



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Núcleo de Medicina Tropical - NMT
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - PPGMT

LORENA DE OLIVEIRA PINHO

Avaliação do papel de opsoninas e vias de internalização de *Cryptococcus neoformans* na expressão de genes envolvidos na interação do fungo com macrófagos.

BRASÍLIA - DF

2024

Avaliação do papel de opsoninas e vias de internalização de *Cryptococcus neoformans* na expressão de genes envolvidos na interação do fungo com macrófagos.

LORENA DE OLIVEIRA PINHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical - PPGMT, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias.

Orientadora: Profa. Dr. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola
Coorientador: Prof. Dr. Hugo Costa Paes

BRASÍLIA

2024

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

dD278a de Oliveira Pinho, Lorena
Avaliação do papel de opsoninas e vias de internalização de *Cryptococcus neoformans* na expressão de genes envolvidos na interação do fungo com macrófagos. / Lorena de Oliveira Pinho; orientador Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola; co-orientador Hugo Costa Paes. -- Brasília, 2024.
59 p.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2024.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Fagocitose. 3. Opsoninas.
4. Interação fungo-macrófago. . I. Albuquerque de Andrade Nicola, Patrícia, orient. II. Costa Paes, Hugo, co-orient.
III. Título.

LORENA DE OLIVEIRA PINHO

Avaliação do papel de opsoninas e vias de internalização de *Cryptococcus neoformans* na expressão de genes envolvidos na interação do fungo com macrófagos.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola - Presidente

Universidade de Brasília - UnB

Prof^a. Dr^a. Fabiana Brandão Alves Silva - Membro Titular

Universidade de Brasília - UnB

Prof^a. Dr^a. Diane Sthefany Lima de Oliveira - Membro Titular

Hospital das Forças Armadas/ Ministério da Defesa

Prof. Dr. Fabián Andrés Hurtado Erazo - Suplente

Sabin Diagnóstico e Saúde

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a minha família pois sem eles não seria a pessoa que sou nem estaria onde estou. Agradeço especialmente à minha mãe, Amanda, por sempre estar ao meu lado, me apoiar acima de tudo e priorizar meus estudos a todo custo. Também aos meus avós que me ajudaram durante toda a minha vida e fizeram mais do que parte da minha criação e de quem sou hoje.

Além disso queria agradecer a mim mesma, por tudo que passei, sorri, chorei, vivi e me permiti, pois eu cheguei até aqui e sei o quanto me esforcei para estar onde estou, chegar onde cheguei, ganhar as batalhas que ganhei mas também superar as que perdi, e assim trilhar meu caminho todo dia.

Agradeço também aos meus parceiros do LAB3 que estavam sempre dispostos a ajudar apesar de todos os trancos e barrancos, e com cada um com suas coisas pra fazer, sempre senti que estávamos todos juntos nisso. Cada surto, cada felicidade compartilhada para dizer que foram momentos que foram importantes e me fizeram mais forte todo dia.

Por último mas não menos importante, queria agradecer aos meus orientadores Dr^a Prof^a Patrícia Albuquerque e Dr. Prof. Hugo Costa por toda a paciência e esforço que tiveram durante esses anos, por todo apoio que recebi durante esse período e por todo carinho compartilhado entre nossa equipe.

