M e interagidas com macrófagos de THP-1 na presença de PSH 10%, MOI 10, por 5 e 24 h.p.i. Primeiramente foi definido o gate para as células com tamanhos dos macrófagos no gráfico FSC x SSC. Depois, foi analisado apenas as células únicas, excluindo aglomerados de células que poderiam ter sido adquiridos pelo citômetro e dessa população. Macrófagos foram recuperados, corados com 7-AAD e anexina V-PE e adquiridos através de citometria de fluxo, seguindo estratégia de gates demonstrado na figura 25 e analisado no programa FlowJo. Gráficos de dot plots representando macrófagos infectados com as diferentes condições positivos ou não para fluorescência de Anexina V-PE e para 7-AAD (PerCP-Cy5.5).





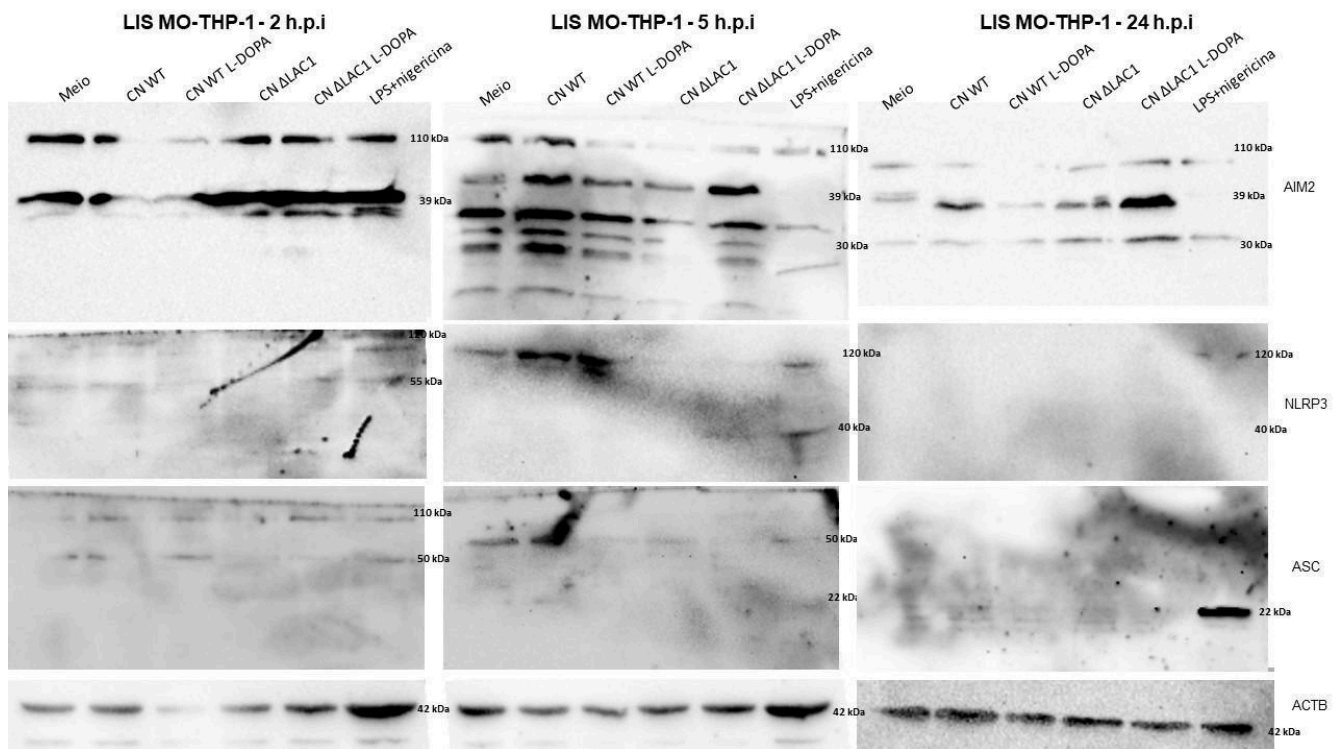
**Figura 33. Proporção de macrófagos mortos e dos que sofreram apoptose ou morte lítica após infecção com *C. neoformans*.**

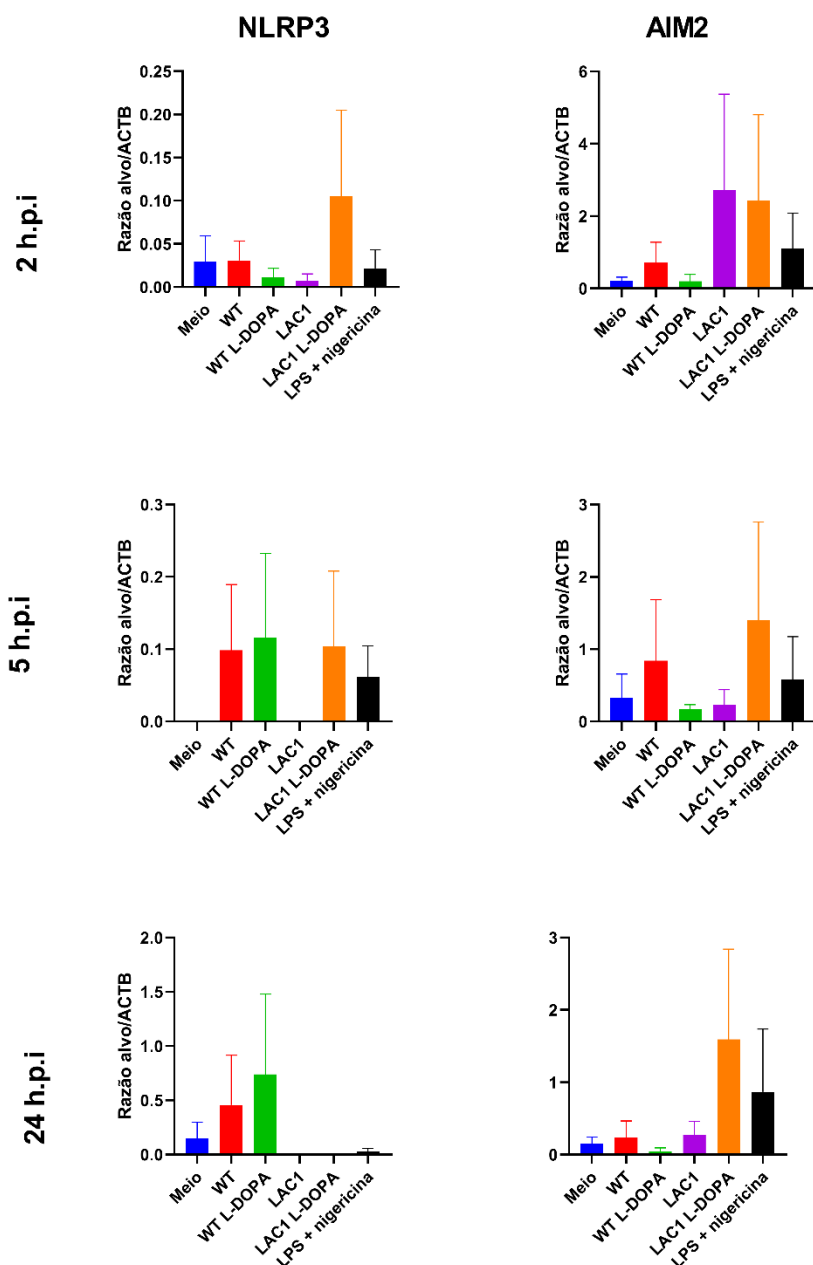
Leveduras de *C. neoformans* H99 selvagem e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas ou não com L-DOPA por 24h e depois foram interagidas com macrófagos de THP-1 na presença de PSH 10%, MOI 10, por 5 e 24 horas. Depois, células foram coradas com 7-AAD e Anexina V-PE e adquiridos por citometria de fluxo, seguindo estratégia de gates representada na **Figura 32**. Foi aferido porcentagem de macrófagos pelo FlowJo e dados referentes à figura **Figura 32** foram usadas para criar os gráficos de barras, representando a proporção de macrófagos viáveis (7-AAD e Anexina V-PE negativos) ou mortos (7-AAD ou Anexina V-PE positivos) em 5 h.p.i (A) e 24 h.p.i (B). Média de razão de macrófagos que sofreram apoptose (7-AAD negativos e Anexina V-PE positivos) ou morte lítica (7-AAD positivos e 7-AAD + Anexina V-PE positivos) em 5.h.p.i (C) e 24 h.p.i (D). Médias referentes a dois experimentos independentes com barras de erro representando 95% do intervalo de confiança.

### 5.5. Análise de formação de inflamassomas em macrófagos de THP-1 desencadeados pela infecção com *C. neoformans*, pela sua melanina ou sua LAC1.

Visto que podemos constatar a morte aumentada de macrófagos sob infecção de *C. neoformans* foi avaliado se essa morte poderia estar relacionada com o reconhecimento por sensores de inflamassomas e sua consequente ativação. Para esse fim, observamos se haveria diferença na abundância e clivagem de proteínas que são ativadas devido a formação dessas plataformas proteicas por Western blotting. Foi

analisada, portanto, a expressão de alguns sensores de inflamassomas como AIM2 e NLRP3, assim como da proteína adaptadora ASC. Além disso, também foi analisado a produção e ativação (clivagem) das caspases efetoras de morte celular, como Caspase 1 (CASP1) e caspase 8 (CASP8), assim como ativação de seus substratos, como mediadores inflamatórios como a interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) e efetores de morte relacionado com piroptose (morte lítica associada a inflamação), como a gasdermina D (GSDMD). Para analisar se foi adicionado a mesma quantidade de extrato proteico para todas as condições, foi investigado também a abundância de  $\beta$  actina (ACTB), uma proteína considerada expressa de forma constante sem sofrer grandes alterações em diferentes estímulos. Todas as proteínas foram analisadas no período de 2, 5 e 24 h.p.i



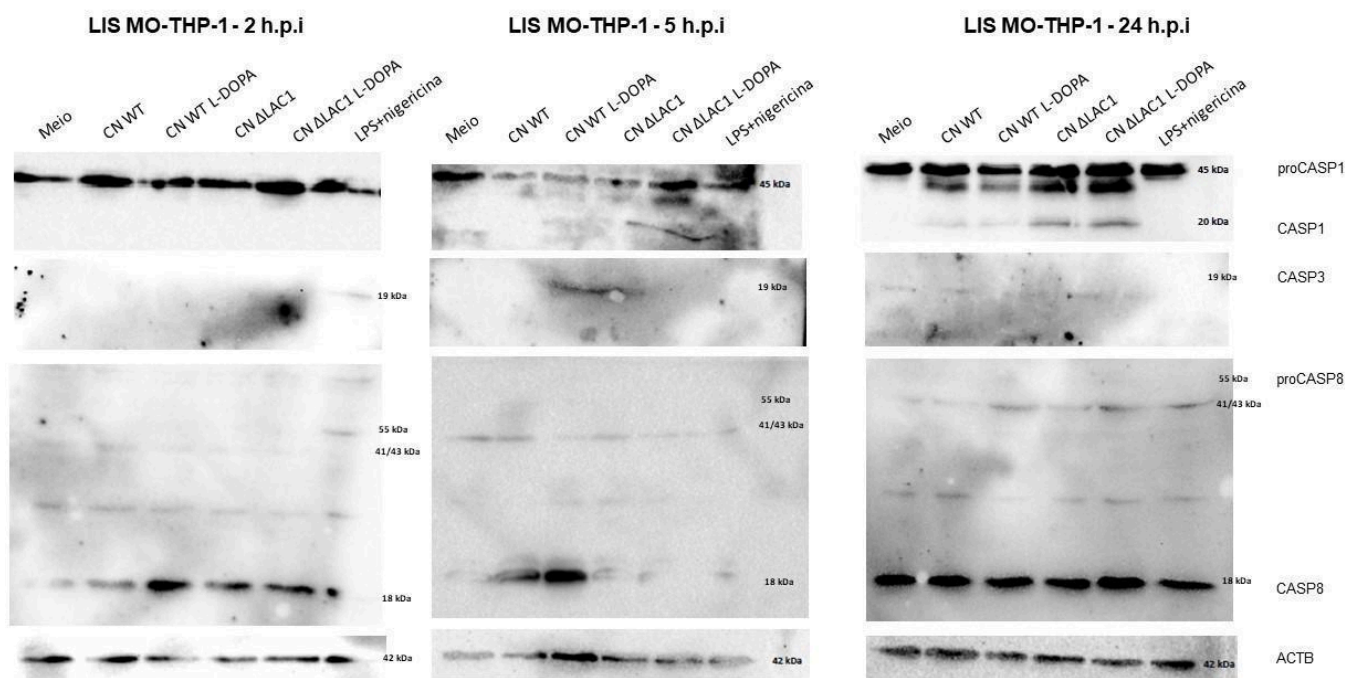


**Figura 34. Abundância de NLRP3, AIM2 e ASC em MO-THP1 desencadeada pela infecção com *C. neoformans* e o efeito da melanina e LAC1.**

Leveduras de *C. neoformans* selvagem (WT) e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por 24h. Depois essas leveduras foram interagidas com MO-THP1, MOI 10, por 2,5 e 24h. Após esse período, as leveduras extracelulares foram descartadas e os macrófagos foram lisados com tampão Laemmli para obter o extrato protéico (LIS MO-THP-1). Esses extratos foram submetidos a SDS-page, transferidos para membrana de PVDF, que foi submetida a western blotting com anticorpos comerciais para NLRP3, AIM2 e ASC. Depois, as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos secundários conjugados a HRP e as membranas foram reveladas por quimioluminescência usando peróxido de hidrogênio + luminol como substrato para HRP. Fotos de membranas reveladas por quimioluminescência de um experimento representativo em 2, 5 e 24 h.p.i (A). Abundância relativa das proteínas foram mensuradas calculando a média de escala cinza de cada banda subtraídas de seus respectivos backgrounds presentes na membrana, e logo após foi aferido a razão entre os respectivos alvos com o controle endógeno (ACTB) (B). Gráficos de barra representando a média e erro padrão da abundância relativa de 2-3 experimentos realizados em dias diferentes. Macrófagos estimulados com LPS por 6 horas e Nigericina nas 2 horas finais (LPS + nigericina) foram usados como controle positivo, por ser um estímulo conhecido para ativação do inflamassoma NLRP3.

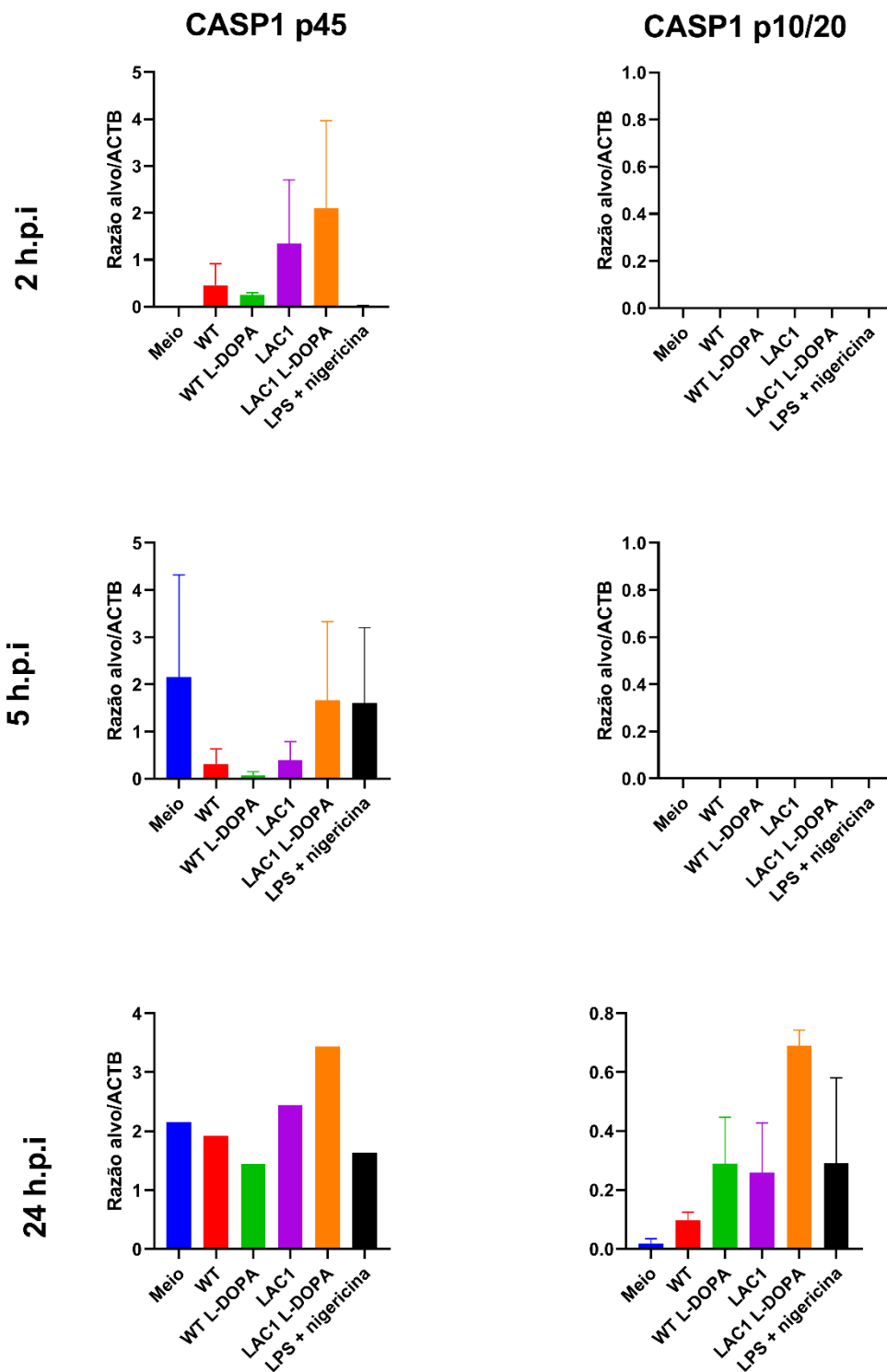
Como pode ser notado na figura 34, no início da infecção há um aumento na produção de AIM2 sob a interação com *C. neoformans*, enquanto não há um aumento na abundância de NLRP3. Porém no curso da infecção, a produção de AIM2 tende a decair e a de NLRP3 começa a crescer até 24 h.p.i. Tanto a melanina quanto LAC1 reduziram a abundância de AIM2 em basicamente todos os tempos analisados. Já em relação à abundância de NLRP3 em macrófagos, apenas LAC1 parece interferir, diminuindo sua produção.

Também foi avaliado a clivagem e consequente ativação das caspases responsáveis pela morte, como CASP1, CASP3 e CASP8. A foto de um experimento representativo está representada na figura 35. Avaliando primeiramente a CASP1, conforme mostrado na figura 35, há um aumento na produção da proCASP1 (p45) nas primeiras horas de infecção que se mantém de certa forma constante ao longo do curso da infecção, porém só conseguimos observar sua clivagem para a forma ativa (p10/20) após 24 h.p.i. Além disso, a presença de melanina em *C. neoformans* parece aumentar a quantidade de CASP1 ativas nos momentos finais da infecção, ao mesmo tempo que diminui a proCASP1, sugerindo que a melanina pode induzir sua ativação. Já a presença de LAC1 diminuiu a ativação de CASP1 sem alterar a produção de proCASP1.