RESUMO

A criptococose é uma doença oportunista causada pelo fungo encapsulado *Cryptococcus neoformans*, que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. A principal característica de *C. neoformans* é sua cápsula polissacarídica, um fator de virulência fundamental que mascara padrões moleculares associados a patógenos na parede celular do fungo. Essa cápsula dificulta o reconhecimento eficiente pelo sistema imunológico, reduzindo a fagocitose e outras respostas microbidas. Em condições *in vitro*, a fagocitose de *C. neoformans* é extremamente baixa na ausência de opsoninas, como anticorpos ou moléculas do sistema complemento. Apesar de os macrófagos desempenharem um papel crucial na resposta imune ao fungo, eles podem atuar como hospedeiros intracelulares, permitindo a replicação do patógeno. Este estudo teve como objetivo investigar a expressão gênica de macrófagos murinos em resposta à internalização de *Cryptococcus neoformans* opsonizado com complemento ou anticorpos monoclonais anti-GXM, para compreender melhor o papel dessas opsoninas na resposta imune à criptococose. Foram analisadas vias de internalização mediadas por receptores de fragmento de região cristalizável e receptores do complemento dos macrófagos, avaliando o efeito do bloqueio dessas vias com anticorpos específicos em ensaios de fagocitose. Observou-se que o bloqueio nas condições utilizadas reduziu apenas parcialmente a internalização do fungo. Subsequentemente, ensaios de interação foram realizados com macrófagos expostos a células de *C. neoformans* opsonizadas com soro de cobaia ou com o anticorpo monoclonal anti-glucuronoxilomanana, polissacarídeo principal presente na cápsula do fungo. Após duas horas de infecção, os macrófagos foram coletados para extração de RNA e análise da expressão gênica por RT-qPCR, focando na ativação de genes relacionados à resposta imunológica ao fungo. Os resultados não demonstraram alterações significativas na expressão de 12 genes associados à resposta imunológica de macrófagos, tanto em comparação ao controle não opsonizado quanto entre as amostras opsonizadas com soro ou anticorpo. Esses achados sugerem que diferenças na resposta imunológica mediada por essas duas opsoninas podem ser mais sutis, indicando a necessidade de investigar outros genes e tempos de interação para compreender melhor as possíveis diferenças mediadas por diferentes opsoninas na interação fungo-macrófago.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, fagocitose; opsoninas, interação fungo-macrófago.

ABSTRACT

Cryptococcosis is an opportunistic disease caused by the encapsulated fungus *Cryptococcus neoformans*, which mainly affects immunocompromised individuals. The main feature of *C. neoformans* is its polysaccharide capsule, a key virulence factor that masks pathogen-associated molecular patterns on the fungal cell wall. The capsule hampers efficient recognition by the immune system, reducing phagocytosis and other microbicidal responses. Under in vitro conditions, the phagocytosis of *C. neoformans* is extremely low in the absence of opsonins, such as antibodies or complement system molecules. Although macrophages play a crucial role in the immune response to the fungus, they can act as intracellular hosts, allowing pathogen replication. This study aimed to investigate the gene expression of murine macrophages in response to the internalization of *Cryptococcus neoformans* opsonized with complement or anti-GXM monoclonal antibodies, to better understand the role of these opsonins in the immune response to cryptococcosis. Pathways of internalization mediated by macrophage Fc receptors and complement receptors were analyzed, evaluating the effect of blocking these pathways with specific antibodies in phagocytosis assays. It was observed that the blockage in the conditions used only partially reduced fungal internalization. Subsequently, interaction assays were conducted with macrophages exposed to *C. neoformans* cells opsonized with guinea pig serum or with the anti-glucuronoxylomannan monoclonal antibody, a major polysaccharide present in the fungus's capsule. After two hours of infection, the macrophages were collected for RNA extraction and gene expression analysis by RT-qPCR, focusing on the activation of genes related to the immune response to the fungus. The results did not show significant changes in the expression of 12 genes associated with the immune response of macrophages, both compared to the non-opsonized control and between the samples opsonized with serum or antibody. These findings suggest that differences in the immune response mediated by these two opsonins may be more subtle, indicating the need to investigate other genes and interaction times to better understand the possible differences mediated by different opsonins in the fungus-macrophage interaction.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, phagocytosis; opsonins, macrophage-fungi interaction.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	14
Figura 2	26
Figura 3	36
Figura 4	37
Figura 5	38
Figura 6	40
Tabela 1	34

LISTA DE ABREVIações

CR	Complement receptor (Receptor de Complemento)
Fc	Fragment crystallizable region (Fragmento de região cristalizável)
FcγR	Fragment crystallizable gamma receptor (Receptor de fragmento cristalizável gama)
GXM	Glucuronoxylomannan (glucuronoxilomanana)
IgA	Immunoglobulin α (imunoglobulina α)
IgG	Immunoglobulin γ (imunoglobulina γ)
IgM	Immunoglobulin μ (imunoglobulina μ)
mAB	Anticorpos monoclonais murinos
MOI	Multiplicidade de infecção
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Receptores de Reconhecimento de Padrões)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
SNC	Sistema Nervoso Central
T CD4 ⁺	Linfócitos T auxiliares foliculares positivos
T CD8 ⁺	Linfócitos T citotóxicos positivos

ORGÃOS FINANCIADORES

A aluna recebeu apoio financeiro da Bolsa Demanda Social da CAPES do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília. O projeto também teve apoio financeiro da FAPDF/DE Processo nº 00193-00000888/2021-67.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 <i>Cryptococcus</i> spp.	13
1.2 Criptococose.....	15
1.3 Virulência de <i>C. neoformans</i>	18
1.4 Diagnóstico e tratamento.....	19
1.5 resposta imunológica contra fungos vs <i>C. neoformans</i>	22
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4. METODOLOGIA	32
4.1 Modelo de infecção do fungo <i>C. neoformans</i> em uma linhagem de macrófagos (J774).....	32
4.2 Avaliação do acúmulo de mRNAs de J774 infectados por <i>C. neoformans</i>	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Fagocitose com bloqueadores de Fc e CR	35
5.2 Expressão de genes relacionados à resposta imunológica do fungo em macrófagos infectados por <i>C. neoformans</i>	39
5.3 Implicações dos resultados e limitações do estudo	42
6. CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Cryptococcus* spp.

O gênero *Cryptococcus* pertence ao grupo dos fungos basidiomicetos e é composto por leveduras encapsuladas amplamente distribuídas na natureza. As células desse gênero possuem entre 2 e 10 μm de diâmetro e apresentam uma estrutura celular complexa, composta por cápsula polissacarídica, parede celular, membrana plasmática, núcleo e citoplasma com organelas como mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, vacúolos e aparelho de Golgi (NAYAK et al., 2010). Das 37 espécies identificadas no gênero *Cryptococcus*, apenas algumas são patogênicas para humanos e animais, sendo *C. neoformans* e *C. gattii* as mais relevantes clinicamente (CHENG et al., 2001; ELLIS; PFEIFFER, 1990; SORRELL, 2001).

Os fungos *Cryptococcus* spp. estão amplamente difundidos no meio ambiente, sendo encontrados em solos, matéria vegetal em decomposição e áreas contaminadas por excrementos de aves, especialmente pombos, que atuam como reservatórios importantes para esses organismos (CHAND-GOYAL; SPOTTS, 1996; COSTA et al., 2010; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005). A infecção em humanos ocorre principalmente pela inalação de células fúngicas desidratadas presentes no ar ou no solo. Essas células podem reidratar-se nos pulmões, onde podem ser eliminadas ou permanecerem em estado latente em granulomas. Normalmente quando há uma queda nas funções do sistema imunológico, como imunocomprometimento severo, o fungo é capaz de escapar dessas estruturas podendo disseminar-se para outros órgãos, incluindo o sistema nervoso central, conforme ilustrado na Figura 1 (BUCHANAN; MURPHY, 1998; HULL; HEITMAN, 2002; NAYAK et al., 2010).