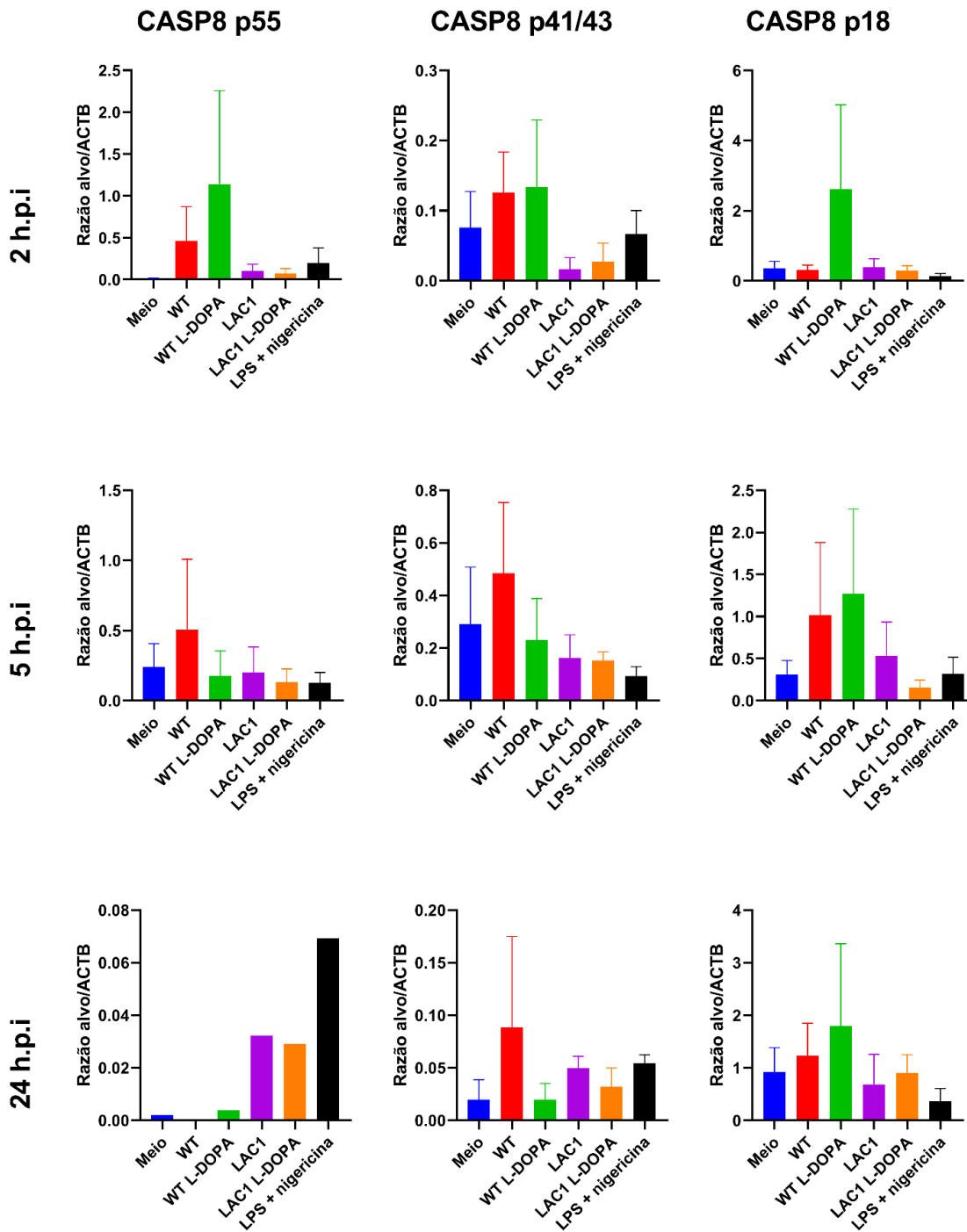
**Figura 35. Abundância de CASP1, CASP3 e CASP8 em MO-THP1 desencadeada pela infecção com *C. neoformans* e o efeito da melanina e LAC1.**

Leveduras de *C. neoformans* selvagem (WT) e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por 24h. Depois essas leveduras foram interagidas com MO-THP1, MOI 10, por 2,5 e 24h. Após esse período, as leveduras extracelulares foram descartadas e os macrófagos foram lisados com tampão Laemmli para obter o extrato proteico (LIS MO-THP-1). Esses extratos foram submetidos a SDS-PAGE, transferidos para membrana de PVDF, que foi submetida a western blotting com anticorpos comerciais para CASP1, CASP3 e CASP8. Depois, as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos secundários conjugados a HRP e as membranas foram reveladas por quimioluminescência usando peróxido de hidrogênio + luminol como substrato para HRP. Fotos de membranas reveladas por quimioluminescência de um experimento representativo em 2, 5 e 24 h.p.i



**Figura 36. Abundância relativa de CASP1p45 e CASP1 p10/20 em MO-THP1 infectados com leveduras de *C. neoformans* e a influência da melanina de LAC1.**

Abundância relativa das proteínas foram mensuradas a partir de fotos como da **Figura 35**, calculando a média de escala cinza de cada banda subtraídas de seus respectivos backgrounds presentes na membrana, e logo após foi aferido a razão entre os respectivos alvos com o controle endógeno (ACTB). Gráficos de barra representando a média e erro padrão da abundância relativa de 2-3 experimentos realizados em dias diferentes. Macrófagos estimulados com LPS por 6 horas e Nigericina nas 2 horas finais (LPS + nigericina) foram usadas como controle positivo, por ser um estímulo conhecido para ativação do inflamassoma NLRP3.



\*

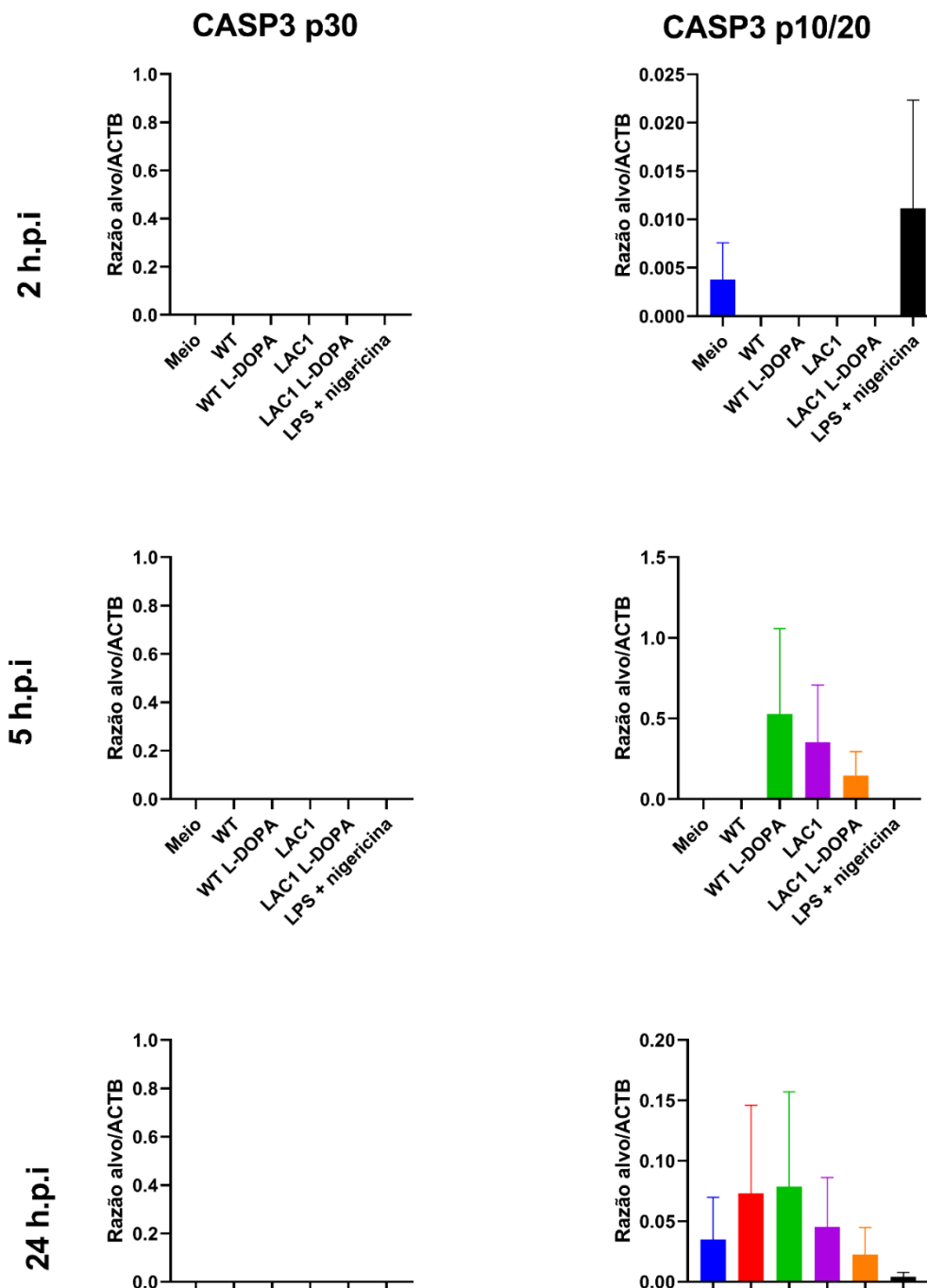
**Figura 37. Abundância relativa de CASP8 p55, CASP8 p43/41 e CASP8 p18 em MO-THP1 infectados com leveduras de *C.neoformans* e a influência da melanina de de LAC1.**

Abundância relativa de CASP8 foi mensurada a partir de fotos como da **Figura 35**, calculando a média de escala cinza de cada banda subtraídas de seus respectivos backgrounds presentes na membrana, e logo após foi aferido a razão entre os respectivos alvos com o controle endógeno (ACTB). Gráficos de barra representando a média e erro padrão da abundância relativa de 2-3 experimentos realizados em dias diferentes. Macrófagos estimulados com LPS por 6 horas e Nigericina nas 2 horas finais (LPS + nigericina) foram usadas como controle positivo, por ser um estímulo conhecido para ativação do inflamassoma NLRP3.

Assim como proCASP1 abundância da pro-CASP8 é aumentada pela infecção logo nas primeiras horas de infecção, porém vai decaindo ao longo do tempo. Mas ao contrário

de CASP1 ativa, podemos perceber uma ativação de CASP8 (p18) a partir de 5h de interação de MO-THP1 com *C. neoformans*. A presença da melanina aumentou a ativação de CASP8 nos momentos mais precoces da infecção, mas sem grandes alterações em momentos mais longínquos.

Não foi possível visualizar a proCASP3 (p30) em nenhum dos experimentos feitos, conforme ilustrado na figura 38, talvez pelo fato de o anticorpo ser capaz apenas de reconhecer sua porção clivada, portanto, não foi possível visualizar sua cinética de produção ao curso da infecção com o fungo. Mas foi possível notar que a ativação de CASP3 (p17/19) foi reprimida no início da infecção, mas induzida nos tempos mais tardios (24 h.p.i). A presença da melanina de *C. neoformans* exacerbou a ativação de CASP3, enquanto LAC1 a diminuiu.

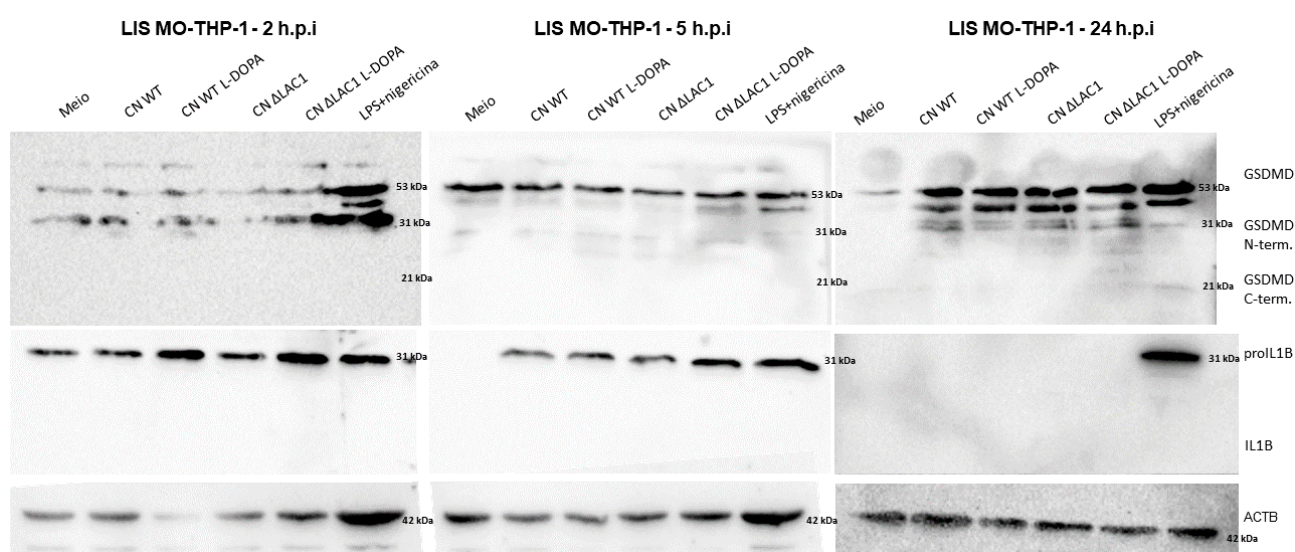




**Figura 38. Abundância relativa de CASP3 p30 e CASP1 p17/19 em MO-THP1 infectados com leveduras de *C.neoformans* e a influência da melanina de de LAC1.**

Abundância relativa das CASP3 foi mensuradas a partir de fotos como da **Figura 35**, calculando a média de escala cinza de cada banda subtraídas de seus respectivos backgrounds presentes na membrana, e logo após foi aferido a razão entre os respectivos alvos com o controle endógeno (ACTB). Gráficos de barra representando a média e erro padrão da abundância relativa de 2-3 experimentos realizados em dias diferentes. Macrófagos estimulados com LPS por 6 horas e Nigericina nas 2 horas finais (LPS + nigericina) foram usadas como controle positivo, por ser um estímulo conhecido para ativação do inflamassoma NLRP3.

Após a análise de clivagem e ativação das caspases, fomos avaliar se alguns de seus substratos relacionados com a inflamação também haviam sido alterados, como a IL-1B e GSDMD. Fotos de experimentos representativos são mostrados na figura 39.

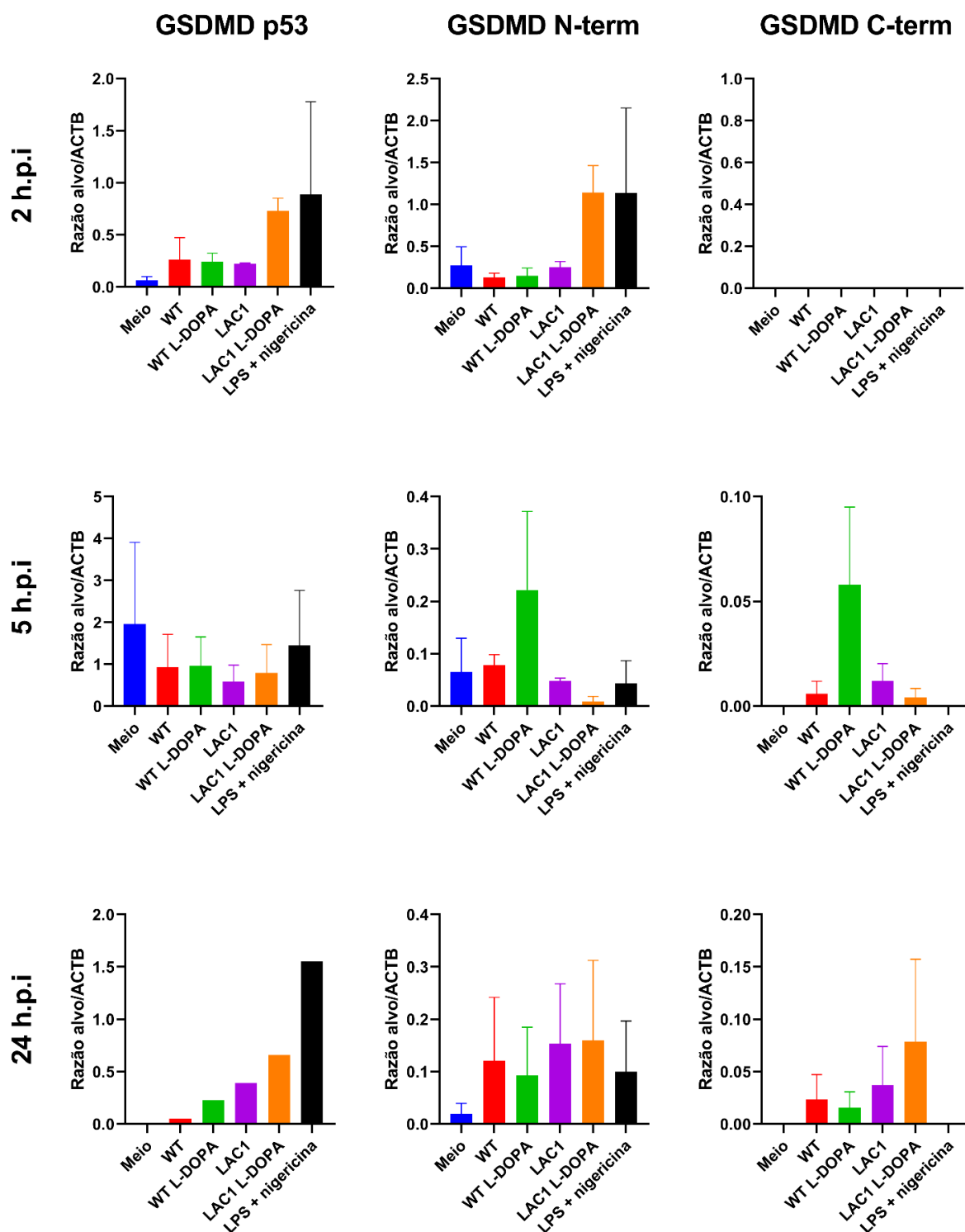


**Figura 39. Abundância de GSDMD p53, N e C terminal e IL-1B p31 e IL-1B p17 em MO-THP1 infectados com leveduras de *C.neoformans* e a influência da melanina de de LAC1.**

Leveduras de *C. neoformans* selvagem (WT) e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por 24h. Depois essas leveduras foram interagidas com MO-THP1, MOI 10, por 2,5 e 24h. Após esse período, as leveduras extracelulares foram descartadas e os macrófagos foram lisados com tampão Laemmli para obter o extrato proteico (LIS MO-THP-1). Esses extratos foram submetidos a SDS-page, transferidos para membrana de PVDF, que foi submetida a western blotting com anticorpos comerciais para GSDMD e IL-1B. Depois, as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos secundários conjugados a HRP e as membranas foram reveladas por quimioluminescência usando peróxido de hidrogênio + luminol como substrato para HRP. Fotos de membranas reveladas por quimioluminescência de um experimento representativo em 2, 5 e 24 h.p.i.

Analisando a Figura 40, podemos notar que a GSDMD possui uma cinética parecida com a CASP1: sua forma inativa tem uma produção maior no início da infecção, mas se mantém estável de 5 a 24 h.p.i, e começamos a ver sua ativação apenas nos momentos mais tardios da infecção para a sua forma ativa (GSDMD N-terminal), quando comparado às células não infectadas. Porém, aparentemente nem a melanina, tampouco LAC1 de *C. neoformans* parece interferir na ativação de GSDMD.

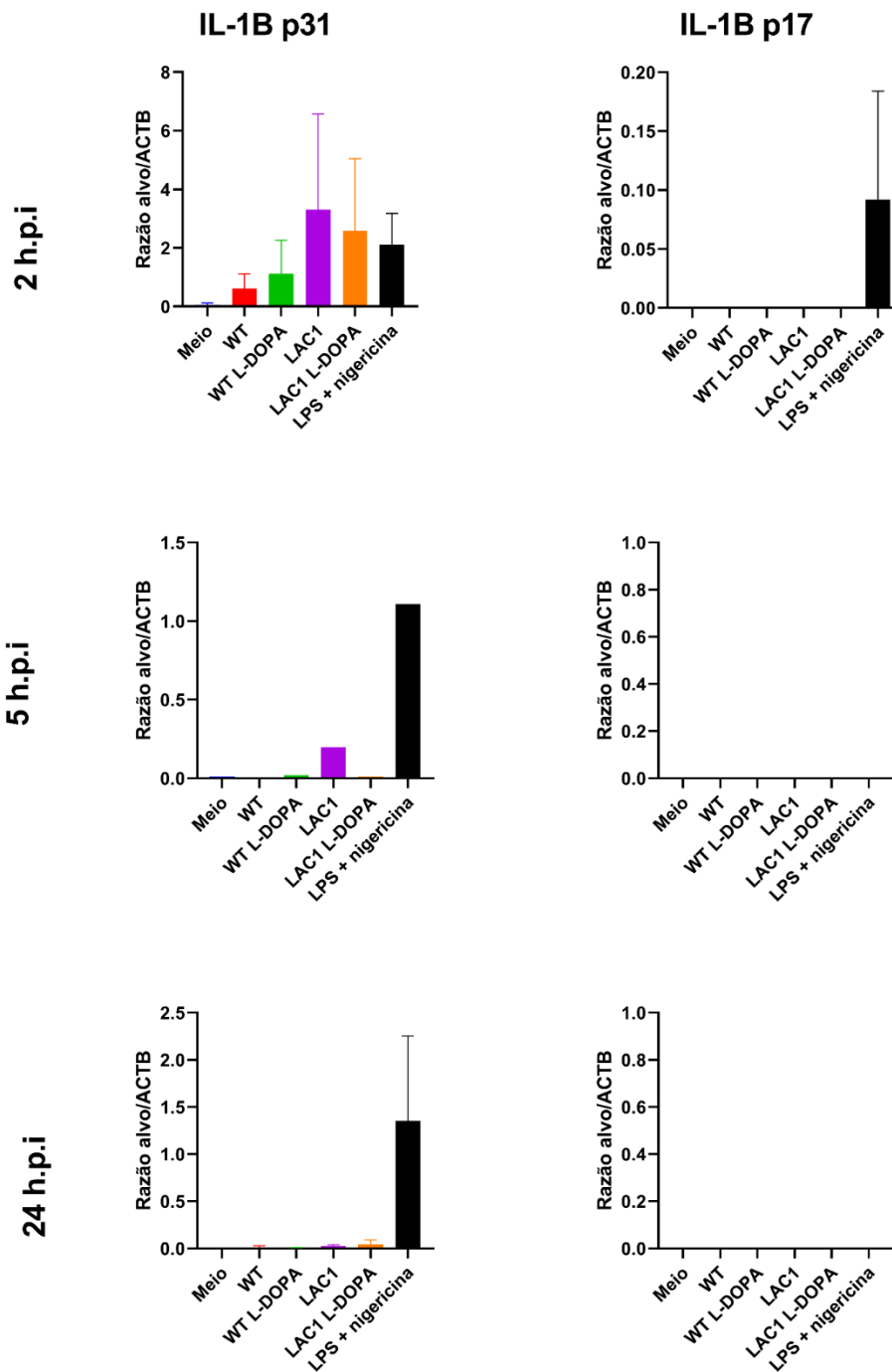




**Figura 40.** Abundância relativa de GSDMD p53, N e C terminal em MO-THP1 infectados com leveduras de *C. neoformans* e a influência da melanina de LAC1.

Abundância relativa de GSDMD foram mensuradas a partir de fotos como da **Figura 39**, calculando a média de escala cinza de cada banda subtraídas de seus respectivos backgrounds presentes na membrana, e logo após foi aferido a razão entre os respectivos alvos com o controle endógeno (ACTB). Gráficos de barra representando a média e erro padrão da abundância relativa de 2-3 experimentos realizados em dias diferentes. Macrófagos estimulados com LPS por 6 horas e Nigericina nas 2 horas finais (LPS + nigericina) foram usadas como controle positivo, por ser um estímulo conhecido para ativação do inflamassoma NLRP3.

A infecção pelo fungo desencadeou um aumento precoce e momentâneo na produção de pro-IL-1B (p31), mas essa produção não é mais visualizada no curso mais longínquo da infecção. Não conseguimos detectar a IL-1B ativa no lisado de MO-THP1, como é ilustrado na Figura 41. Talvez porque elas tenham sido secretadas das células mortas e estejam na maior parte no sobrenadante, porém, não conseguimos analisar visualizar IL-1B no sobrenadante através de western blotting.



**Figura 41. Abundância relativa de IL-1B p30 e IL-1B p17i em MO-THP1 infectados com leveduras de *C. neoformans* e a influência da melanina de de LAC1.**

Abundância relativa de IL-1B foi mensurada a partir de fotos como da **Figura 39**, calculando a média de escala cinza de cada banda subtraídas de seus respectivos backgrounds presentes na membrana, e logo após foi aferido a razão entre os respectivos alvos com o controle endógeno (ACTB). Gráficos de barra representando a média e erro padrão da abundância relativa de 2-3 experimentos realizados em dias diferentes. Macrófagos estimulados com LPS por 6 horas e Nigericina nas 2 horas finais (LPS + nigericina) foram usadas como controle positivo, por ser um estímulo conhecido para ativação do inflamassoma NLRP3.

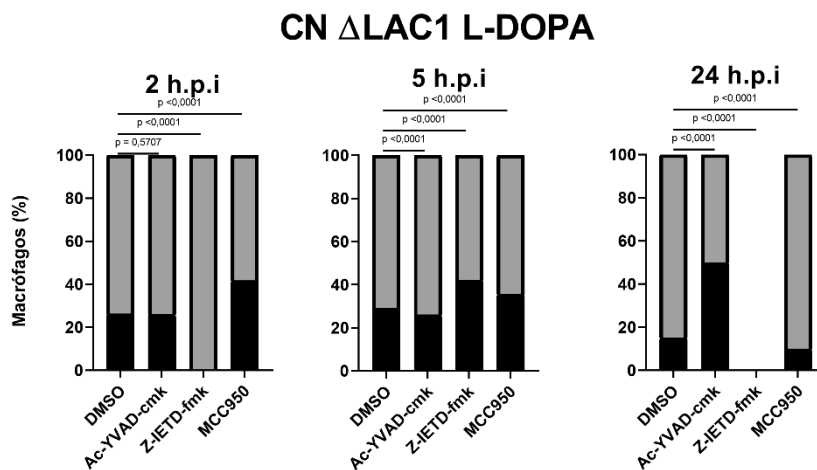
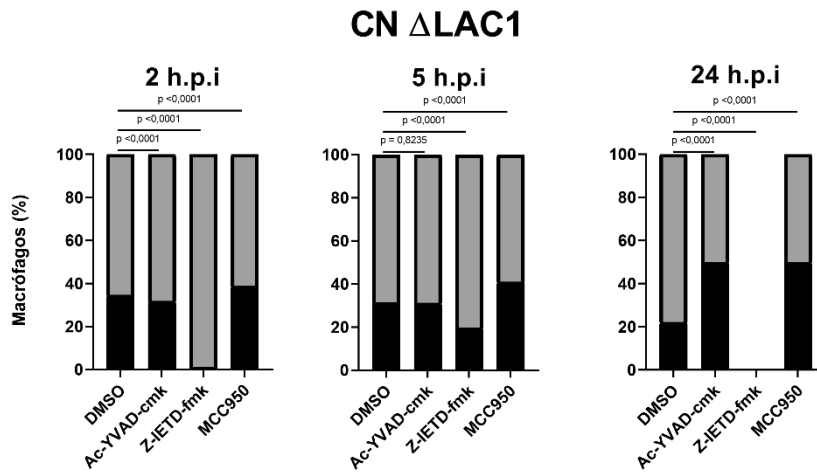
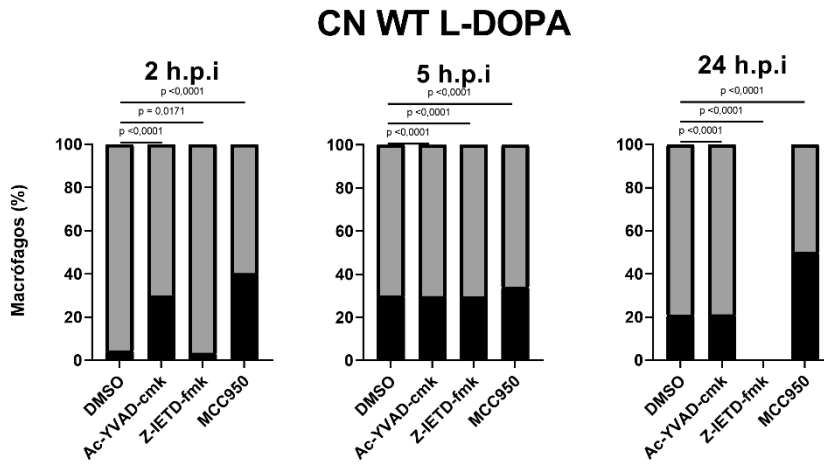
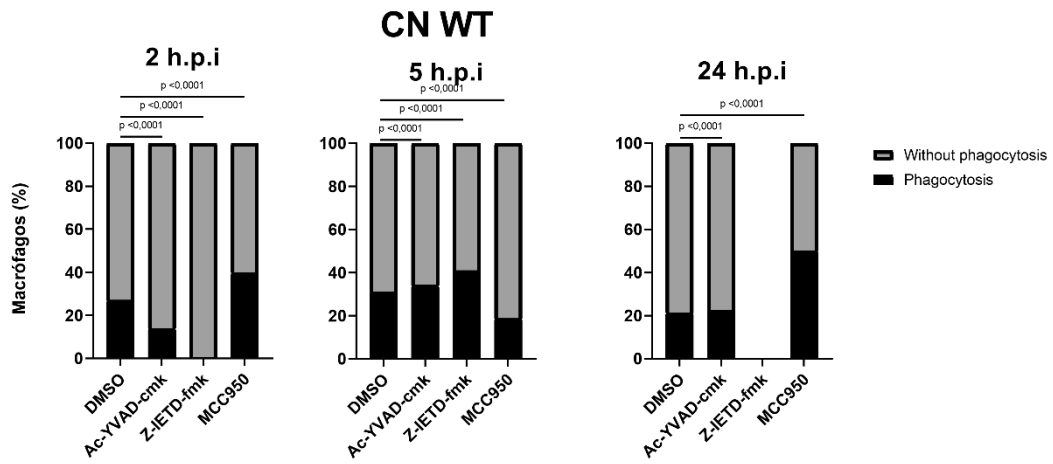
## 5.6. A influência de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 na infecção por *C. neoformans*

### 5.6.1. A influência de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 na fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos humanos

Notado que a infecção de macrófagos por *C. neoformans*, assim como a presença da melanina e de LAC1, parecia alterar a fagocitose, a morte e a expressão de proteínas relacionadas aos inflamassomas, foi avaliado se a inibição desses inflamassoma poderia alterar esses fenótipos. Para esse propósito, macrófagos foram incubados com inibidores para AIM2 (ODN TTAGGG), NLRP3 (MCC950), CASP1 (Ac-YVAD-cmk) e CASP8 (Z-IETD-fmk) e depois infectados com *C. neoformans*.

Primeiramente foi analisado se essas proteínas poderiam interferir no processo de fagocitose das leveduras. Para isso, MO-THP1 foram corados com CellTracker Deep Red e leveduras de *C. neoformans* foram coradas com CellTracker CMFDA e ambas foram interagidas por 2, 5 e 24h. Após esses períodos, as leveduras extracelulares foram descartadas, os macrófagos recuperados e adquiridos por citômetro de fluxo com o intuito de se analisar a proporção de células com leveduras internalizadas. Os dados foram analisados no FlowJo usando a mesma estratégia de gates aplicada na **Figura 27**.

De acordo com a figura 42, pode-se observar que a inibição de CASP1 provocou uma diminuição da fagocitose de *C. neoformans* na infecção precoce e a inibição de CASP8 minimizou mais ainda esse fenótipo, porém não é notado diferença na proporção de macrófagos com leveduras internalizadas nos momentos mais tardios da infecção. A inibição de NLRP3 provocou uma diminuição do número de macrófagos que fagocitaram leveduras a partir de 5h.p.i, mas apresentou um aumento de células que fagocitaram em 24 h.p.i. Já na presença da melanina, a inibição de CASP1 causou o efeito inverso, aumentando o número macrófagos que fagocitaram leveduras no início da infecção em mais de 4x, mas sem grandes diferenças nos outros períodos ao longo do curso da infecção. Sem a presença da LAC1 em *C. neoformans*, a inibição de CASP1 parece não modificar mais a fagocitose no início e ter um efeito contrário no final da infecção, causando um aumento do número de macrófagos que realizaram fagocitose.



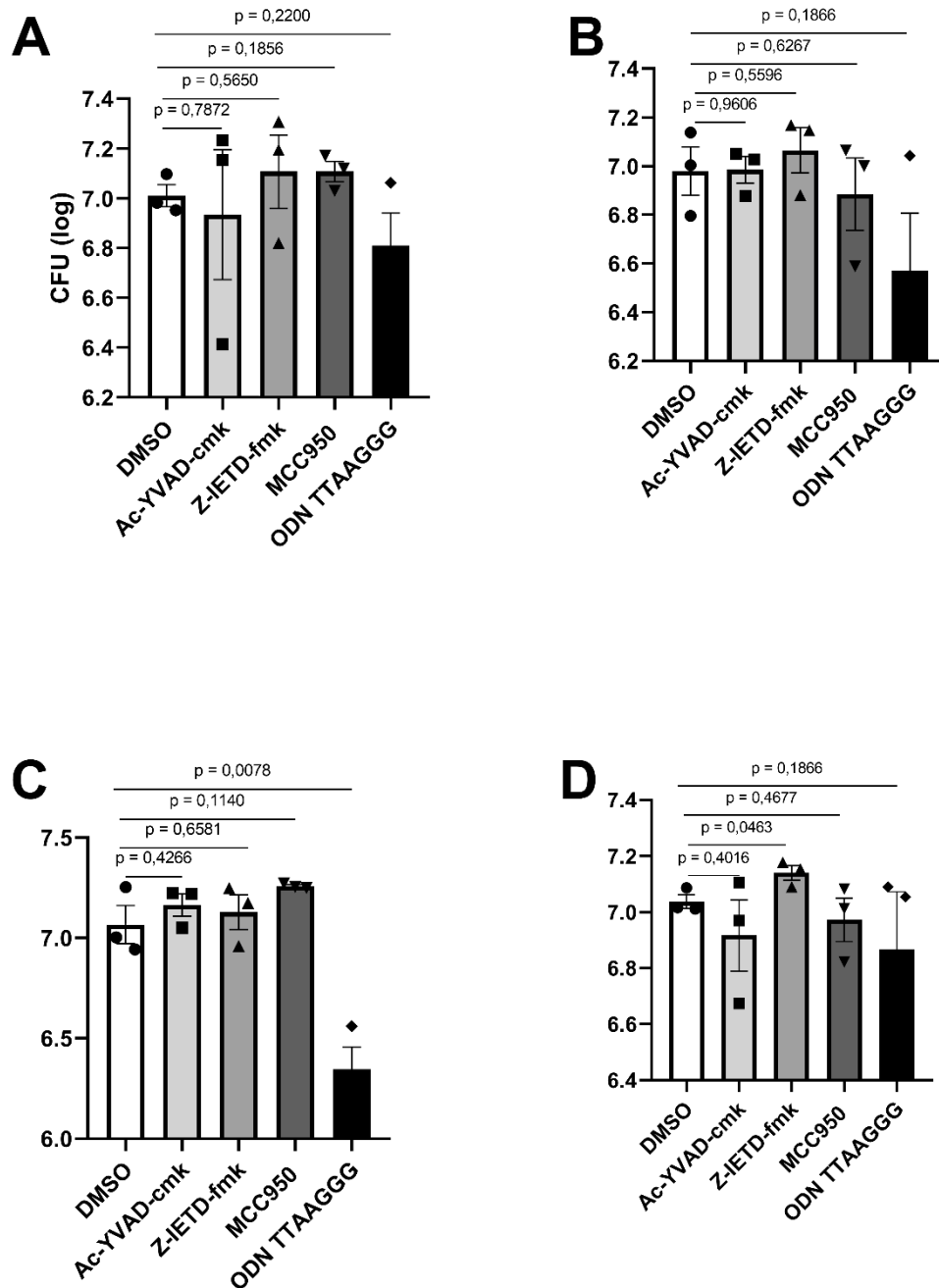
**Figura 42. Proporção de MO-THP1 que fagocitaram ou não leveduras de *C. neoformans* sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.**

Leveduras de *C. neoformans* cepa H99 WT e  $\Delta$ LAC1 foram incubados em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por 24h. Essas leveduras então foram coradas com CellTracker CMFDA antes da infecção. Macrófagos de THP-1 foram corados com CellTracker Deep Red e incubados com inibidores para AIM2 (ODN TTAGGG), NLRP3 (MCC950), CASP1 (Ac-YVAD-cmk) e CASP8 (Z-IETD-fmk) e depois infectados com as leveduras obtidas do passo anterior por 2, 5 e 24 h.p.i, MOI 10. Após esses tempos, as leveduras extracelulares foram lavadas e descartadas, os macrófagos foram recuperados e analisados por citometria de fluxo, usando estratégia de gates já adotada e representada na figura 27. Células DeepRed positivas foram analisadas quanto a presença ou ausência da fluorescência de CMFDA, definidas como células que fagocitaram ou não leveduras, respectivamente. Gráficos de barra indicando a soma do número de eventos de 3 (2 h.p.i) e 2 experimentos (5 e 24 h.p.i) realizados em dias distintos. Valor de P calculado usando teste de exato de Fisher comparando duas condições por vez.

**5.5.2. A influência de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 na sobrevivência de *C. neoformans* em macrófagos humanos**

A fim de avaliar se haveria diferença na sobrevivência de *C. neoformans* com a inibição de proteínas NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8, macrófagos derivados de THP-1 foram incubados com seus respectivos inibidores e depois interagidos com leveduras de *C. neoformans* por 2, 5 e 24 h.p.i. Depois. As leveduras extracelulares foram descartadas, os macrófagos lisados com água destilada e os fungos internalizados foram recuperados e plaqueados em placas contendo Sabouraud-ágar. Após 48h a 37°C, as colônias de leveduras que viáveis que surgiram foram contabilizadas e determinado o log10 do CFU. Os dados obtidos foram resumidos nas figuras 43, 44 e 45. Como podemos observar, apenas a inibição de AIM2 pelo inibidor ODN TTAGGG causou uma diminuição da sobrevivência das leveduras que foram fagocitadas pelos macrófagos, tanto no momento inicial quanto final da interação. A presença de LAC1 parece aumentar a sobrevivência das leveduras no início da infecção, sem interferência notável nos outros períodos analisados. Já a melanina não mostrou interferência na sobrevivência das leveduras sob inibição das proteínas do inflamassoma/morte.

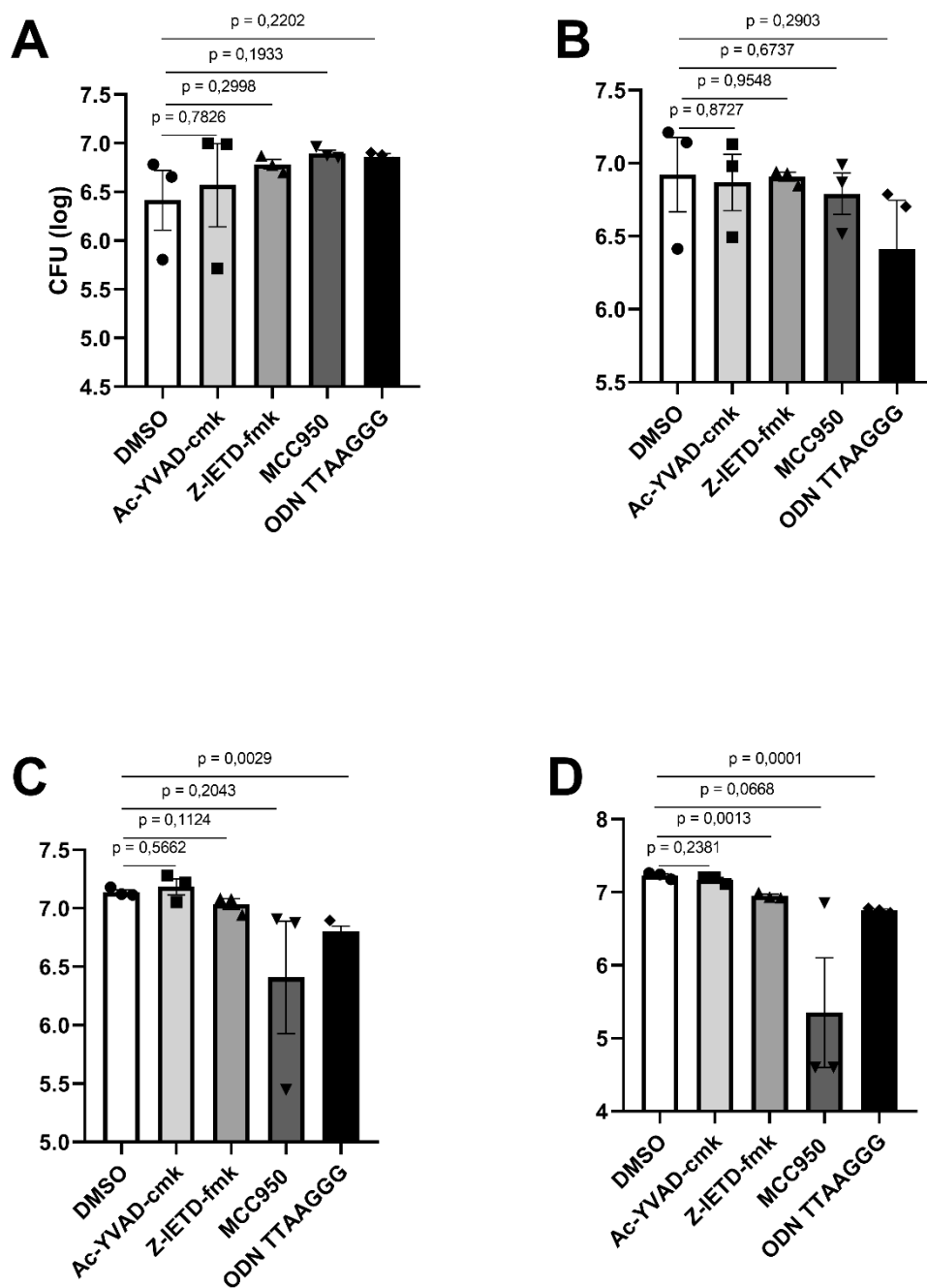
2 h.p.i



**Figura 43. CFU de leveduras de *C. neoformans* fagocitadas por MO-THP1 após 2 horas de infecção sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.**

Leveduras de *C. neoformans* cepa H99 WT e  $\Delta$ LAC1 foram incubados em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por 24h. Essas leveduras então foram interagidas com Macrófagos de THP1 previamente incubados com inibidores para AIM2 (ODN TTAGGG), NLRP3 (MCC950), CASP1 (Ac-YVAD-cmk) e CASP8 (Z-IETD-fmk) ou DMSO (veículo) por 1h. A interação se deu por 2 h, MOI 10. Após esses tempos, as leveduras não fagocitadas foram lavadas, os macrófagos foram lisados com água destilada e as leveduras intracelulares recuperadas e plaqueadas em placa contendo Sabouraud-agar por 48h a 37°C. Após esse período, as colônias que surgiram nas placas foram contabilizadas e determinado seu log<sub>10</sub> do CFU. Gráficos de barras mostrando CFU de leveduras WT (A), WT L-DOPA (B), LAC1 (C) e LAC1 L-DOPA (D) fagocitadas por MO-THP1 sob os respectivos inibidores.