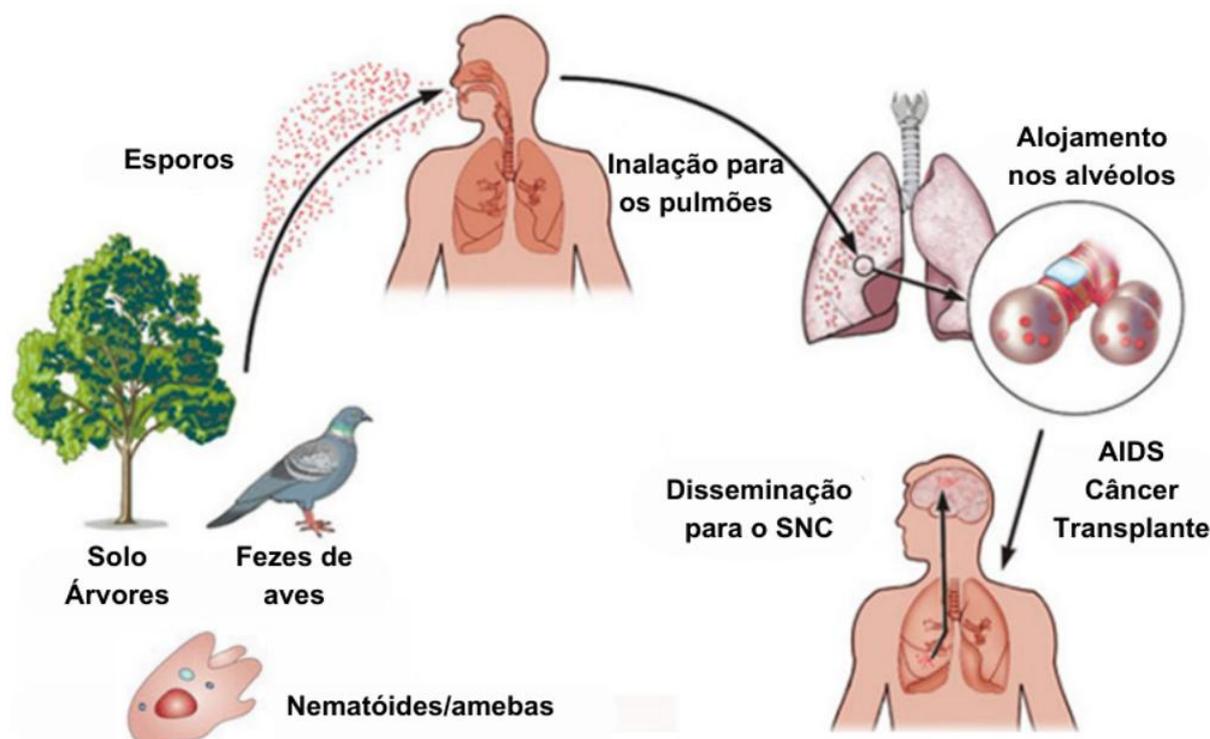


Figura 1. Ciclo de infecção de *Cryptococcus*. Este fungo está presente no solo, em excrementos de aves e em árvores, onde pode interagir com predadores microbianos e fauna silvestre, preservando sua capacidade de causar doenças. Em certas ocasiões, seres humanos podem inalar seus esporos, levando a uma infecção pulmonar inicial. Em indivíduos imunocomprometidos, o fungo pode se espalhar do pulmão para o sistema nervoso central, resultando em formas mais graves da doença. Adaptado de Hull e Heitman (2002).

Cryptococcus neoformans é o principal agente etiológico da criptococose em indivíduos imunocomprometidos, particularmente aqueles com HIV/AIDS, enquanto *C. gattii* é mais frequentemente associado a infecções em indivíduos imunocompetentes (MA; MAY, 2009). A patogenicidade do gênero está ligada à sua capacidade de adaptação genética e resistência a tratamentos, aspectos amplamente estudados em *C. neoformans*, que permite que o fungo sobreviva em diversos ambientes e infecte uma ampla gama de hospedeiros (JANBON et al., 2014). A cápsula polissacarídica desse fungo, um dos seus principais fatores de virulência, desempenha papel essencial na sobrevivência no hospedeiro, auxiliando na evasão da resposta imunológica (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Do ponto de vista taxonômico, *C. neoformans* é subdividido em três variedades com base nas diferenças capsulares e genéticas: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e uma forma híbrida entre *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii* (sorotipo AD) (KWON-CHUNG; BENNETT; RHODES, 1982; CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Em termos de distribuição geográfica, *C. neoformans* ocorre globalmente, predominando em áreas urbanas e subtropicais, enquanto *C. gattii* é mais comum em regiões tropicais e subtropicais (BILLMYRE et al., 2017; ENGELTHALER et al., 2014; MEYER et al., 1999). Surtos de *C. gattii* já foram relatados na costa noroeste do Pacífico, nos Estados Unidos, e no Canadá, onde o fungo infectou principalmente indivíduos imunocompetentes, sugerindo adaptações específicas ao ambiente local (BILLMYRE et al., 2017; ENGELTHALER et al., 2014; MEYER et al., 1999).