## 5 h.p.i

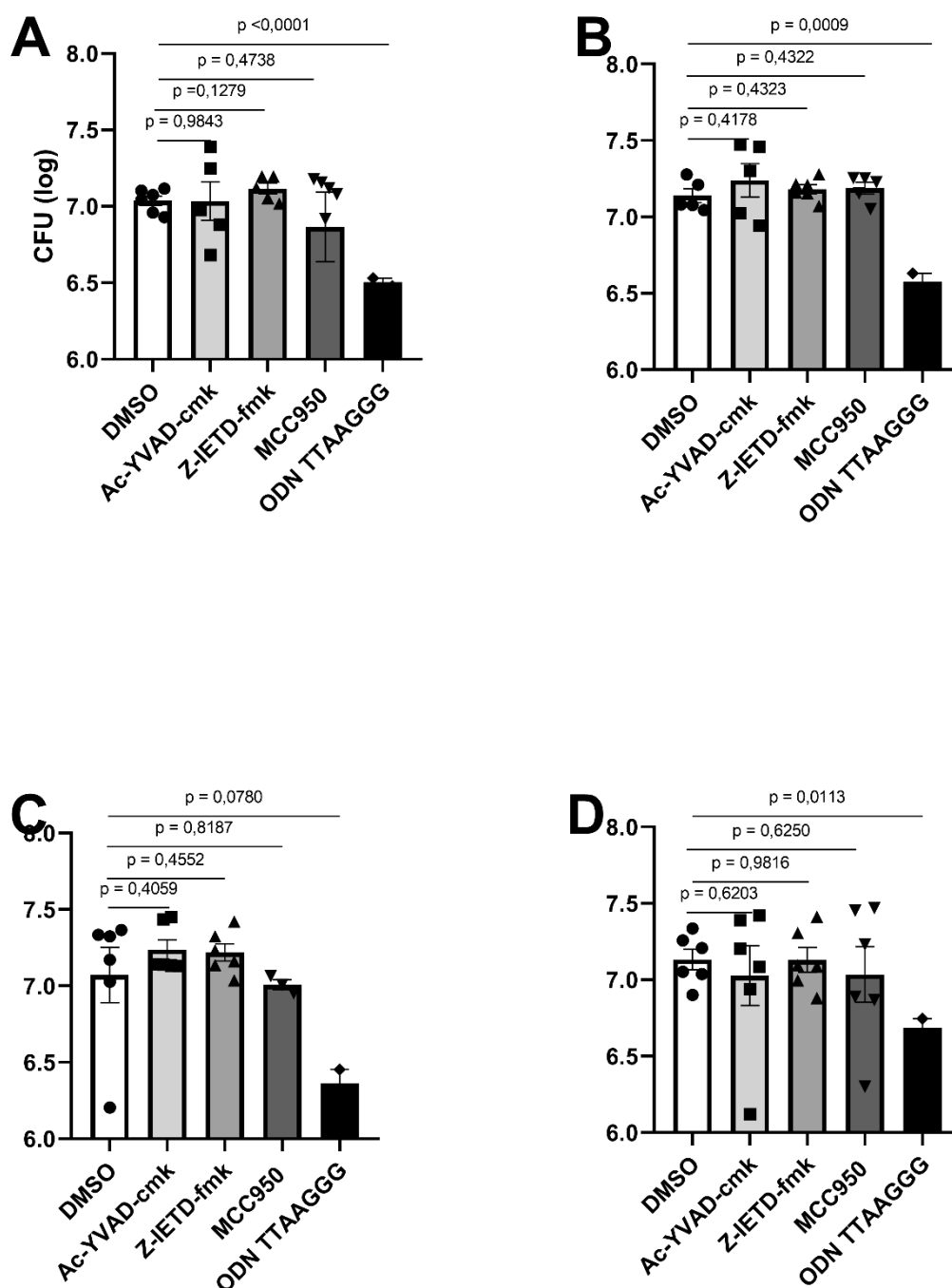


**Figura 44. CFU de leveduras de *C. neoformans* fagocitadas por MO-THP1 após 5 horas de infecção sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.**

Leveduras de *C. neoformans* cepa H99 WT e  $\Delta$ LAC1 foram incubados em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por 24h. Essas leveduras então foram interagidas com Macrófagos de THP1 previamente incubados com inibidores para AIM2 (ODN TTAGGG), NLRP3 (MCC950), CASP1 (Ac-YVAD-cmk) e CASP8 (Z-IETD-fmk) ou DMSO (veículo) por 1h. A interação se deu por 5 h, MOI 10. Após esses tempos, as leveduras não fagocitadas foram lavadas, os macrófagos foram lisados com água destilada e as leveduras intracelulares recuperadas e plaqueadas em placa contendo Saboraud-agar por 48h a 37°C. Após esse período, as colônias que surgiram nas placas foram contabilizadas e determinado seu log<sub>10</sub> do CFU. Gráficos de barras mostrando CFU de leveduras WT (A), WT L-DOPA (B), LAC1 (C) e LAC1 L-DOPA (D) fagocitadas por MO-THP1 sob os respectivos inibidores.



24 h.p.i



**Figura 45.** CFU de leveduras de *C. neoformans* fagocitadas por MO-THP1 após 24 horas de infecção sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.

Leveduras de *C. neoformans* cepa H99 WT e  $\Delta$ LAC1 foram incubados em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por 24h. Essas leveduras então foram interagidas com Macrófagos de THP1 previamente incubados com inibidores para AIM2 (ODN TTAGGG), NLRP3 (MCC950), CASP1 (Ac-YVAD-cmk) e CASP8 (Z-IETD-fmk) ou DMSO (veículo) por 1h. A interação se deu por 24 h, MOI 10. Após esses tempos, as leveduras não fagocitadas foram lavadas, os macrófagos fora lisados com água destilada e as leveduras intracelulares recuperadas e plaqueadas em placa contendo Sabouraud-agar por 48h a 37°C. Após esse período, as colônias que surgiram nas placas foram contabilizadas e determinado seu log10 do CFU. Gráficos de barras mostrando CFU de leveduras WT (A), WT L-DOPA (B), LAC1 (C) e LAC1 L-DOPA (D) fagocitadas por MO-THP1 sob os respectivos inibidores.

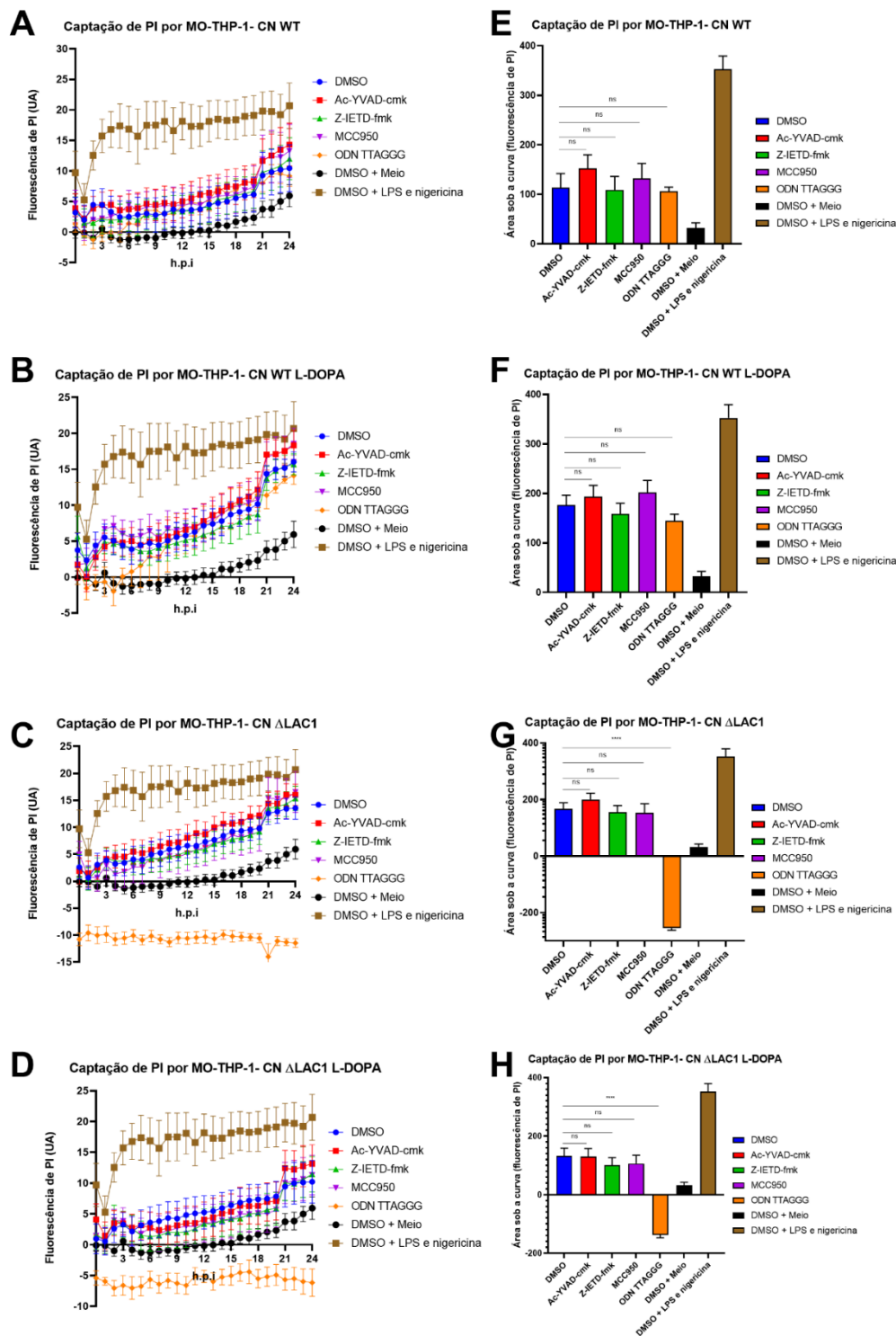
### **5.5.3. A influência de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 na morte de macrófagos humanos infectados por *C. neoformans*.**

Com o intuito de analisar se a inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 poderia interferir na morte de macrófagos infectados com *C. neoformans*, esses foram incubados com seus respectivos inibidores, interagidos com as leveduras e foi analisado então a captação de PI pelos macrófagos por fluorímetro de placa por 24h, analisando sua fluorescência a cada 1 h.p.i..

Pode-se notar que apenas que a inibição de nenhuma das proteínas citadas acima influenciou na cinética de morte causada pela infecção com *C. neoformans*, entretanto, na ausência de LAC1, a inibição de AIM2 (ODN TTAGGG) inibiu drasticamente a morte dos macrófagos.

A fim de corroborar os dados da cinética de captação de PI, também foi avaliado a morte de macrófagos sob infecção por citometria de fluxo, corando as células pós infecção com 7-AAD e analisando a proporção de células positivas para esse corante.

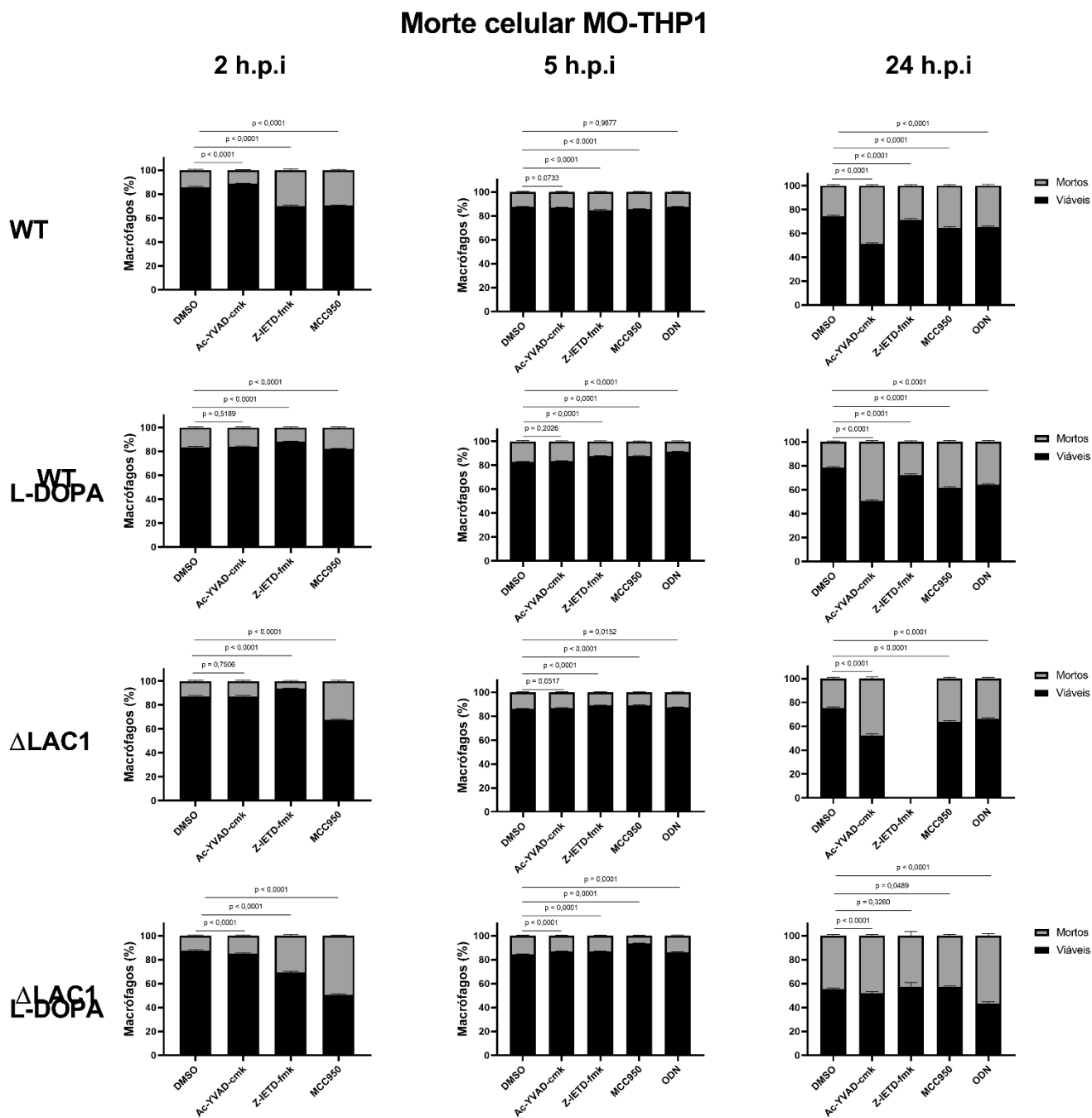
Foi possível verificar que a inibição de CASP8 e NLRP3 reduziu a morte celular de macrófagos nos momentos iniciais da infecção, mas não alterou a morte em momentos tardios, ao invés disso, a inibição de CASP1 passa a ter interferência, reduzindo a morte em períodos prolongados de infecção. Com a melanina, CASP8 deixa de exercer um papel na diminuição da morte celular. Com a deficiência de LAC1 em *C. neoformans*, a inibição de CASP8 também não afeta mais a morte das células, apenas a inibição de NLRP3 diminui esse fenótipo. Essas informações estão contidas na figura 47.



**Figura 46. Cinética de morte de macrófagos infectados com *C. neoformans* com inibição de proteínas do inflamassoma.**

Macrófagos foram incubados por 1-2h com inibidores para AIM2 (ODN TTAGGG), NLRP3 (MCC950), CASP1 (Ac-YVAD-cmk), CASP8 (Z-IETD-fmk) ou com veículo (DMSO). Macrófagos foram infectados com leveduras de *C. neoformans* WT, WT + L-DOPA,  $\Delta$ LAC1 e  $\Delta$ LAC1 + L-DOPA, MOI 10 por 24 horas em meio contendo iodeto de propídio (PI). Placa foi incubada a 37°C em fluorímetro e a análise de fluorescência de PI era realizada a cada 1h. Gráficos de linhas mostrando cinética de captação de PI por macrófagos infectados por 20h. Pontos representam as médias referente à de triplicata de um único ensaio, barras de erro representam o erro padrão da média de três réplicas realizadas no mesmo experimento (A, B, C e D). Gráficos de barras representando média de triplicata de um experimento, barras de erro representam o erro padrão da média (E, F G e H). Valores de P calculado por meio de ANOVA não pareada com análise nas

duas caldas (two-tailed) e pós teste de Dunnet comparando todas as condições infectadas com não infectada (controle).

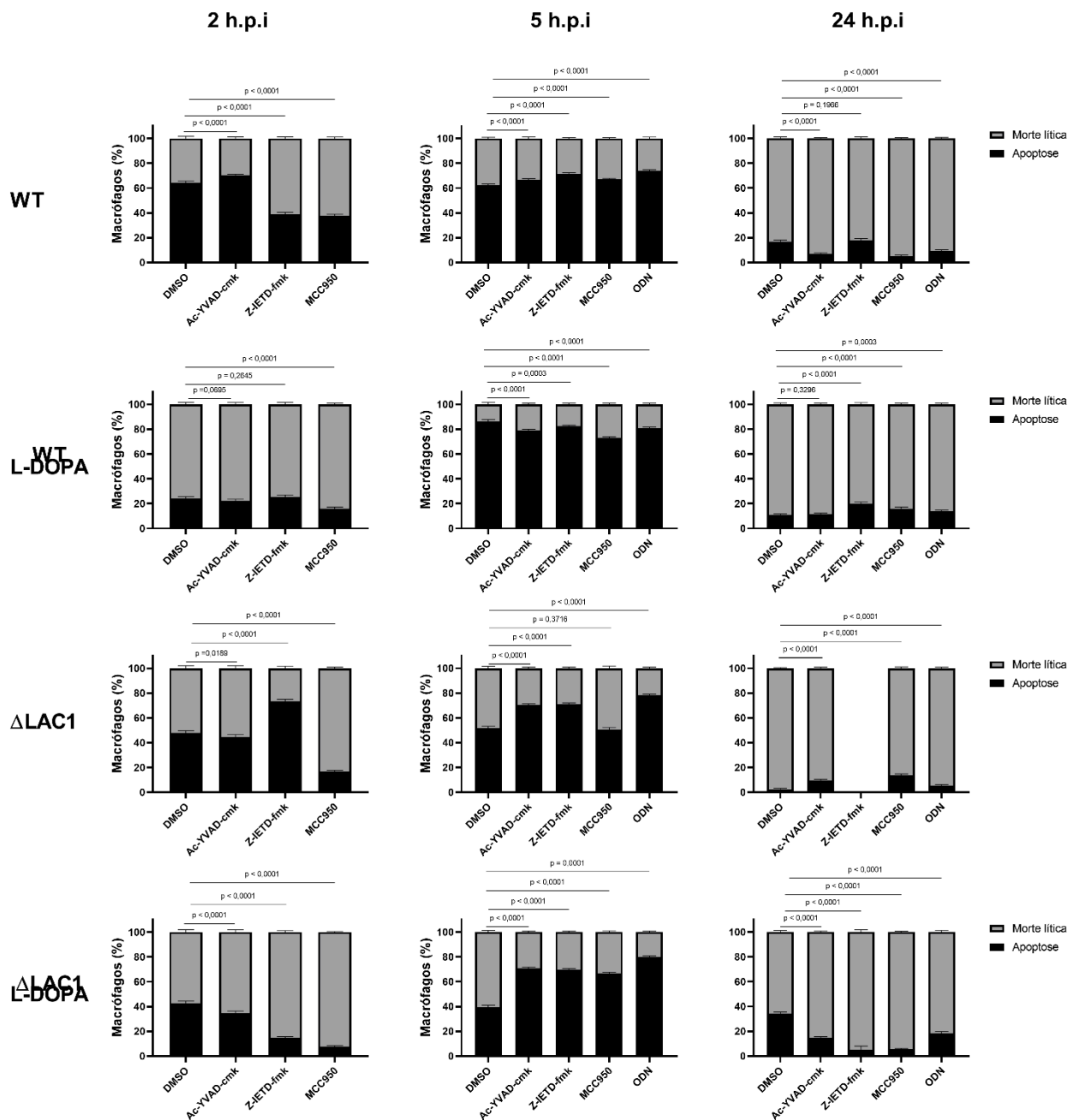


**Figura 47. Morte celular de MO-THP1 ocasionada por *C. neoformans* por 2, 5 e 24 h.p.i. sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.**

Leveduras de *C. neoformans* cepa H99 WT e ΔLAC1 foram incubadas em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por 24h. Essas leveduras então foram interagidas com Macrófagos de THP1 previamente incubados com inibidores para AIM2 (ODN TTAGGG), NLRP3 (MCC950), CASP1 (Ac-YVAD-cmk) e CASP8 (Z-IETD-fmk) ou DMSO (veículo) por 1h. A interação se deu por 2, 5 e 24 h.p.i, MOI 10. Após esses tempos, as leveduras não fagocitadas foram lavadas, os macrófagos foram recuperados e corados com 7-AAD para análise em citometria de fluxo. Gráficos de barras mostrando proporção de macrófagos viáveis (7-AAD-) e mortos (7-AAD+) referentes a um experimento. Valores de P calculados usando teste exato de Fisher comparando dois grupos por vez.

Analisando que tipo de morte poderia estar sendo afetada pela inibição das proteínas estudadas, também foi verificado por citometria de fluxo a proporção de células que sofreram apoptose e morte lítica após inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 e subsequente infecção por *C. neoformans* contendo ou não melanina e LAC1, conforme pode ser visto na figura 48. A inibição de CASP8 e NLRP3 ocasionaram uma diminuição do apoptose no início da infecção, já a inibição de CASP1, NLRP3 e AIM2 ocasionou diminuição do apoptose em períodos mais prolongados, com os dois primeiros tendo as reduções mais acentuadas. Com a presença da melanina de *C. neoformans*, CASP8 já não causou mais a redução de apoptose, como também gerou um aumento de quase o dobro na infecção tardia. Na ausência de LAC1, houve maior apoptose sob supressão de CASP8 e menos apoptose na supressão de NLRP3 nas primeiras horas de interação, porém a inibição de NLRP3 em infecção prolongada levou a uma maior morte por apoptose.