No Brasil, estudos mostram que *C. neoformans* e *C. gattii* estão associados a habitats naturais, como madeira em decomposição de árvores tropicais, encontrados em áreas urbanas, rurais e silvestres (BRASIL, 2012). Apesar dos avanços, elementos taxonômicos e genéticos do gênero *Cryptococcus* continuam sendo investigados, visando uma compreensão mais precisa de sua classificação e impacto ecológico.

1.2 Criptococose

A criptococose, também denominada torulose, doença de Busse-Buschke ou blastomicose europeia, é causada por fungos do gênero *Cryptococcus* e pode afetar qualquer parte do corpo (NAYAK et al., 2010). Otto Busse e Abraham Buschke deram o primeiro diagnóstico da doença em 1894 e descobriram que causava granulomas crônicos nos ossos de uma paciente (MAY et al., 2016). Casos de HIV/AIDS e terapias imunossupressoras, como quimioterapia e transplante de órgãos, aumentaram a frequência da criptococose nos últimos anos, considerando que ambos os fatores podem causar imunodeficiência (MAY et al., 2016). Essa doença é atualmente considerada uma das infecções fúngicas invasivas mais comuns em seres humanos, somando aproximadamente 152.000 novos casos registrados e 112.000 mortes por ano (RAJASINGHAM et al., 2022).

A criptococose é uma micose de caráter oportunista, cuja patogênese é influenciada por três fatores principais: a resposta imunológica do hospedeiro, a virulência da cepa e o tamanho do inóculo (NAYAK et al., 2010; KWON-CHUNG et al., 2014). A infecção inicia-se com a inalação de células de levedura ou basidiosporos presentes no ambiente, que atingem os pulmões, a principal via de entrada do fungo (KWON-CHUNG et al., 2014) (Figura 1). Em indivíduos imunocompetentes, as infecções pulmonares geralmente são assintomáticas e autolimitadas, mas, em condições de imunossupressão, o fungo pode se disseminar via sanguínea ou

linfática, chegando ao sistema nervoso central (SNC), onde frequentemente causa meningoencefalite (CASADEVALL; PERFECT, 1998; KWON-CHUNG et al., 2014). Essa forma de infecção é particularmente grave, podendo ser fatal se não tratada.

O estímulo do *Cryptococcus* para chegar ao SNC pode estar relacionado à disponibilidade de nutrientes como tiamina, ácido glutâmico, glutamina, dopamina, carboidratos, minerais e oxigênio presentes no líquido, além da ausência de resposta imunológica local, fatores que favorecem o crescimento e a disseminação do fungo (SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009; KWON-CHUNG et al., 2014). A disseminação sistêmica do fungo acontece através do "mecanismo cavalo de Tróia", em que o *C. neoformans* sobrevive e replica-se dentro de macrófagos, usando-os como veículo para disseminação no organismo. Após a fagocitose, o fungo pode neutralizar o ambiente ácido do fagolisossomo por conta de sua cápsula polissacarídica e da melanina presente em sua parede celular, que o protegem contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Dessa forma, o fungo utiliza os macrófagos como transportadores, permitindo atravessar barreiras como a hematoencefálica, chegando ao SNC (WANG; CASADEVALL, 1994; SALAS et al., 1996; UNDERHILL; GOODRIDGE, 2012). A saída do fungo ocorre por lise da célula hospedeira ou exocitose não lítica, onde ambas as células continuam viáveis após a saída do fungo do interior do macrófago (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; MA et al., 2006).

Outros órgãos também podem ser afetados, como pele, olhos, ossos, próstata e trato urinário, com manifestações variáveis conforme o local acometido (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; CHAI; TEOH, 2012; CHANG et al., 2008). Lesões cutâneas podem ser primárias, em casos de trauma local, ou secundárias, resultantes da disseminação hematogênica. Além disso, manifestações oculares, como papiledema, são comuns em pacientes com neurocriptococose (CHAI; TEOH, 2012). A próstata também pode atuar como reservatório do fungo, contribuindo para a reincidência da infecção (CHANG et al., 2008).

Essa doença se tornou um sinal importante da AIDS, particularmente em pacientes com níveis extremamente baixos de células T CD4⁺, e continua sendo uma das causas mais comuns de morte por AIDS, principalmente entre países de classe média e baixa (MAY et al., 2016; WILLIAMSON et al., 2017). Receptores de transplantes de órgãos também podem ser afetados pela criptococose, sendo que a mortalidade dos pacientes transplantados nos Estados Unidos entre 1990 e 1996 foi de 9% (PAPPAS et al., 2001).

O HIV tem alta prevalência em algumas partes do mundo, como a África Subsaariana, e também apresenta alta taxa de casos nas Américas, Ásia, Oceania e Europa. Na África Subsaariana, esses fatores se combinam com a alta incidência da criptococose e a falta de medicamentos antirretrovirais eficazes, tornando a doença devastadora nessas regiões (PARK et al., 2009; RAJASINGHAM et al., 2022).

Os dados de Meyer et al. (2003) mostram a distribuição geográfica de *C. neoformans*, apontando o sorotipo A como clinicamente relevante em indivíduos na América Latina, principalmente em pessoas HIV positivas no Brasil, Argentina e Peru. Mundialmente, os sorotipos B e C afetam pacientes imunocompetentes, o que também foi comprovado na América Latina (MEYER et al., 2003; SORRELL, 2001). Já os sorotipos AD e D se mostraram clinicamente relevantes para imunocomprometidos e raros em imunocompetentes na Europa e América Latina (MEYER et al., 2003; BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008). O sorotipo D é predominante nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, especialmente na população masculina, tendo cerca de 35-40% de casos letais (BRASIL, 2012). Enquanto Springer et al. (2014) encontraram dados relevantes de isolados ambientais de *C. gattii* na América do Norte, que podem causar doença tanto em pessoas imunocompetentes quanto imunocomprometidas.

Apesar de a infecção acometer ambos os sexos, as estatísticas mostram que homens representam mais de 70% dos casos relatados da doença em pacientes com HIV e mais de 60% sem a infecção, sendo que as maiores taxas estão em indivíduos entre 31 e 40 anos (PYRGOS et al., 2013). Acredita-se que esse padrão pode estar relacionado a influências de estrógenos, predisposição genética ou fatores ocupacionais, como maior envolvimento de homens em atividades rurais e no trabalho com o solo (MAFRA et al., 2008). No Brasil, casos da doença em crianças têm aumentado nos últimos anos, possivelmente associados à maior mobilidade e independência de crianças entre 6 e 12 anos de idade (SEVERO et al., 2009).

Estudos mostram que a criptococose não afeta apenas seres humanos, mas também outras espécies animais. Em 1902, Frothingham confirmou a patogenicidade da levedura em animais após descobrir uma lesão pulmonar em um cavalo que apresentava isolados semelhantes aos encontrados por Busse e Buschke (NAYAK et al., 2010). Littman demonstrou dados corroborando essa descoberta em 1959, ao analisar ecossistemas contaminados por excrementos de pombos. Além disso, mastites em cabras e búfalos foram associadas à levedura *C. neoformans*, que

inicialmente foi descoberta em habitats naturais da Nova Zelândia (PAL, 1975; PAL; BAXTER, 1985; PAL; MEHROTRA, 1983).