## Tipo de morte celular MO-THP1



**Figura 48. Apoptose e morte lítica de MO-THP1 ocasionada por *C. neoformans* por 2, 5 e 24 h.p.i. sob inibição de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8.**

Leveduras de *C. neoformans* cepa H99 WT e  $\Delta$ LAC1 foram incubadas em meio mínimo contendo ou não L-DOPA por 24h. Essas leveduras então foram interagidas com Macrófagos de THP1 previamente incubados com inibidores para AIM2 (ODN TTAGGG), NLRP3 (MCC950), CASP1 (Ac-YVAD-cmk) e CASP8 (Z-IETD-fmk) ou DMSO (veículo) por 1h. A interação se deu por 2, 5 e 24 h.p.i, MOI 10. Após esses tempos, as leveduras não fagocitadas foram lavadas, os macrófagos foram recuperados e corados com 7-AAD para análise em citometria de fluxo. Gráficos de barras mostrando proporção de macrófagos que sofreram apoptose (7-AAD-, Anexina V-PE+) e morte lítica (7-AAD+) referentes a um experimento. Valores de P calculados usando teste exato de Fisher comparando dois grupos por vez.

## 6. Discussão

Assim como *C. neoformans*, vários fungos patogênicos que podem infectar humanos e outros organismos são capazes de produzir melanina ou adquirir coloração escura, incluindo *Fonsecaea pedrosoi* (ALVIANO et al, 1991), *Aspergillus fumigatus* (YOUGCHIM et al, 2004), *Paracoccioides brasiliensis* (GÓMEZ et al, 2001; da SILVA et al, 2006), *Blastomyces dermatitidis* (NOSANCHUK et al, 2004), *Candida albicans*, (MORRIS-JONES et al, 2005), *Coccidioides posadasii* (NOSANCHUK et al, 2007), *Histoplasma capsulatum* (NOSANCHUK et al, 2002), entre outros. Fungos fitopatogênicos só conseguem penetrar e promover infecção em seus hospedeiros quando produzem melanina em seus apressórios, como *Pyricularia oryzae*, *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum lagenarium* e *Gaeumannomyces graminis* var. *Graminis* (WHEELER & BELL, 1988; BUTLER & DAY, 1998; EBERT et al, 2019).

Em nossos estudos, observamos diminuição da fagocitose de *C. neoformans* na presença de melanina, assim como em outros trabalhos onde a fagocitose mediada por anticorpos de leveduras *C. neoformans* por macrófagos murinos foi reduzida quando estes produzem melanina (WANG, AISEN & CASADEVALL, 1995, MEDNICK, NOSANCHUK & CASADEVALL, 2005). Nossos dados, portanto, corroboram outros achados anteriores, utilizando um hospedeiro humano, outra cepa de *C. neoformans*, e outra via de fagocitose, através da opsonização pelo sistema complemento, mostrando semelhança na resposta de diferentes espécies contra a infecção por *C. neoformans* por mecanismos distintos de opsonização.

A melanina poderia interferir na fagocitose das células de levedura pela redução da deposição de proteínas do complemento, como C3, como em *A. fumigatus*. Mutantes deste fungo incapazes de produzir melanina apresentaram maior deposição de C3 e maiores taxas de fagocitose (TSAI et al, 1998). Porém, já foi constatado que não houve diferença na deposição da proteína C3 em leveduras que produziam ou não melanina. Portanto, essa inibição da fagocitose talvez possa ser devida à melanina extracelular ou em cepas com cápsulas pequenas, onde a melanina presente na parede celular poderia interferir diretamente na deposição de C3, o que não é observado em cepas encapsuladas (ROSAS et al, 2002). Acredita-se que a melanina de *C. neoformans* confira carga mais negativa à superfície da levedura, mesmo sendo menor que a conferida pela cápsula (NOSANCHUK & CASADEVALL, 1997), o que poderia influenciar na ancoragem de proteínas do complemento à superfície da levedura. células de levedura e, conseqüentemente, reduzem sua opsonização. Outro fator que pode estar relacionado à

inibição da fagocitose do *C. neoformans* é a capacidade do fungo de secretar vesículas para fora da célula infectada (PANEPINTO et al, 2009). Essas vesículas podem conter LAC1 (RODRIGUES et al, 2008), além de serem melanizadas (EISENMAN et al, 2009).

Além disso, observamos UFCs mais elevados, embora houvesse menos leveduras intracelulares quando produziam melanina, sugerindo que tinham aumentado a sobrevivência. Isso pode ser explicado pelo fato de a melanina proporcionar maior defesa contra degradação enzimática (ROSAS & CASADEVALL, 2001) e radicais livres (POLACHECK, PLATT, & ARONOVITCH, 1990; JACOBSON E EMERY, 1991; JACOBSON E TYNNELL, 1993; WANG, AISEN & CASADEVALL, 1995). Portanto, a ação de enzimas digestivas e espécies reativas após a fagocitose de *C. neoformans* presentes no fagolisossomo poderia ser mitigada pela melanina. A produção de melanina por *Aspergillus fumigatus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Talaromyces marneffeii*, *Rhizopus* spp e *Sporotrix schenckii* também reduziu a fagocitose dos fungos pelos fagócitos, além de aumentar sua resistência à destruição intracelular (JAHN et al, 2002; da SILVA et al, 2005 ; SAPMAK et al, 2016; SOLIMAN et al, 2020; Portanto, a melanina parece estar envolvida na inibição da fagocitose e conferindo maior persistência do fungo durante a infecção.

Nossas descobertas sugerem que a infecção por *C. neoformans* é capaz de induzir a ativação do NF- $\kappa$ B como afirmado anteriormente em estudos anteriores (Bem-Abdalah et al., 2012; Hayes et al., 2016), no entanto nem a melanina e o LAC1 parecem interferir com esse processo. Pudemos ver pela primeira vez que a infecção por *C. neoformans* também é capaz de causar ativação da via IRF e que tanto a melanina quanto a LAC1 parecem não ter participação. A ativação da via NF- $\kappa$ B é responsável por promover a expressão de alguns mediadores de inflamação, bem como de alguns componentes do inflamassoma, como ASC, IL-1B, IL-8 e IL-6 (Liu et al., 2017). Talvez isso justifique porque pudemos observar um aumento na abundância de alguns componentes do inflamassoma após a infecção por fungos.

Já foi averiguado que isolado clínicos vindo de pacientes vivendo com AIDS e com meningite criptocócica, onde isolados com maior atividade de lacase tiveram mais fagocitose por macrófagos *ex-vivo* (SABIITI et al, 2014). O fato de haver maior fagocitose estava diretamente relacionado com maior carga fúngica presente no fluido cérebro-espinhal, ou seja, a LAC1 de *C. neoformans* poderia estar relacionada com um pior prognóstico desses pacientes. Além disso, nosso grupo já havia observado menor fagocitose em leveduras de *C. neoformans* deficientes em LAC1 em macrófagos murinos (dados não publicados). Porém não foi possível atestar aumento de fagocitose na



presença de LAC1, mais estudos precisam ser feitos para constatar se de fato essa enzima pode interferir na fagocitose ou não das leveduras.

Ademais, foi observado em nosso trabalho que, embora houvesse menos leveduras intracelulares quando produziam melanina, essas tiveram uma sobrevivência aumentada, gerando maiores CFUs quando comparadas com leveduras sem melanina. Isso pode ser explicado pelo fato de a melanina conferir maior defesa à degradação enzimática (ROSAS & CASADEVALL, 2001) e aos radicais livres (POLACHECK, PLATT, & ARONOVITCH, 1990; JACOBSON E EMERY, 1991; JACOBSON E TYNNELL, 1993; WANG, AISEN & CASADEVALL, 1995). Com isso, a ação de enzimas digestivas e de espécies reativas após a fagocitose de *C. neoformans* presentes no fagolisossomo poderiam ser amenizadas pela melanina.

Devido ao fato de termos observado que a cepa  $\Delta$ LAC1 também é capaz de produzir melanina, mesmo que de forma mais retardada quando comparado com a cepa selvagem, sugerimos que podem haver outras enzimas responsáveis pela produção de melanina a partir da L-DOPA ou que colaboram com a produção dessa molécula. A lacase 2 poderia ser uma dessas enzimas, visto que esta possui 75% de similaridade com a LAC1, também é induzida pela privação de glicose e sua ausência causa apenas um pequeno atraso na produção de melanina (PUKKILA-WORLEYN *et al*, 2005). A presença apenas da lacase 2 na cepa  $\Delta$ LAC1 poderia estar compensando a atividade da LAC1 e sendo responsável pela produção de melanina nessa cepa de forma atrasada quando comparada com a selvagem.

Além disso, observamos que quanto maior a densidade de leveduras inoculadas mais rápido ocorria a melanização desses micro-organismos. Isso talvez possa ser explicado pelo fato que as células de *C. neoformans* conseguem secretar fatores para o meio extracelular e comunicar às demais para que possam se proteger de um determinado sinal de estresse. A presença de quorum-sensing já foi observado em *C. neoformans*, onde esses fatores liberados conseguiram provocar maior crescimento, assim como também induziu uma melanização mais rápida nas leveduras (ALBUQUERQUE *et al*, 2013)

Independente da produção de melanina, a lacase 1 pode ser responsável por promover virulência por si só, visto que ela é requerida para que o *C. neoformans* possa realizar exocitose não-lítica *in vitro* (FRASÃO *et al*, 2020), o que confere vantagens ao fungo. A presença da melanina também facilitou sua disseminação (NOVEER *et al*, 2004), promoveu maior sobrevivência das leveduras e recrutamento de leucócitos nos pulmões

de animais infectados (MEDNICK, NOSANCHUK & CASADEVALL 2005) e aumentou a letalidade de animais infectados (SALAS *et al*, 1996).

Sabe-se agora que espécies de fungos que causam doenças em mamíferos são capazes de ativar inflamassomas, principalmente pelo sensor NLRP3, incluindo *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Malassezia* spp., e *Microsporum canis* (Joly *et al.*, 2009; Hise *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2014; *al.*, 2015; Amorim *et al.*, 2019). Além disso, *C. albicans* e *A. fumigatus* provocaram morte celular e formação de inflamassoma pela ativação de proteínas das vias de piroptose e apoptose, como CASP1, CASP3, CASP7 e CASP8, além da clivagem de GSDMD (Banoth *et al.*, 2020).

Acapsular *C. neoformans* e *zymosan* foram capazes de ativar o inflamassoma, especificamente pelo inflamassoma do eixo NLRP3-CASP1, e morte de macrófagos, porém, tanto *C. neoformans* capsular, GalXM, GXM inibem esses fenótipos (CHIAPELLO *et al*, 2003; CHIAPELLO *et al*, 2004 CHIAPELLO *et al.*, 2008; VILLENA *et al.*, 2008; Curiosamente, a ausência de CASP1 causou ativação do inflamassoma NLRP3-CASP8 não canônico (Chen *et al.*, 2015). Além disso, alguns metabólitos fúngicos, como o ácido DL-indole-3-láctico (ILA), também diminuíram a ativação do inflamassoma e a morte celular nas células hospedeiras (Bürgel *et al.*, 2020). Portanto, alguns componentes do *C. neoformans* são capazes de provocar morte celular e inflamação, enquanto outros podem modular estas características em células hospedeiras infectadas. Porém, até hoje, não temos estudos anteriores relacionando a melanina ou LAC1 com a ativação do inflamassoma e morte celular.

Nossos achados também indicam que a infecção por *C. neoformans* provocou células mais viáveis no início da infecção em comparação com células não infectadas, indicando provavelmente uma indução de replicação de macrófagos. Alguns trabalhos já descreveram que a infecção por *C. neoformans* poderia desencadear a mitose de macrófagos, aumentando a progressão para a fase S, dependente do reconhecimento do receptor Fc e do complemento, porém independente da fagocitose (Luo, Tucker & Casadevall, 2005; Luo *et al.*, 2006 ). No entanto, a presença intracelular de *C. neoformans* induz a proliferação e produção de Ciclina D1 apenas nas primeiras horas de infecção e depois a sua abundância começa a diminuir significativamente ao longo da infecção (Luo & Casadevall, 2010). No entanto, na infecção prolongada, os danos nas células do hospedeiro são consideráveis e ocorre a morte celular, o que é observado em nosso

trabalho e em outros (MATSUNAGA & ITO, 2000; CHIAPELLO et al, 2003; Guo et al., 2014, Chen et al., 2014, Chen et al. ., 2015, Coelho et al., 2015 THAK et al, 2020).

Pudemos notar que a presença de melanina em *C. neoformans* provocou mais morte lítica, o que está correlacionado com a clivagem mais precoce de CASP1, CASP3, CASP8 e GSDMD, embora a melanina tenha promovido muito menos fagocitose de células de levedura no início da infecção. e a ativação de CASP1, CASP3 e CASP8 já foram observadas em cinética semelhante em outros estudos, corroborando nossos achados (Chen et al., 2015; Coelho et al., 2015). Porém, é a primeira vez que a produção e clivagem de GSDMD foi observada sob infecção por *C. neoformans* e que seus fatores de virulência podem modulá-la. Nas demais infecções, a GSDMD é a única proteína da família Gasdermin, que promove proteção contra *Salmonella* (Fattinger et al., 2023). Além disso, acredita-se que a GSDMD inicia a morte por piroptose (He et al., 2015; Liu et al., 2016; Aglietti et al., 2016), o que poderia explicar a morte lítica na infecção tardia, observada ao mesmo tempo que a GSDMD é mais clivado e, conseqüentemente, ativo.

A mitocôndria está relacionada à produção de ERO e, conseqüentemente, à ativação do inflamassoma (Wiese et al., 2012). Além disso, muitos patógenos estão envolvidos na manipulação de funções mitocondriais, como bactérias e protozoários (Rudel, Keep & Kozjak-Pavlovic, 2010; Hwang et al., 2010). Descobriu-se recentemente que o GSDMD também promove a permeabilização da membrana mitocondrial e a piroptose (Miao et al., 2023). Já foi relatado que a infecção por *C. neoformans* poderia desencadear despolarização e mau funcionamento mitocondrial *in vitro* e *in vivo* (Coelho et al., 2015). Como nosso trabalho encontrou clivagem e provavelmente ativação da GSDMD, e outros trabalhos estabeleceram uma ligação entre a infecção por *C. neoformans* e o comprometimento mitocondrial, levantamos a hipótese de que a GSDMD possivelmente esteja relacionada a esse fenótipo, atraindo para membranas mitocondriais externas e internas e promovendo sua permeabilização.

A explicação pela qual o CASP3 clivado acompanha a cinética de clivagem do GSDMD pode ser devido ao fato de que o CASP3 ativa as claves N-terminais do GSDMD, a fração que promove a formação de poros e a piroptose. Então a ativação de CASP3 poderia atuar como um regulador negativo para controlar a morte lítica e a maturação de IL-1B (Wright et al, 2024).

Além disso, a presença de LAC1 promoveu clivagem tardia de CASP1 e CASP3. É a primeira vez que se observa a influência da melanina e LAC1 nos componentes dos inflamassomas e sua interferência na morte celular.

Também foi observada maior ativação de caspase 8 por macrófagos infectados com *C. neoformans* apenas nos momentos iniciais da infecção e na ausência de LAC1, porém esse fenômeno foi diminuído nas horas finais de infecção, associando-se à uma ativação maior de caspase 1. Esse fato concorda em parte com a observação de uma diminuição acentuada de apoptose entre o início e fim da infecção, com os tempos mais tardios tendo a morte lítica como majoritária. Já é sabido o papel da caspase 8 como crucial para iniciar o processo de apoptose dependente de receptores Fas, TNFR1, TRAIL e DR3 (KRUIDERING & EVAN, 2000; TUMMER & GREEN, 2017). Enquanto isso, a caspase 1 está intrinsecamente relacionada com a morte piroptótica (FRANCHI *et al*, 2009; MIAO, RAJAN & ADEREM, 2011).

É sabido que a morte celular ocasionada por *C. neoformans* é dependente da viabilidade e fagocitose das leveduras pelos macrófagos, visto que leveduras encapsuladas não opsonizadas conseguem escapar da fagocitose, não estão aptas a provocar morte, ativação de IL-1B e CASP1 e oligomerização de ASC, já cepas sem cápsula sim (GUO *et al*, 2014; CHEN *et al*, 2015). Isso indica que a morte celular só pode ser desencadeada quando o patógeno é reconhecido no interior da célula invadida.

É importante salientar que não há trabalhos relatando a influência da melanina e da LAC1 na morte e na inflamação de células hospedeiras, tampouco de macrófagos humanos. Portanto, nosso trabalho é o primeiro a analisar o efeito desses fatores de virulência de *C. neoformans* no contexto de morte celular e produção de mediadores inflamatórios por células humanas, trazendo grandes avanços para área de imunologia e virulência da criptococose.

## 7. Conclusão

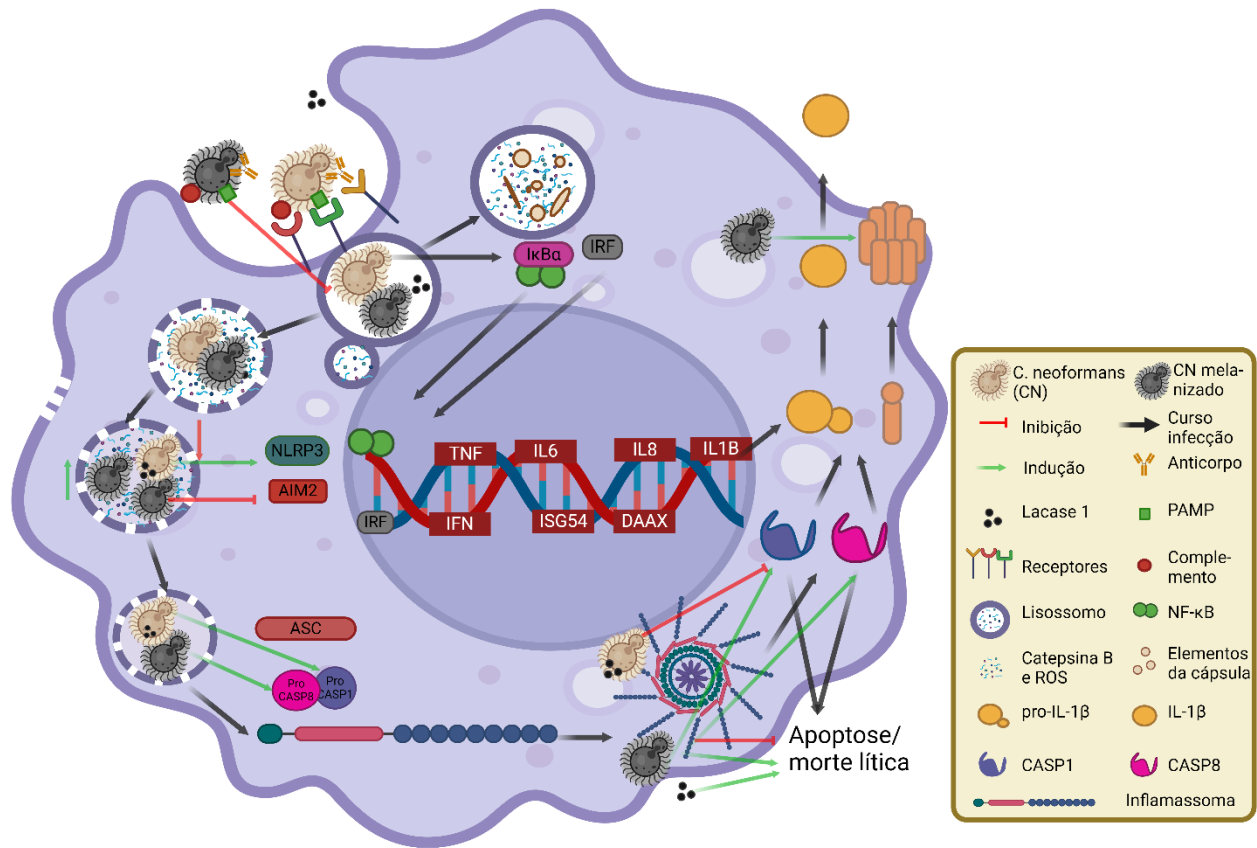
Podemos atestar que mesmo com a ausência de LAC1 em *C. neoformans*, é possível que o fungo produza melanina na presença de seus precursores. Isso indica haver outras enzimas também responsáveis pelo processo de melanização, que ainda são pouco estudadas, abrindo a possibilidade de novos campos de pesquisa sobre o agente etiológico em questão. Além disso, é provável que haja uma participação de quorum-sensing no processo de melanização dessas leveduras, visto que quanto maior a densidade celular, logo maiores fatores extracelulares secretados, mais rápido ocorre a produção de melanina.

O soro humano se apresentou como melhor alternativa para propiciar a opsonização de leveduras de *C. neoformans* e sua internalização por macrófagos humanos, e não houve diferença de opsonização usando soro fresco ou o usando depois de ter sido congelado. Como já foi visto em outros estudos, neste também podemos conferir que na ausência de agente opsonizante, a fagocitose do fungo é basicamente abolida. Ademais, o soro mesmo sem ser inativado, não altera a viabilidade das células humanas alogênicas se for utilizado abaixo de 40% no momento da interação, assim como também não altera a viabilidade das leveduras se estas forem incubadas com soro por 30 min, mesmo se forem incubadas diretamente em soro puro. Nem a melanina nem a LAC1 interferiram na viabilidade de *C. neoformans* na presença de soro, indicando que esses fatores de virulência parecem não interferir na ativação do sistema complemento do hospedeiro.