1.3 Virulência de *C. neoformans*

C. neoformans é um fungo patogênico oportunista cuja capacidade de causar infecção em humanos imunocomprometidos está diretamente associada a diversos fatores de virulência. Esses fatores tornam o fungo particularmente eficaz em sobreviver no ambiente intracelular e no sistema nervoso central (SNC). Entre eles, destacam-se a cápsula polissacarídica, a produção de melanina, a enzima urease e a capacidade de crescer a 37°C, todos essenciais para a sua patogenicidade (PERFECT, 2006).

Um dos principais fatores de virulência de *C. neoformans* é sua cápsula polissacarídica, composta predominantemente por glucuronoxilomanana (GXM) e glucuronoxilomanogalactano (GXMGal), que desempenha papel crucial na patogenicidade do fungo (CASADEVALL; PERFECT, 1998; ZARAGOZA et al., 2009). Essa cápsula impede a fagocitose eficiente por células imunes, como os macrófagos, e interfere diretamente na ativação de respostas imunológicas do hospedeiro. Além disso, ela suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1, fundamentais para uma resposta imunológica eficaz. Essa supressão favorece a disseminação do fungo, particularmente para o SNC, contribuindo para o desenvolvimento da meningoencefalite criptocócica (VECCHIARELLI, 2007; KWON-CHUNG et al., 2014).

A produção de melanina pelo fungo ocorre por meio da enzima lacase, que catalisa a formação desse pigmento na parede celular. A melanina desempenha um papel essencial na proteção contra o estresse oxidativo, neutralizando espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) produzidas pelas células fagocíticas do hospedeiro (WANG; CASADEVALL, 1994; SALAS et al., 1996; UNDERHILL; GOODRIDGE, 2012). Estudos demonstram que cepas mutantes de *C. neoformans* incapazes de produzir melanina apresentam redução significativa na virulência, evidenciando a importância desse pigmento para a sobrevivência do fungo dentro de células fagocíticas, como os macrófagos (SALAS et al., 1996).

A enzima urease também contribui para a sobrevivência do fungo em ambientes hostis, como o interior de macrófagos, onde ocorre variação de pH (COX

et al., 2000). Estudos com modelos animais mostraram que camundongos infectados com cepas mutantes de *C. neoformans* deficientes em urease apresentaram taxas de mortalidade significativamente menores quando comparados aos infectados com cepas selvagens. Isso sugere que a urease desempenha um papel fundamental na patogênese, ajudando o fungo a resistir à acidez do ambiente intracelular e favorecendo a persistência da infecção (COX et al., 2000).

Outro fator crucial é a capacidade de crescimento a 37°C, característica que permite a *C. neoformans* se estabelecer em hospedeiros mamíferos, incluindo humanos (PERFECT, 2006). Esse fungo é um dos poucos micro-organismos capazes de sobreviver às altas temperaturas corporais encontradas em endotérmicos. Essa habilidade não apenas facilita a infecção, mas também contribui para a proliferação do fungo no SNC e em outros órgãos internos, favorecendo a persistência da infecção (ROBERT; CASADEVALL, 2009; PERFECT, 2006).

Além desses fatores, *C. neoformans* secreta enzimas hidrolíticas, como fosfolipases, que degradam componentes das membranas celulares do hospedeiro. Essas enzimas são fundamentais para a invasão tecidual, permitindo a penetração do fungo em diferentes tecidos e sua disseminação sistêmica (CHEN et al., 1997; NOVERR et al., 2003; CHAYAKULKEEREE et al., 2008).

Esses fatores de virulência atuam em sinergia, permitindo que *C. neoformans* evada as defesas imunes do hospedeiro, sobreviva em ambientes adversos, como o interior de macrófagos e o SNC, e cause infecções graves, particularmente em indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos.