Concluimos com este trabalho que a presença da melanina em *C. neoformans*, diminuiu sua fagocitose e sua destruição por macrófagos humanos, enquanto LAC1 nas leveduras não parece ter interferência na sua internalização, porém diminuiu sua sobrevivência no interior da célula hospedeira. Apesar dessa diferença na fagocitose, não houve diferença no número de leveduras internalizadas por célula no início da infecção.

A infecção com *C. neoformans* provoca maior morte de macrófagos humanos após 24h de interação, sendo que há um maior apoptose das células nos momentos iniciais da infecção, mas que dá lugar basicamente a uma morte piroptótica nas horas finais. Ademais, a presença da melanina inibiu a apoptose durante todo o curso da infecção, assim como a presença da LAC1, mas esta apenas após 24 h.p.i. O aumento de apoptose dos macrófagos nas primeiras horas de infecção parece ter uma relação direta com a ativação da caspase 8, a qual é clivada nas primeiras horas de infecção. Já a presença predominante de morte lítica na infecção mais tardia coincide com uma clivagem aumentada de caspase 1 de caspase 3, assim como também há uma clivagem

maior de gasdermina D. Os efeitos do fungo nas células hospedeiras e a modulação provocado pela melanina e LAC1 estão sumarizadas na **Figura 49**.

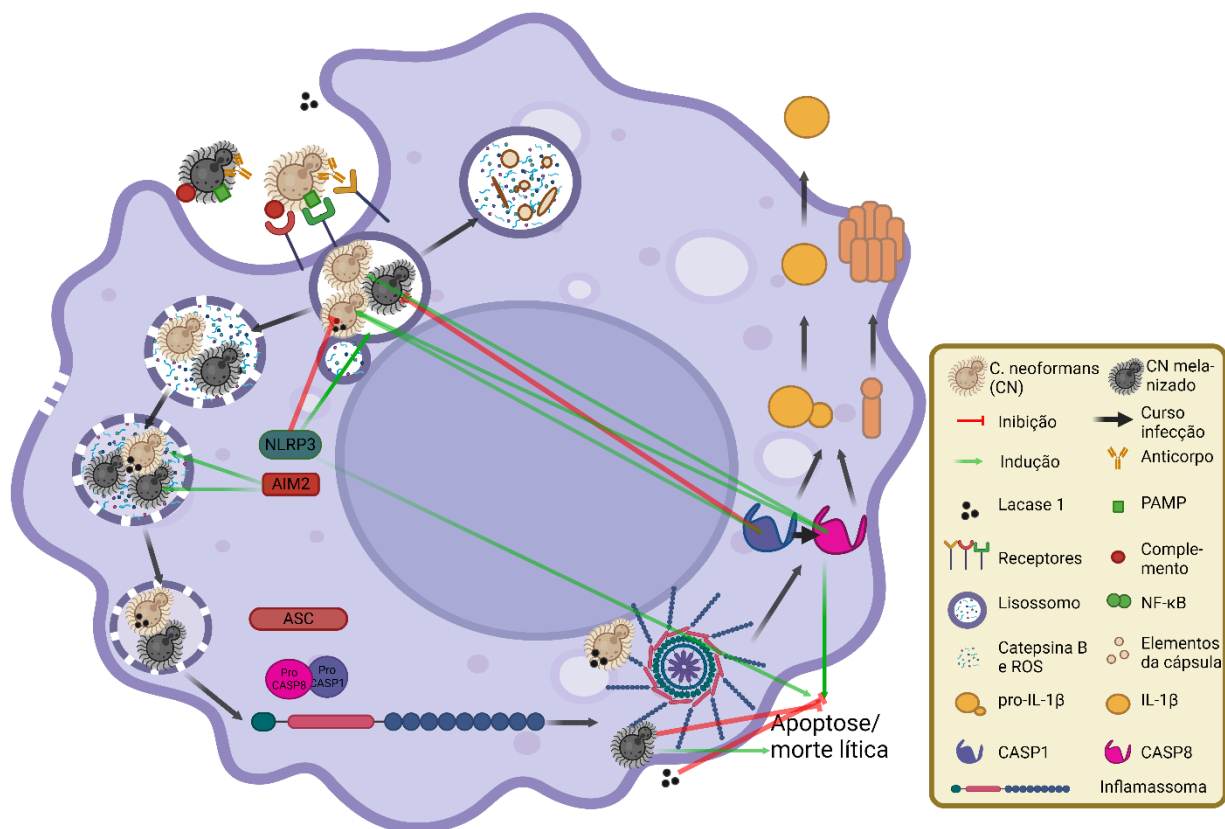


**Figura 49. Papel da infecção de *C. neoformans* na fagocitose, inflamação e morte de macrófagos humanos e interferência da melanina e LAC1 das leveduras nesses mecanismos.**

Leveduras de *C. neoformans* são fagocitadas por macrófagos sob opsonização com proteínas do sistema complemento, o que ativa as vias de transduções do NF-κB e IRF, responsáveis pela expressão e produção de citocinas inflamatórias e de interferons do tipo I, assim como de seus produtos. Uma parte delas são destruídas em seu interior e a outra consegue sobreviver ao longo de 24 h.p.i. O fungo provoca aumento de produção de NLRP3, proCASP1 e proCASP8, além das suas respectivas clivagens, embora com cinéticas distintas. Além disso, a infecção também proporcionou a produção de GSDMD e IL-1β, assim como a clivagem de GSDMD. Podemos observar mais apoptose ocorrendo no início da infecção, enquanto em períodos mais prolongados, a morte lítica predomina, que talvez possa ser explicado pelo aumento de clivagem das CASP8 nos períodos mais precoces e de CASP1 e GSDMD nos mais tardios. A presença da melanina nas leveduras inibe fagocitose e aumenta a sua sobrevivência no interior do macrófago. Esse fator também inibiu a produção de AIM2 no início da infecção, porém fez aumentar a clivagem de GSDMD, coincidindo com o aumento de morte lítica. Enquanto o LAC1 não interferiu na fagocitose, reduziu a sobrevivência das células de levedura dentro dos macrófagos. Além disso, o LAC1 promoveu maior produção de NLRP3, inibição da clivagem de CASP1 e induziu morte lítica.

Além disso, as proteínas NLRP3, CASP8 parecem estar envolvidas nesse processo no início da infecção, visto que estas ativas provocaram aumento da apoptose, enquanto NLRP3, AIM2 e CASP1 proporcionaram uma diminuição em fases mais prolongadas da infecção. Ademais, a presença tanto de melanina como de LAC1 nas leveduras internalizadas, proporcionou uma mitigação da apoptose com consequente aumento de morte lítica das células hospedeiras.

Já em relação a fagocitose, CASP1 e CASP8 nos macrófagos promoveram mais fagocitose de leveduras, enquanto CASP1 parece ser dispensável nesse processo quando as leveduras produzem melanina. Porém, enquanto NLRP3 parece inibir a fagocitose de *C. neoformans*, este provoca o efeito inverso na presença de melanina. Nossos dados também sugerem que apenas o AIM2 pode ter um papel na sobrevivência do fungo, visto que sua inibição causou uma menor carga fúngica, onde a presença de LAC1 nas leveduras ocasionou maior sobrevivência destas. As funções de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 do hospedeiro sob a infecção com *C. neoformans* e como a melanina e LAC1 deste podem modular esses fatores foram sintetizados na **Figura 50**.



**Figura 50. Interferência de NLRP3, AIM2, CASP1 e CASP8 na fagocitose de *C. neoformans* e na inflamação e morte de macrófagos humanos e interferência da melanina e LAC1 das leveduras nesses mecanismos.**

CASP1 e CASP8 parece aumentar a fagocitose de leveduras de *C. neoformans* em macrófagos, porém NLRP3 causou sua diminuição, apesar de tanto NLRP3 e CASP8 estarem relacionado com um acréscimo de apoptose nas células infectadas. Já a melanina e LAC1 do fungo mitigou essa morte apoptótica. CASP1 parece já não ter mais envolvimento na fagocitose das leveduras na presença de melanina. Apenas o AIM2 de macrófagos parece ter função na sobrevivência de leveduras, principalmente quando estas possuem LAC1, visto que AIM2 proporcionou maior replicação fúngica.

Portanto, nossos dados indicam que *C. neoformans* é capaz de provocar a morte de macrófagos humanos. A presença de melanina e de LAC1 provocam menos morte apoptótica, este último apenas em infecções prolongadas de 24 h.p.i. No âmbito do hospedeiro, as proteínas NLRP3 e CASP8 parecem ser responsáveis por causar uma

maior morte apoptótica dos macrófagos sob infecção com o fungo, apesar de modular a fagocitose de modo distinto. Já o AIM2 possibilita maior sobrevivência das leveduras internalizadas. Já a melanina e LAC1 parecem modular a morte celular de macrófagos, ocasionando mais morte lítica quando comparado com a infecção sem a presença desses fatores de virulência.



## 8. Referências bibliográficas:

1. Abadi, J., & Pirofski, L. a (1999). Antibodies reactive with the cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan are present in sera from children with and without human immunodeficiency virus infection. *The Journal of infectious diseases*, 180(3), 915–919. <https://doi.org/10.1086/314953>
2. Akoumianaki, T., Kyrmizi, I., Valsecchi, I., Gresnigt, M. S., Samonis, G., Drakos, E., Boumpas, D., Muszkieta, L., Prevost, M. C., Kontoyiannis, D. P., Chavakis, T., Netea, M. G., van de Veerdonk, F. L., Brakhage, A. A., El-Benna, J., Beauvais, A., Latge, J. P., & Chamilos, G. (2016). Aspergillus Cell Wall Melanin Blocks LC3-Associated Phagocytosis to Promote Pathogenicity. *Cell host & microbe*, 19(1), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.002>
3. Aksenov, S. I., Babyeva, I. P., & Golubev, V. I. (1973). On the mechanism of adaptation of micro-organisms to conditions of extreme low humidity. *Life sciences and space research*, 11, 55–61.
4. Albuquerque, P., Nicola, A. M., Nieves, E., Paes, H. C., Williamson, P. R., Silva-Pereira, I., & Casadevall, A. (2013). Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*, 5(1), e00986-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00986-13>
5. Almeida-Paes, R., Figueiredo-Carvalho, M. H., Brito-Santos, F., Almeida-Silva, F., Oliveira, M. M., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2016). Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. *PLoS one*, 11(3), e0152796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152796>
6. Alviano, C. S., Farbiarz, S. R., De Souza, W., Angluster, J., & Travassos, L. R. (1991). Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Journal of general microbiology*, 137(4), 837–844. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-4-837>
7. Andrianaki, A. M., Kyrmizi, I., Thanopoulou, K., Baldin, C., Drakos, E., Soliman, S. S. M., Shetty, A. C., McCracken, C., Akoumianaki, T., Stylianou, K., Ioannou, P., Pontikoglou, C., Papadaki, H. A., Tzardi, M., Belle, V., Etienne, E., Beauvais, A., Samonis, G., Kontoyiannis, D. P., Andreakos, E., ... Chamilos, G. (2018). Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nature communications*, 9(1), 3333. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05820-2>
8. Barluzzi, R., Brozzetti, A., Mariucci, G., Tantucci, M., Neglia, R. G., Bistoni, F., & Blasi, E. (2000). Establishment of protective immunity against cerebral cryptococcosis by means of an avirulent, non melanogenic *Cryptococcus neoformans* strain. *Journal of Neuroimmunology*, 109(2), 75-86.
9. Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*, 7(2), 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
10. Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*, 7(2), 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
11. Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & molecular immunology*, 18(5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
12. Butler and A W Day (1998). Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*. 44(12): 1115-1136. <https://doi.org/10.1139/w98-119>
13. Frazão, S. O., Sousa, H. R., Silva, L., Folha, J., Gorgonha, K., Oliveira, G. P., Jr, Felipe, M., Silva-Pereira, I., Casadevall, A., Nicola, A. M., & Albuquerque, P. (2020). Laccase Affects the Rate of *Cryptococcus neoformans* Nonlytic Exocytosis from Macrophages. *mBio*, 11(5), e02085-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02085-20>
14. FROMTLING, R. A., SHADOMY, H. J. & JACOBSON, E. S. 1982. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 79, 23-29.
15. Fu, M. S., Coelho, C., De Leon-Rodriguez, C. M., Rossi, D. C. P., Camacho, E., Jung, E. H., Kulkarni, M., & Casadevall, A. (2018). *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. *PLoS pathogens*, 14(6), e1007144. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007144>
16. Ganesan, S., Rathinam, V. A. K., Bossaller, L., Army, K., Kaiser, W. J., Mocarski, E. S., Dillon, C. P., Green, D. R., Mayadas, T. N., Levitz, S. M., Hise, A. G., Silverman, N., & Fitzgerald, K. A. (2014). Caspase-8 modulates dectin-1 and complement receptor

- 3-driven IL-1 $\beta$  production in response to  $\beta$ -glucans and the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(5), 2519–2530. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400276>
17. Garcia-Hermoso, D., Janbon, G., & Dromer, F. (1999). Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal of clinical microbiology*, 37(10), 3204–3209. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3204-3209.1999>
  18. Ghaderi, Z., Eidi, S., & Razmyar, J. (2019). High Prevalence of *Cryptococcus neoformans* and Isolation of Other Opportunistic Fungi From Pigeon (*Columba livia*) Droppings in Northeast Iran. *Journal of avian medicine and surgery*, 33(4), 335–339. <https://doi.org/10.1647/2018-370>
  19. Giles, S. S., Dagenais, T. R., Botts, M. R., Keller, N. P., & Hull, C. M. (2009). Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(8), 3491–3500. <https://doi.org/10.1128/IAI.00334-09>
  20. Goldman, D. L., Khine, H., Abadi, J., Lindenberg, D. J., Pirofski La, Niang, R., & Casadevall, A. (2001). Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics*, 107(5), E66. <https://doi.org/10.1542/peds.107.5.e66>
  21. Granger, D. L., Perfect, J. R., & Durack, D. T. (1985). Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *The Journal of clinical investigation*, 76(2), 508–516. <https://doi.org/10.1172/JCI112000>
  22. Griffin F. M., Jr (1981). Roles of macrophage Fc and C3b receptors in phagocytosis of immunologically coated *Cryptococcus neoformans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(6), 3853–3857. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3853>
  23. Gringhuis, S. I., Kaptein, T. M., Wevers, B. A., Theelen, B., van der Vlist, M., Boekhout, T., & Geijtenbeek, T. B. (2012). Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 $\beta$  via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nature immunology*, 13(3), 246–254. <https://doi.org/10.1038/ni.2222>
  24. Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschläger, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Mocsai, A., Tschopp, J., & Ruland, J. (2009). Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*, 459(7245), 433–436. <https://doi.org/10.1038/nature07965>
  25. Guerra, C. R., Seabra, S. H., de Souza, W., & Rozental, S. (2014). *Cryptococcus neoformans* is internalized by receptor-mediated or 'triggered' phagocytosis, dependent on actin recruitment. *PloS one*, 9(2), e89250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089250>
  26. H.S. Emery, C.P. Shelburne, J.P. Bowman, P.G. Fallon, C.A. Schulz, E.S. Jacobson (1995). **Genetic study of oxygen resistance and melanization in *Cryptococcus neoformans***. *Infect Immun*, 62, pp. 5694-5697
  27. Hajjeh, R. A., Brandt, M. E., & Pinner, R. W. (1995). Emergence of cryptococcal disease: epidemiologic perspectives 100 years after its discovery. *Epidemiologic reviews*, 17(2), 303–320. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036195>
  28. Harrison, T. S., Chen, J., Simons, E., & Levitz, S. M. (2002). Determination of the pH of the *Cryptococcus neoformans* vacuole. *Medical mycology*, 40(3), 329–332. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.3.329.332>
  29. Hatch T. F. (1961). Distribution and deposition of inhaled particles in respiratory tract. *Bacteriological reviews*, 25(3), 237–240. <https://doi.org/10.1128/br.25.3.237-240.1961>
  30. Hayes, J. B., Sircy, L. M., Heusinkveld, L. E., Ding, W., Leander, R. N., McClelland, E. E., & Nelson, D. E. (2016). Modulation of Macrophage Inflammatory Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Signaling by Intracellular *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of biological chemistry*, 291(30), 15614–15627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.738187>
  31. He, W. T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., Yang, Z. H., Zhong, C. Q., & Han, J. (2015). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion. *Cell research*, 25(12), 1285–1298. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.139>
  32. Hiscott J. (2007). Convergence of the NF-kappaB and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response. *Cytokine & growth factor reviews*, 18(5-6), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.06.002>
  33. Hise, A. G., Tomalka, J., Ganesan, S., Patel, K., Hall, B. A., Brown, G. D., & Fitzgerald, K. A. (2009). An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell host & microbe*, 5(5), 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.002>

34. <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/ cryptococcosis-neoformans/index.html>
35. Huang, D. C., Hahne, M., Schroeter, M., Frei, K., Fontana, A., Villunger, A., Newton, K., Tschopp, J., & Strasser, A. (1999). Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 14871–14876. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14871>
36. Huang, H. R., Li, F., Han, H., Xu, X., Li, N., Wang, S., Xu, J. F., & Jia, X. M. (2018). Dectin-3 Recognizes Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Serotype AD and *Cryptococcus gattii* Serotype B to Initiate Host Defense Against Cryptococcosis. *Frontiers in immunology*, 9, 1781. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01781>
37. Huffnagle, G. B., Chen, G. H., Curtis, J. L., McDonald, R. A., Strieter, R. M., & Toews, G. B. (1995). Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(7), 3507–3516.
38. Ibrahim, A. S., Filler, S. G., Alcouloumre, M. S., Kozel, T. R., Edwards, J. E., Jr, & Ghannoum, M. A. (1995). Adherence to and damage of endothelial cells by *Cryptococcus neoformans* in vitro: role of the capsule. *Infection and immunity*, 63(11), 4368–4374. <https://doi.org/10.1128/iai.63.11.4368-4374.1995>
39. Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E. S., & Shinoda, T. (2003). Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiology and immunology*, 47(4), 271–277. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03395.x>
40. Jacobson E. S. (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 708–717. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.708>
41. Jacobson ES, Emery HS: Catecholamine uptake, melanization, and oxygen toxicity in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 1991,173:401-403.
42. Jacobson ES, Hong JD: Redox buffering by melanin and Fe(II) in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 1997, 179:5340-5346.
43. Jacobson ES, Tinnell SB: Antioxidant function of fungal melanin. *J Bacteriol* 1993, 175:7102-7104.
44. Jahn, B., Langfelder, K., Schneider, U., Schindel, C., & Brakhage, A. A. (2002). PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cellular microbiology*, 4(12), 793–803. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00228.x>
45. Jain, A. V., Zhang, Y., Fields, W. B., McNamara, D. A., Choe, M. Y., Chen, G. H., Erb-Downward, J., Osterholzer, J. J., Toews, G. B., Huffnagle, G. B., & Olszewski, M. A. (2009). Th2 but not Th1 immune bias results in altered lung functions in a murine model of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Infection and immunity*, 77(12), 5389–5399. <https://doi.org/10.1128/IAI.00809-09>
46. Janeway C. A., Jr (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 54 Pt 1, 1–13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>
47. Kapica, L., & Shaw, C. E. (1969). Improvement in laboratory diagnosis of pulmonary cryptococcosis. *Canadian Medical Association journal*, 101(10), 47–50.
48. Kechichian, T. B., Shea, J., & Del Poeta, M. (2007). Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infection and immunity*, 75(10), 4792–4798. <https://doi.org/10.1128/IAI.00587-07>
49. Kelly, R. M., Chen, J., Yauch, L. E., & Levitz, S. M. (2005). Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 73(1), 592–598. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.592-598.2005>
50. Korth, H., & Pulverer, G. (1971). Pigment formation for differentiating *Cryptococcus neoformans* from *Candida albicans*. *Applied microbiology*, 21(3), 541–542. <https://doi.org/10.1128/am.21.3.541-542.1971>
51. Kozel, T. R., & McGaw, T. G. (1979). Opsonization of *Cryptococcus neoformans* by human immunoglobulin G: role of immunoglobulin G in phagocytosis by macrophages. *Infection and immunity*, 25(1), 255–261. <https://doi.org/10.1128/iai.25.1.255-261.1979>
52. Kozel, T. R., Highison, B., & Stratton, C. J. (1984). Localization on encapsulated *Cryptococcus neoformans* of serum components opsonic for phagocytosis by macrophages and neutrophils. *Infection and immunity*, 43(2), 574–579. <https://doi.org/10.1128/iai.43.2.574-579.1984>
53. Kruidering, M., & Evan, G. I. (2000). Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB life*, 50(2), 85–90. <https://doi.org/10.1080/713803693>



54. Kwon-Chung K.J, Bennett J.E. (1984). Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol*;120: 123-30.
55. Kwon-Chung, K. J., & Rhodes, J. C. (1986). Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 51(1), 218–223. <https://doi.org/10.1128/iai.51.1.218-223.1986>
56. Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I., & Popkin, T. J. (1982). Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *Journal of bacteriology*, 150(3), 1414–1421. <https://doi.org/10.1128/jb.150.3.1414-1421.1982>
57. Lee, S. C., Dickson, D. W., & Casadevall, A. (1996). Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications. *Human pathology*, 27(8), 839-847.
58. Lee, S. C., Dickson, D. W., & Casadevall, A. (1996). Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications. *Human pathology*, 27(8), 839-847.
59. Lei, G., Chen, M., Li, H., Niu, J. L., Wu, S., Mao, L., Lu, A., Wang, H., Chen, W., Xu, B., Leng, Q., Xu, C., Yang, G., An, L., Zhu, L. P., & Meng, G. (2013). Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Cell research*, 23(7), 965–968. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.49>
60. Leopold Wager, C. M., Hole, C. R., Wozniak, K. L., Olszewski, M. A., & Wormley, F. L., Jr (2014). STAT1 signaling is essential for protection against *Cryptococcus neoformans* infection in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(8), 4060–4071. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400318>
61. Levitz SM (1994) Macrophage–Cryptococcus interactions. *Immunol Ser* 60: 533–543.
62. Li, Y. N., Wang, Z. W., Li, F., Zhou, L. H., Jiang, Y. S., Yu, Y., Ma, H. H., Zhu, L. P., Qu, J. M., & Jia, X. M. (2022). Inhibition of myeloid-derived suppressor cell arginase-1 production enhances T-cell-based immunotherapy against *Cryptococcus neoformans* infection. *Nature communications*, 13(1), 4074. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31723-4>
63. LITTMAN, M. L., & SCHNEIERSON, S. S. (1959). *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. *American journal of hygiene*, 69(1), 49–59. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119980>
64. Liu, L., Tewari, R. P., & Williamson, P. R. (1999). Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infection and immunity*, 67(11), 6034–6039. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.11.6034-6039.1999>
65. Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>.
66. Lupo, P., Chang, Y. C., Kelsall, B. L., Farber, J. M., Pietrella, D., Vecchiarelli, A., ... & Kwon-Chung, K. J. (2008). The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. *Infection and immunity*, 76(4), 1581-1589.
67. Macher, A. M., Bennett, J. E., Gadek, J. E., & Frank, M. M. (1978). Complement depletion in cryptococcal sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 120(5), 1686–1690.
68. Madrid, I. M., Xavier, M. O., Mattei, A. S., Fernandes, C. G., Guim, T. N., Santin, R., Schuch, L. F., Nobre, M.deO., & Araújo Meireles, M. C. (2010). Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes and infection*, 12(2), 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.10.004>
69. Mahrus S, Trinidad JC, Barkan DT, Sali A, Burlingame AL, Wells JA. 2008. Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini. *Cell* 134: 866–876.
70. Mansour MK & Levitz SM (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* 5: 359–365.
71. Mao, L., Zhang, L., Li, H., Chen, W., Wang, H., Wu, S., Guo, C., Lu, A., Yang, G., An, L., Abliz, P., & Meng, G. (2014). Pathogenic fungus *Microsporium canis* activates the NLRP3 inflammasome. *Infection and immunity*, 82(2), 882–892. <https://doi.org/10.1128/IAI.01097-13>
72. Martin, S. J., Finucane, D. M., Amarante-Mendes, G. P., O'Brien, G. A., & Green, D. R. (1996). Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *The Journal of biological chemistry*, 271(46), 28753–28756. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.28753>
73. Matsunaga, K., & Ito, M. (2000). Quantitative analysis of apoptotic cell death in granulomatous inflammation induced by intravenous challenge with *Cryptococcus*

- neoformans and bacillus Calmette-Guérin vaccine. *Pathology international*, 50(3), 206–218. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.2000.01025.x>
74. McClelland, E. E., Bernhardt, P., & Casadevall, A. (2006). Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infection and immunity*, 74(3), 1500–1504. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1500-1504.2006>
  75. McClelland, E. E., Bernhardt, P., & Casadevall, A. (2006). Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infection and immunity*, 74(3), 1500–1504. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1500-1504.2006>
  76. McQuiston T & Del Poeta M (2011) The interaction of *Cryptococcus neoformans* with host macrophages and neutrophils. *Cryptococcus from Human Pathogen to Model Yeast* (Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR & Casadevall A, eds), pp. 373–387.
  77. Mohagheghpour, N., Waleh, N., Garger, S. J., Dousman, L., Grill, L. K., & Tusé, D. (2000). Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. *Cellular immunology*, 199(1), 25–36. <https://doi.org/10.1006/cimm.1999.1599>
  78. Molez J. F. (1998). The historical question of acquired immunodeficiency syndrome in the 1960s in the Congo River basin area in relation to cryptococcal meningitis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 58(3), 273–276. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.273>
  79. Molez J. F. (1998). The historical question of acquired immunodeficiency syndrome in the 1960s in the Congo River basin area in relation to cryptococcal meningitis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 58(3), 273–276. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.273>
  30. Molloy SF, Chiller T, Greene GS, Burry J, Govender NP, Kanyama C, *et al* Cryptococcal meningitis: a neglected NTD? *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;29(11(6)):e0005575
  31. Monari, C., Baldelli, F., Pietrella, D., Retini, C., Tascini, C., Francisci, D., Bistoni, F., & Vecchiarelli, A. (1997). Monocyte dysfunction in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) versus *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of infection*, 35(3), 257–263. [https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(97\)93042-5](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(97)93042-5)
  32. Moret, I., Lorenzo, M. J., Sarria, B., Cases, E., Morcillo, E., Perpiñá, M., Molina, J. M., & Menéndez, R. (2011). Increased lung neutrophil apoptosis and inflammation resolution in nonresponding pneumonia. *The European respiratory journal*, 38(5), 1158–1164. <https://doi.org/10.1183/09031936.00190410>
  33. Moret, I., Lorenzo, M. J., Sarria, B., Cases, E., Morcillo, E., Perpiñá, M., Molina, J. M., & Menéndez, R. (2011). Increased lung neutrophil apoptosis and inflammation resolution in nonresponding pneumonia. *The European respiratory journal*, 38(5), 1158–1164. <https://doi.org/10.1183/09031936.00190410>
  34. Morgan, E., Varro, R., Sepulveda, H., Ember, J. A., Apgar, J., Wilson, J., Lowe, L., Chen, R., Shivraj, L., Agadir, A., Campos, R., Ernst, D., & Gaur, A. (2004). Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 110(3), 252–266. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2003.11.017>
  35. Morris-Jones, R., Gomez, B. L., Diez, S., Uran, M., Morris-Jones, S. D., Casadevall, A., Nosanchuk, J. D., & Hamilton, A. J. (2005). Synthesis of melanin pigment by *Candida albicans* in vitro and during infection. *Infection and immunity*, 73(9), 6147–6150. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.6147-6150.2005>
  36. Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355–365.
  37. Naito, M., Nagashima, K., Mashima, T., & Tsuruo, T. (1997). Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1 beta-converting enzyme family protease activation during apoptosis. *Blood*, 89(6), 2060–2066.
  38. Nakamura, K., Miyazato, A., Xiao, G., Hatta, M., Inden, K., Aoyagi, T., Shiratori, K., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Suzuki, K., Fujita, J., Kaku, M., & Kawakami, K. (2008). Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(6), 4067–4074. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4067>
  39. Negishi, H., Taniguchi, T., & Yanai, H. (2018). The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(11), a028423. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423>
  90. Neilson, J. B., Fromtling, R. A., & Bulmer, G. S. (1977). *Cryptococcus neoformans*: size range of infectious particles from aerosolized soil. *Infection and immunity*, 17(3), 634–638. <https://doi.org/10.1128/iai.17.3.634-638.1977>

91. Nicola, A. M., Robertson, E. J., Albuquerque, P., Derengowski, L., & Casadevall, A. (2011). Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs *in vivo* and is influenced by phagosomal pH. *mBio*, 2(4), e00167-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00167-11>
92. Nosanchuk J.D, Valadon P., Feldmesser M., Casadevall A. (1999). **Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection** *Mol Cell Biol*, 19, pp. 745-750
93. Nosanchuk JD, Casadevall A. (1997). Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melatonin, and monoclonal antibody binding. *Infect Immun*, 65:1836-1841.
94. Nosanchuk, J. D., and Casadevall, A. (2003a). Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology* 149(Pt 7), 1945–1951. doi: 10.1099/mic.0.26333-0 00268.x0
95. Nosanchuk, J. D., and Casadevall, A. (2003b). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 5, 203–223. doi: 10.1046/j.1462-5814.2003.
96. Nosanchuk, J. D., and Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3519–3528. doi: 10.1128/AAC.00545-06
97. Nosanchuk, J. D., Gómez, B. L., Youngchim, S., Díez, S., Aisen, P., Zancopé-Oliveira, R. M., Restrepo, A., Casadevall, A., & Hamilton, A. J. (2002). *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments *in vitro* and during mammalian infection. *Infection and immunity*, 70(9), 5124–5131. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.5124-5131.2002>
98. Nosanchuk, J. D., Ovalle, R., and Casadevall, A. (2001). Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. *J. Infect. Dis.* 183, 1093–1099. doi: 10.1086/319272
99. Nosanchuk, J. D., Rosas, A. L., Lee, S. C., & Casadevall, A. (2000). Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet (London, England)*, 355(9220), 2049–2050. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02356-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02356-4)
100. Nosanchuk, J. D., Rudolph, J., Rosas, A. L., & Casadevall, A. (1999). Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. *Infection and immunity*, 67(10), 5477–5479. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.10.5477-5479.1999>
101. Nosanchuk, J. D., Rudolph, J., Rosas, A. L., & Casadevall, A. (1999). Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. *Infection and immunity*, 67(10), 5477–5479. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.10.5477-5479.1999>
102. Nosanchuk, J. D., van Duin, D., Mandal, P., Aisen, P., Legendre, A. M., & Casadevall, A. (2004). *Blastomyces dermatitidis* produces melanin *in vitro* and during infection. *FEMS microbiology letters*, 239(1), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.040>
103. Nosanchuk, J. D., Yu, J. J., Hung, C. Y., Casadevall, A., & Cole, G. T. (2007). *Coccidioides posadasii* produces melanin *in vitro* and during infection. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 44(6), 517–520. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.09.006>
104. Noverr, M. C., Williamson, P. R., Fajardo, R. S., and Huffnagle, G. B. (2004). CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. *Infect. Immun.* 72, 1693–1699. doi: 10.1128/IAI.72.3.1693-1699.2004
105. Nurudeen, T. A., & Ahearn, D. G. (1979). Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *Journal of clinical microbiology*, 10(5), 724–729. <https://doi.org/10.1128/jcm.10.5.724-729.1979>
106. Panepinto, J., Komperda, K., Frases, S., Park, Y. D., Djordjevic, J. T., Casadevall, A., & Williamson, P. R. (2009). Sec6-dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*, 71(5), 1165-1176.
107. Panepinto, J., Komperda, K., Frases, S., Park, Y. D., Djordjevic, J. T., Casadevall, A., & Williamson, P. R. (2009). Sec6-dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*, 71(5), 1165-1176.
108. Perfect JR. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 8th. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. pp. 2934–48
109. Pericolini, E., Cenci, E., Monari, C., De Jesus, M., Bistoni, F., Casadevall, A., & Vecchiarelli, A. (2006). *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of



- caspase-8. *Cellular microbiology*, 8(2), 267–275. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00619.x>
110. Pericolini, E., Cenci, E., Monari, C., De Jesus, M., Bistoni, F., Casadevall, A., & Vecchiarelli, A. (2006). Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. *Cellular microbiology*, 8(2), 267–275. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00619.x>
  111. Pericolini, E., Gabrielli, E., Bistoni, G., Cenci, E., Perito, S., Chow, S. K., Riuzzi, F., Donato, R., Casadevall, A., & Vecchiarelli, A. (2010). Role of CD45 signaling pathway in galactoxylomannan-induced T cell damage. *PloS one*, 5(9), e12720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012720>
  112. Pericolini, E., Gabrielli, E., Bistoni, G., Cenci, E., Perito, S., Chow, S. K., Riuzzi, F., Donato, R., Casadevall, A., & Vecchiarelli, A. (2010). Role of CD45 signaling pathway in galactoxylomannan-induced T cell damage. *PloS one*, 5(9), e12720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012720>
  113. Pericolini, E., Gabrielli, E., Cenci, E., De Jesus, M., Bistoni, F., Casadevall, A., & Vecchiarelli, A. (2009). Involvement of glycoreceptors in galactoxylomannan-induced T cell death. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(10), 6003–6010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803833>
  114. Polacheck, I., & Kwon-Chung, K. J. (1988). Melanogenesis in Cryptococcus neoformans. *Journal of general microbiology*, 134(4), 1037–1041. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-4-1037>
  115. POLACHECK, I., HEARING, V. J. & KWON-CHUNG, K. J. (1982). Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in Cryptococcus neoformans. *Journal of Bacteriology* 150, 1212-1 220
  116. Polacheck, I., Hearing, V. J., & Kwon-Chung, K. J. (1982). Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in Cryptococcus neoformans. *Journal of bacteriology*, 150(3), 1212–1220. <https://doi.org/10.1128/jb.150.3.1212-1220.1982>
  117. Polacheck, I., Platt, Y., & Aronovitch, J. (1990). Catecholamines and virulence of Cryptococcus neoformans. *Infection and immunity*, 58(9), 2919–2922. <https://doi.org/10.1128/iai.58.9.2919-2922.1990>
  118. Powell, K. E., Dahl, B. A., Weeks, R. J., & Tosh, F. E. (1972). Airborne Cryptococcus neoformans: particles from pigeon excreta compatible with alveolar deposition. *The Journal of infectious diseases*, 125(4), 412–415. <https://doi.org/10.1093/infdis/125.4.412>
  119. Pukkila-Worley, R., Gerrald, Q. D., Kraus, P. R., Boily, M. J., Davis, M. J., Giles, S. S., Cox, G. M., Heitman, J., & Alspaugh, J. A. (2005). Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryotic cell*, 4(1), 190–201. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.190-201.2005>
  120. Rajasingham, R., Govender, N. P., Jordan, A., Loyse, A., Shroufi, A., Denning, D. W., Meya, D. B., Chiller, T. M., & Boulware, D. R. (2022). The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, S1473-3099(22)00499-6. Advance online publication. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00499-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00499-6)
  121. Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., Denning, D. W., Loyse, A., & Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, 17(8), 873–881. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
  122. Redlich, S., Ribes, S., Schütze, S., Eiffert, H., & Nau, R. (2013). Toll-like receptor stimulation increases phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by microglial cells. *Journal of neuroinflammation*, 10, 71. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-71>
  123. Redlich, S., Ribes, S., Schütze, S., Eiffert, H., & Nau, R. (2013). Toll-like receptor stimulation increases phagocytosis of Cryptococcus neoformans by microglial cells. *Journal of neuroinflammation*, 10, 71. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-71>
  124. Rhodes, J. C. (1986). A simplified assay for cryptococcal phenoloxidase. *Mycologia* 78:867-868.
  125. Rhodes, J. C., Polacheck, I., & Kwon-Chung, K. J. (1982). Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of Cryptococcus neoformans. *Infection and immunity*, 36(3), 1175–1184. <https://doi.org/10.1128/iai.36.3.1175-1184.1982>
  126. Rhodes, J. C., Wicker, L. S., & Urba, W. J. (1980). Genetic control of susceptibility to Cryptococcus neoformans in mice. *Infection and immunity*, 29(2), 494–499. <https://doi.org/10.1128/iai.29.2.494-499.1980>

127. Rodrigues ML. Funding and innovation in diseases of neglected populations: the paradox of cryptococcal meningitis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004429
128. Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C., & Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic cell*, 7(1), 58-67.
129. Rohatgi, S., & Pirofski, L. A. (2015). Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future microbiology*, 10(4), 565–581. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.132>
130. Rohatgi, S., & Pirofski, L. A. (2015). Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future microbiology*, 10(4), 565–581. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.132>
131. Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., & Torres-Guerrero, H. (2000). Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and immunity*, 68(6), 3696–3703. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3696-3703.2000>
132. Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., & Torres-Guerrero, H. (2000). Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and immunity*, 68(6), 3696–3703. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3696-3703.2000>
133. Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed research international*, 2017, 9042851. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>
134. Rosario, I., Hermoso de Mendoza, M., Déniz, S., Soro, G., Alamo, I., & Acosta, B. (2005). Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses*, 48(6), 421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01153.x>
135. Rosario, I., Hermoso de Mendoza, M., Déniz, S., Soro, G., Alamo, I., & Acosta, B. (2005). Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses*, 48(6), 421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01153.x>
136. Rosas, A. L., & Casadevall, A. (1997). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS microbiology letters*, 153(2), 265–272. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12584.x>
137. Rosas, A. L., & Casadevall, A. (1997). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS microbiology letters*, 153(2), 265–272. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12584.x>
138. Rosas, A. L., & Casadevall, A. (2001). Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. *Mycopathologia*, 151(2), 53–56. <https://doi.org/10.1023/a:1010977107089>
139. Rosas, A. L., & Casadevall, A. (2001). Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. *Mycopathologia*, 151(2), 53–56. <https://doi.org/10.1023/a:1010977107089>
140. Rosas, A. L., MacGill, R. S., Nosanchuk, J. D., Kozel, T. R., & Casadevall, A. (2002). Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(1), 144–148. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.1.144-148.2002>
141. Rosas, A. L., Nosanchuk, J. D., Feldmesser, M., Cox, G. M., McDade, H. C., & Casadevall, A. (2000). Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. *Infection and immunity*, 68(5), 2845–2853. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.2845-2853.2000>
142. Rossi, A. G., Hallett, J. M., Sawatzky, D. A., Teixeira, M. M., & Haslett, C. (2007). Modulation of granulocyte apoptosis can influence the resolution of inflammation. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 2), 288–291. <https://doi.org/10.1042/BST0350288>
143. Rossi, A. G., Sawatzky, D. A., Walker, A., Ward, C., Sheldrake, T. A., Riley, N. A., Caldicott, A., Martinez-Losa, M., Walker, T. R., Duffin, R., Gray, M., Crescenzi, E., Martin, M. C., Brady, H. J., Savill, J. S., Dransfield, I., & Haslett, C. (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nature medicine*, 12(9), 1056–1064. <https://doi.org/10.1038/nm1468>
144. Sabiiti, W., & May, R. C. (2012). Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future microbiology*, 7(11), 1297–1313. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.102>
145. Sabiiti, W., Robertson, E., Beale, M. A., Johnston, S. A., Brouwer, A. E., Loyse, A., Jarvis, J. N., Gilbert, A. S., Fisher, M. C., Harrison, T. S., May, R. C., & Bicanic, T. (2014). Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of



- HIV-associated cryptococcosis. *The Journal of clinical investigation*, 124(5), 2000–2008. <https://doi.org/10.1172/JCI72950>
146. Saïd-Sadier, N., Padilla, E., Langsley, G., & Ojcius, D. M. (2010). *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PloS one*, 5(4), e10008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010008>
  147. Salas, S. D., Bennett, J. E., Kwon-Chung, K. J., Perfect, J. R., and Williamson, P. R. (1996). Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Exp. Med.* 184, 377–386. doi: 10.1084/jem.184.2.377
  148. Santiago-Burgos, E. J., Stuckey, P. V., & Santiago-Tirado, F. H. (2022). Real-time visualization of phagosomal pH manipulation by *Cryptococcus neoformans* in an immune signal-dependent way. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 967486. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.967486>
  149. Sapmak, A., Kaewmalakul, J., Nosanchuk, J. D., Vanittanakom, N., Andrianopoulos, A., Pruksaphon, K., & Youngchim, S. (2016). *Talaromyces marneffeii* laccase modifies THP-1 macrophage responses. *Virulence*, 7(6), 702–717. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1193275>
  150. Schnitzler N, Peltroche-Llacsahuanga H, Bestier N, Zundorf J, Lutticken R, Haase G: Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infect Immun* 1999, 67:94-101
  151. Shao, X., Mednick, A., Alvarez, M., van Rooijen, N., Casadevall, A., & Goldman, D. L. (2005). An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 175(5), 3244–3251. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3244>
  152. Shaw, C. E., & Kapica, L. (1972). Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Applied microbiology*, 24(5), 824–830. <https://doi.org/10.1128/am.24.5.824-830.1972>
  153. Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., & Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526(7575), 660–665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
  154. Shields, A. B., & Ajello, L. (1966). Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science (New York, N.Y.)*, 151(3707), 208–209. <https://doi.org/10.1126/science.151.3707.208>
  155. Shoham, S., Huang, C., Chen, J. M., Golenbock, D. T., & Levitz, S. M. (2001). Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 166(7), 4620–4626. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4620>
  156. Soliman, S. S. M., Hamdy, R., Elseginy, S. A., Gebremariam, T., Hamoda, A. M., Madkour, M., Venkatachalam, T., Ershaid, M. N., Mohammad, M. G., Chamilos, G., & Ibrahim, A. S. (2020). Selective inhibition of *Rhizopus eumelanin* biosynthesis by novel natural product scaffold-based designs caused significant inhibition of fungal pathogenesis. *The Biochemical journal*, 477(13), 2489–2507. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200310>
  157. Song, Y., Yao, L., Zhen, Y., Cui, Y., Zhong, S., Liu, Y., & Li, S. (2021). *Sporothrix globosa* melanin inhibits antigen presentation by macrophages and enhances deep organ dissemination. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 52(1), 19–31. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00345-7>
  158. Staib F, M. Seibold, E. Antweiler, B. Frohlich, S. Weber, A. Blisse (1987).
  159. STAIB, F. (1962). *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D.C.). *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde und Hygiene* 148, 466- 475
  160. Staib, F. (1962). Vogelkot, ein Nahrungssubstrat fir die Gatung *Cryptococcus*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infek-tionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.* 186:233-247.
  161. Staib, F., H. S. Randhawa, G. Grosse, and A. Blisse. (1973). *Cryptococcose*. Zur Identifizierung von *Cryptococcus neoformans* aus klinischem Untersuchungsmaterial.
  162. Staib, F., Seibold, M., Antweiler, E., Fröhlich, B., Weber, S., & Blisse, A. (1987). The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology*, 266(1-2), 167–177. [https://doi.org/10.1016/s0176-6724\(87\)80030-5](https://doi.org/10.1016/s0176-6724(87)80030-5)

163. Staib, M. Seibold, E. Antweiler, B. Frohlich, S. Weber, A. Blisse (1987).
164. Strachan, A. A., Yu, R. J., & Blank, F. (1971). Pigment production of *Cryptococcus neoformans* grown with extracts of *Guizotia abyssinica*. *Applied microbiology*, 22(3), 478–479. <https://doi.org/10.1128/am.22.3.478-479.1971>
165. Strachan, A. A., Yu, R. J., & Blank, F. (1971). Pigment production of *Cryptococcus neoformans* grown with extracts of *Guizotia abyssinica*. *Applied microbiology*, 22(3), 478–479. <https://doi.org/10.1128/am.22.3.478-479.1971>
166. Stutz, A., Horvath, G. L., Monks, B. G., & Latz, E. (2013). ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1040, 91–101. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1_8)
167. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, et al. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192: 571–580.
168. Syme, R. M., Spurrell, J. C., Amankwah, E. K., Green, F. H., & Mody, C. H. (2002). Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fcγ receptor II for presentation to T lymphocytes. *Infection and immunity*, 70(11), 5972–5981. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.5972-5981.2002>
169. Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
170. Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(3), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
171. Thak, E. J., Lee, S. B., Xu-Vanpala, S., Lee, D. J., Chung, S. Y., Bahn, Y. S., Oh, D. B., Shinohara, M. L., & Kang, H. A. (2020). Core N-Glycan Structures Are Critical for the Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* by Modulating Host Cell Death. *mBio*, 11(3), e00711-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00711-20>
172. Staib, F., Seibold, M., Antweiler, E., Fröhlich, B., Weber, S., & Blisse, A. (1987). The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology*, 266(1-2), 167–177. [https://doi.org/10.1016/s0176-6724\(87\)80030-5](https://doi.org/10.1016/s0176-6724(87)80030-5)
173. Tsai, H. F., Chang, Y. C., Washburn, R. G., Wheeler, M. H., & Kwon-Chung, K. J. (1998). The developmentally regulated alb1 gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *Journal of bacteriology*, 180(12), 3031–3038. <https://doi.org/10.1128/JB.180.12.3031-3038.1998>
174. Tucker, S. C., & Casadevall, A. (2002). Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3165–3170. <https://doi.org/10.1073/pnas.052702799>
175. Tummers, B., & Green, D. R. (2017). Caspase-8: regulating life and death. *Immunological reviews*, 277(1), 76–89. <https://doi.org/10.1111/imr.12541>
176. van Asbeck, E. C., Hoepelman, A. I., Scharringa, J., Herpers, B. L., & Verhoef, J. (2008). Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells. *BMC microbiology*, 8, 229. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-229>
177. van Duin, D., Casadevall, A., & Nosanchuk, J. D. (2002). Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11), 3394–3400. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3394-3400.2002>
178. Vartivarian, S. E., Anaissie, E. J., Cowart, R. E., Sprigg, H. A., Tingler, M. J., & Jacobson, E. S. (1993). Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *The Journal of infectious diseases*, 167(1), 186–190. <https://doi.org/10.1093/infdis/167.1.186>
179. Vecchiarelli, A., Dottorini, M., Pietrella, D., Monari, C., Retini, C., Todisco, T., & Bistoni, F. (1994). Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 11(2), 130–137. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.11.2.8049074>
180. Vecchiarelli, A., Pietrella, D., Lupo, P., Bistoni, F., McFadden, D. C., & Casadevall, A. (2003). The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. *Journal of leukocyte biology*, 74(3), 370–378. <https://doi.org/10.1189/jlb.1002476>

181. Vecchiarelli, A., Retini, C., Pietrella, D., Monari, C., Tascini, C., Beccari, T., & Kozel, T. R. (1995). Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. *Infection and immunity*, 63(8), 2919-2923.
182. Velagapudi, R., Hsueh, Y. P., Geunes-Boyer, S., Wright, J. R., & Heitman, J. (2009). Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(10), 4345–4355. <https://doi.org/10.1128/IAI.00542-09>
183. Villena, S. N., Pinheiro, R. O., Pinheiro, C. S., Nunes, M. P., Takiya, C. M., DosReis, G. A., Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., & Freire-de-Lima, C. G. (2008). Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cellular microbiology*, 10(6), 1274–1285. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01125.x>
184. Voelz, K., Lammas, D. A., & May, R. C. (2009). Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(8), 3450–3457. <https://doi.org/10.1128/IAI.00297-09>
185. Wang Y, Casadevall A. (1994). Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemotherap*, 38:2646-2650.
186. Wang Y, Casadevall A. (1994). Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect Immun*, 64:3004-3007.
187. Wang Y., Casadevall A. (1999). Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemotherap*, 38 (1994), pp. 2646-2650
188. Wang, J. P., Lee, C. K., Akalin, A., Finberg, R. W., & Levitz, S. M. (2011). Contributions of the MyD88-dependent receptors IL-18R, IL-1R, and TLR9 to host defenses following pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. *PLoS one*, 6(10), e26232.
189. Wang, Y., & Casadevall, A. (1994). Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Applied and environmental microbiology*, 60(10), 3864–3866. <https://doi.org/10.1128/aem.60.10.3864-3866.1994>
190. Wang, Y., & Casadevall, A. (1996). Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to the melanin-binding compounds trifluoperazine and chloroquine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(3), 541–545. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.3.541>
191. Wang, Y., Aisen, P., & Casadevall, A. (1996). Melanin, melanin "ghosts," and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 64(7), 2420–2424. <https://doi.org/10.1128/iai.64.7.2420-2424.1996>
192. Waring, P., & Müllbacher, A. (1999). Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunology and cell biology*, 77(4), 312–317. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00837.x>
193. Wheeler, M. H., & Bell, A. A. (1988). *Melanins and their importance in pathogenic fungi* (pp. 338-387). Springer New York.
194. White, L. P. (1958). Melanin: a naturally occurring cation exchange material. *Nature* 182, 1427–1428. doi: 10.1038/1821427a0
195. Williamson P. R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *Journal of bacteriology*, 176(3), 656–664. <https://doi.org/10.1128/jb.176.3.656-664.1994>
196. Williamson P. R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *Journal of bacteriology*, 176(3), 656–664. <https://doi.org/10.1128/jb.176.3.656-664.1994>
197. Williamson, P. R., Wakamatsu, K., & Ito, S. (1998). Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1570-1572.
198. Woo, Y. H., & Martinez, L. R. (2021). *Cryptococcus neoformans*-astrocyte interactions: effect on fungal blood brain barrier disruption, brain invasion, and meningitis progression. *Critical reviews in microbiology*, 47(2), 206–223. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1869178>
199. Wang Y, Casadevall A. (1999). Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemotherap*, 38 (1994), pp. 2646-2650
200. Yauch, L. E., Mansour, M. K., Shoham, S., Rottman, J. B., & Levitz, S. M. (2004). 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*, 72(9), 5373–5382. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5373-5382.2004>
201. Youngchim, S., Morris-Jones, R., Hay, R. J., & Hamilton, A. J. (2004). Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of medical microbiology*, 53(Pt 3), 175–181. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05421-0>
  202. Zaragoza, O., Taborda, C. P., & Casadevall, A. (2003). The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *European journal of immunology*, 33(7), 1957–1967. <https://doi.org/10.1002/eji.200323848>
  203. Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.Abt. 1 Orig. Reihe A 225:211-222.
  204. Zhdanova, N. N., Gavriushina, A. I., & Vasilevskaia, A. I. (1973). Vplyv gamma- ta UF oprominennir na vyzhyvannia *Cladosporium* sp. i *Oidiodendron cerealis* [Effect of gamma and UV irradiation on the survival of *Cladosporium* sp. and *Oidiodendron cerealis*]. *Mikrobiolohichnyi zhurnal*, 35(4), 449–452.
  205. Zhong, Z., & Pirofski, L. A. (1998). Antifungal activity of a human antiglycuroxylomannan antibody. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5(1), 58–64. <https://doi.org/10.1128/CDLI.5.1.58-64.1998>
  206. Zughaier SM, Ryley HC, Jackson SK: A melanin pigment purified from an epidemic strain of *Burkholderia cepacia* attenuates monocyte respiratory burst activity by scavenging superoxide anion. *Infect Immun* 1999, 67:908-913.
  207. Biondo, C., Midiri, A., Messina, L., Tomasello, F., Garufi, G., Catania, M. R., Bombaci, M., Beninati, C., Teti, G., & Mancuso, G. (2005). MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *European journal of immunology*, 35(3), 870–878. <https://doi.org/10.1002/eji.200425799>
  208. Bolaños, B., & Mitchell, T. G. (1989). Phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages in the absence of serum. *Journal of leukocyte biology*, 46(6), 521–528. <https://doi.org/10.1002/jlb.46.6.521>
  209. Bulmer, G. S., Sans, M. D., & Gunn, C. M. (1967). *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. *Journal of bacteriology*, 94(5), 1475–1479. <https://doi.org/10.1128/jb.94.5.1475-1479.1967>
  210. Bulmer, G. S., Sans, M. D., & Gunn, C. M. (1967). *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. *Journal of bacteriology*, 94(5), 1475–1479. <https://doi.org/10.1128/jb.94.5.1475-1479.1967>
  211. Busse O. Uber parasitare Zelleinschlusse und ihre Zuchtung. Centralbl. Bakt. Parasit. 1894;16
  212. Casadevall A & Perfect JR (1998) *Cryptococcus neoformans*. ASM press, Washington, DC.
  213. Casadevall, A., Nakouzi, A., Crippa, P. R., and Eisner, M. (2012). Fungal melanins differ in planar stacking distances. *PLoS ONE* 7:e30299. doi: 10.1371/journal.pone.0030299
  214. Casadevall, A., Rosas, A. L., & Nosanchuk, J. D. (2000). Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current opinion in microbiology*, 3(4), 354–358. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00103-x](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00103-x)
  215. Castanón-Olivares, L. R., & López-Martínez, R. (1994). Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico City. *Mycoses*, 37(9-10), 325–327. <https://doi.org/10.1111/myc.1994.37.9-10.325>
  216. Chang, Y. C., & Kwon-Chung, K. J. (1994). Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Molecular and cellular biology*, 14(7), 4912–4919. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.7.4912-4919.1994>
  217. Chang, Y. C., Penoyer, L. A., & Kwon-Chung, K. J. (1996). The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infection and immunity*, 64(6), 1977–1983. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.1977-1983.1996>
  218. Charlier, C., Nielsen, K., Daou, S., Brigitte, M., Chretien, F., & Dromer, F. (2009). Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(1), 120–127. <https://doi.org/10.1128/IAI.01065-08>

219. Chaskes, S., & Tyndall, R. L. (1975). Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para- and ortho-Diphenols: effect of the nitrogen source. *Journal of clinical microbiology*, 1(6), 509–514. <https://doi.org/10.1128/jcm.1.6.509-514.1975>
220. Chiapello, L. S., Aoki, M. P., Rubinstein, H. R., & Masih, D. T. (2003). Apoptosis induction by glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Medical mycology*, 41(4), 347–353. <https://doi.org/10.1080/1369378031000137260>
221. Chiapello, L. S., Baronetti, J. L., Aoki, M. P., Gea, S., Rubinstein, H., & Masih, D. T. (2004). Immunosuppression, interleukin-10 synthesis and apoptosis are induced in rats inoculated with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Immunology*, 113(3), 392–400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01970.x>
222. Chiapello, L. S., Baronetti, J. L., Garro, A. P., Spesso, M. F., & Masih, D. T. (2008). *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric oxide in a caspase-independent pathway. *International immunology*, 20(12), 1527–1541. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn112>
223. Charlier, C., Nielsen, K., Daou, S., Brigitte, M., Chretien, F., & Dromer, F. (2009). Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(1), 120–127. <https://doi.org/10.1128/IAI.01065-08>
224. da Silva, M. B., Marques, A. F., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Travassos, L. R., & Taborda, C. P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes and infection*, 8(1), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.018>
225. Dan, J. M., Kelly, R. M., Lee, C. K., & Levitz, S. M. (2008). Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infection and immunity*, 76(6), 2362–2367. <https://doi.org/10.1128/IAI.00095-08>
226. Davis, M. J., Tsang, T. M., Qiu, Y., Dayrit, J. K., Freij, J. B., Huffnagle, G. B., & Olszewski, M. A. (2013). Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio*, 4(3), e00264–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00264-13>
227. De Leon-Rodriguez, C. M., Fu, M. S., Çorbali, M. O., Cordero, R. J. B., & Casadevall, A. (2018). The Capsule of *Cryptococcus neoformans* Modulates Phagosomal pH through Its Acid-Base Properties. *mSphere*, 3(5), e00437-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00437-18>
228. De Leon-Rodriguez, C. M., Rossi, D. C. P., Fu, M. S., Dragotakes, Q., Coelho, C., Guerrero Ros, I., Caballero, B., Nolan, S. J., & Casadevall, A. (2018). The Outcome of the *Cryptococcus neoformans*-Macrophage Interaction Depends on Phagolysosomal Membrane Integrity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 201(2), 583–603. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700958>
229. Deshaw, M., & Pirofski, L. A. (1995). Antibodies to the *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan are ubiquitous in serum from HIV+ and HIV- individuals. *Clinical and experimental immunology*, 99(3), 425–432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb05568.x>
230. Deshaw, M., & Pirofski, L. A. (1995). Antibodies to the *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan are ubiquitous in serum from HIV+ and HIV- individuals. *Clinical and experimental immunology*, 99(3), 425–432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb05568.x>
231. Diamond, R. D., May, J. E., Kane, M. A., Frank, M. M., & Bennett, J. E. (1974). The role of the classical and alternate complement pathways in host defenses against *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 112(6), 2260–2270.
232. Diamond, R. D., Root, R. K., & Bennett, J. E. (1972). Factors influencing killing of *Cryptococcus neoformans* by human leukocytes in vitro. *The Journal of infectious diseases*, 125(4), 367–376. <https://doi.org/10.1093/infdis/125.4.367>
233. Dix MM, Simon GM, Cravatt BF. 2008. Global mapping of the topography and magnitude of proteolytic events in apoptosis. *Cell* 134: 679–691.
234. Doering, T. L., Nosanchuk, J. D., Roberts, W. K., & Casadevall, A. (1999). Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Medical mycology*, 37(3), 175–181.
235. Dong, Z. M., & Murphy, J. W. (1997). Cryptococcal polysaccharides bind to CD18 on human neutrophils. *Infection and immunity*, 65(2), 557–563. <https://doi.org/10.1128/iai.65.2.557-563.1997>

236. Dong, Z. M., & Murphy, J. W. (1997). Cryptococcal polysaccharides bind to CD18 on human neutrophils. *Infection and immunity*, 65(2), 557–563. <https://doi.org/10.1128/iai.65.2.557-563.1997>
237. Dromer, F., Perronne, C., Barge, J., Vilde, J. L., & Yeni, P. (1989). Role of IgG and complement component C5 in the initial course of experimental cryptococcosis. *Clinical and experimental immunology*, 78(3), 412–417.
238. Ebert, M. K., Spanner, R. E., de Jonge, R., Smith, D. J., Holthusen, J., Secor, G. A., Thomma, B. P. H. J., & Bolton, M. D. (2019). Gene cluster conservation identifies melanin and perylenequinone biosynthesis pathways in multiple plant pathogenic fungi. *Environmental microbiology*, 21(3), 913–927. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14475>
239. Ebert, M. K., Spanner, R. E., de Jonge, R., Smith, D. J., Holthusen, J., Secor, G. A., Thomma, B. P. H. J., & Bolton, M. D. (2019). Gene cluster conservation identifies melanin and perylenequinone biosynthesis pathways in multiple plant pathogenic fungi. *Environmental microbiology*, 21(3), 913–927. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14475>
240. Eisenman, H. C., Frases, S., Nicola, A. M., Rodrigues, M. L., & Casadevall, A. (2009). Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 155(12), 3860–3867.
241. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
242. Emery HS, Shelburne CP, Bowman JP, Fallon PG, Schulz CA, Jacobson ES: Genetic study of oxygen resistance and melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1995, 62:5694-5697. 37.
243. EMMONS C. W. (1955). Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *American journal of hygiene*, 62(3), 227–232. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119775>
244. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43–50. <https://doi.org/10.1038/34112>
245. Frazão, S. O., Sousa, H. R., Silva, L., Folha, J., Gorgonha, K., Oliveira, G. P., Jr, Felipe, M., Silva-Pereira, I., Casadevall, A., Nicola, A. M., & Albuquerque, P. (2020). Laccase Affects the Rate of *Cryptococcus neoformans* Nonlytic Exocytosis from Macrophages. *mBio*, 11(5), e02085-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02085-20>
246. FROMTLING, R. A., SHADOMY, H. J. & JACOBSON, E. S. 1982. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 79, 23–29.
247. Giles, S. S., Dagenais, T. R., Botts, M. R., Keller, N. P., & Hull, C. M. (2009). Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(8), 3491–3500. <https://doi.org/10.1128/IAI.00334-09>
248. He, W. T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., Yang, Z. H., Zhong, C. Q., & Han, J. (2015). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion. *Cell research*, 25(12), 1285–1298. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.139>
249. <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/index.html>
250. Kechichian, T. B., Shea, J., & Del Poeta, M. (2007). Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infection and immunity*, 75(10), 4792–4798. <https://doi.org/10.1128/IAI.00587-07>
251. KWON-CHUNG, K. J. & RHODES, J. C. 1986. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 51, 218–233.
252. KWON-CHUNG, K. J., POLACHEK, I. & POPKIN, T. J. 1982. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *Journal of Bacteriology*, 150, 1414–1421.
253. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984;120: 123–30.
254. Levitz SM (1994) Macrophage–*Cryptococcus* interactions. *Immunol Ser* 60: 533–543.
255. Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>.

256. Mansour MK & Levitz SM (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* 5: 359–365.
257. McQuiston T & Del Poeta M (2011) The interaction of *Cryptococcus neoformans* with host macrophages and neutrophils. *Cryptococcus from Human Pathogen to Model Yeast* (Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR & Casadevall A, eds), pp. 373–387.
258. Molloy SF, Chiller T, Greene GS, Burry J, Govender NP, Kanyama C, *et al.* Cryptococcal meningitis: a neglected NTD? *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;29(11(6)):e0005575
259. Morgan, E., Varro, R., Sepulveda, H., Ember, J. A., Apgar, J., Wilson, J., Lowe, L., Chen, R., Shivraj, L., Agadir, A., Campos, R., Ernst, D., & Gaur, A. (2004). Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clinical immunology* (Orlando, Fla.), 110(3), 252–266. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2003.11.017>
260. Neilson, J. B., Fromtling, R. A., & Bulmer, G. S. (1977). *Cryptococcus neoformans*: size range of infectious particles from aerosolized soil. *Infection and immunity*, 17(3), 634–638. <https://doi.org/10.1128/iai.17.3.634-638.1977>
261. Nicola, A. M., Robertson, E. J., Albuquerque, P., Derengowski, L., & Casadevall, A. (2011). Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. *mBio*, 2(4), e00167-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00167-11>
262. Polachek, I., Hearing, V. J., & Kwon-Chung, K. J. (1982). Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of bacteriology*, 150(3), 1212–1220. <https://doi.org/10.1128/jb.150.3.1212-1220.1982>
263. Powell KE, Dahl BA, Weeks RJ, Tosh FE. Airborne *Cryptococcus neoformans*: particles from pigeon excreta compatible with alveolar deposition. *J Infect Dis* 1972;126: 412–5.
264. Rajasingham, R., Govender, N. P., Jordan, A., Loyse, A., Shroufi, A., Denning, D. W., Meya, D. B., Chiller, T. M., & Boulware, D. R. (2022). The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, S1473-3099(22)00499-6. Advance online publication. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00499-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00499-6)
265. Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., Denning, D. W., Loyse, A., & Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, 17(8), 873–881. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
266. Rodrigues ML. Funding and innovation in diseases of neglected populations: the paradox of cryptococcal meningitis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004429
267. Sabiiti, W., & May, R. C. (2012). Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future microbiology*, 7(11), 1297–1313. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.102>
268. Salas, S. D., Bennett, J. E., Kwon-Chung, K. J., Perfect, J. R., & Williamson, P. R. (1996). Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of experimental medicine*, 184(2), 377–386. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.377>
269. Shao, X., Mednick, A., Alvarez, M., van Rooijen, N., Casadevall, A., & Goldman, D. L. (2005). An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 175(5), 3244–3251. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3244>
270. Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., & Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526(7575), 660–665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
271. Stutz, A., Horvath, G. L., Monks, B. G., & Latz, E. (2013). ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1040, 91–101. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1_8)
272. Vecchiarelli A, Dottorini M, Pietrella D, Monari C, Retini C, Todisco T & Bistoni F (1994) Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 130–137.
273. Velagapudi, R., Hsueh, Y. P., Geunes-Boyer, S., Wright, J. R., & Heitman, J. (2009). Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(10), 4345–4355. <https://doi.org/10.1128/IAI.00542-09>

274. Maziarz, E. K., & Perfect, J. R. (2016). Cryptococcosis. *Infectious disease clinics of North America*, 30(1), 179–206. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.006>
275. <https://www.cdc.gov/cryptococcosis/about/index.html#:~:text=Key%20points,particularly%20people%20with%20HIV%2FAIDS>. Acessado em 14 de fevereiro de 2024, as 12:23h.