1.4 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da criptococose é realizado através de diversos exames laboratoriais, incluindo exames microscópicos diretos, cultura, histopatologia, sorologia, técnicas moleculares e exames de imagem (PERFECT; BICANIC, 2015). Amostras biológicas como líquido cefalorraquidiano, sangue, escarro, tecidos biopsiados e urina são comumente utilizadas (FAGNELLO, 2008; PANTOJA; SILVEIRA; SILVA, 2009; PEDROSO; CANDIDO, 2006). O exame direto, frequentemente utilizando tinta nanquim, permite a visualização da cápsula característica do *Cryptococcus* e apresenta alta sensibilidade em casos de meningite criptocócica (FRIEDMAN; KONGTHAVONSAKUL; OBERDORFER, 2012).

O principal diagnóstico da criptococose frequentemente envolve a detecção do antígeno criptocócico (CrAg) no sangue ou no líquido cefalorraquidiano (LCR), um método eficaz e amplamente utilizado para identificar infecções causadas por *C. neoformans* e *C. gattii*. O teste de CrAg, mais utilizado atualmente se baseia em um ensaio de imunocromatografia de fluxo lateral, um teste rápido que permite a detecção do CrAg em cerca de 10 minutos. Esse teste atualmente substitui outras técnicas menos sensíveis ou mais caras como a aglutinação em látex ou imunoenensaio enzimático, permitindo detectar o polissacarídeo capsular do fungo com maior sensibilidade e rapidez (HUANG et al., 2015; VIDAL et al., 2018). É um método especialmente útil em pacientes imunocomprometidos, como aqueles com HIV/AIDS, pois pode detectar o antígeno antes do aparecimento de sintomas graves, o que permite um tratamento precoce e melhora o prognóstico. Além disso, o teste de CrAg é altamente sensível e específico, facilitando o diagnóstico tanto em fases iniciais quanto avançadas da doença, sendo frequentemente recomendado para rastreamento em populações de alto risco, sendo muito mais sensível que a observação microscópica do fungo feita pela contra-coloração com tinta naquim, um dos métodos diagnósticos mais tradicionais (HUANG et al., 2015; VIDAL et al., 2018).

No Brasil, o diagnóstico de criptococose em 6% dos mais de 215.000 pacientes com AIDS foram registrados entre 1980 e 2002, sendo a segunda causa mais comum de mortalidade no país, e a taxa de letalidade da criptococose é substancial, sendo relatada na faixa de 45% a 65% independente de fatores de risco (PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

No entanto, o tratamento dessas infecções é desafiador, já que as opções de tratamento antifúngico disponíveis ainda apresentam limitações significativas. Os pacientes que se recuperam desta infecção podem desenvolver sequelas como déficit neurológico, surdez, cegueira, paralisia de nervos cranianos e perda de memória, resultando em tratamentos prolongados e até mesmo recaídas da enfermidade (PYRGOS et al., 2013).

O tratamento da criptococose depende da gravidade da infecção e do estado imunológico do paciente, envolvendo três fases: indução, consolidação e manutenção. Na fase de indução, o objetivo é reduzir ou eliminar a carga fúngica de forma agressiva, especialmente em casos graves, como meningite criptocócica, que é frequentemente observada em pacientes com HIV. Essa fase pode durar de duas a dez semanas, dependendo da resposta do paciente ao tratamento (WILLIAMSON et

al., 2017). A fase de consolidação segue a indução e visa garantir a negativação do fungo nos testes diagnósticos e estabilizar o paciente clinicamente, sendo mantida por cerca de oito semanas e a fase de manutenção é caracterizada pela terapia profilática, normalmente com doses reduzidas de fluconazol ou itraconazol, que deve ser mantida por até um ano, ou enquanto houver risco de recorrência, especialmente em pacientes com comprometimento imunológico (PAPPAS et al., 2001; SAAG et al., 2000; WILLIAMSON et al., 2017; SATIE-KON et al., 2008).

A anfotericina B lipossomal (L-AmB) é o antifúngico de escolha para o tratamento inicial da criptococose, especialmente nas formas graves da doença, como a meningite criptocócica e por apresentar menor toxicidade renal, o que é um ponto crítico no tratamento prolongado (PERFECT; BICANIC, 2015). A 5-flucitosina é frequentemente usada em combinação com a anfotericina B durante a fase de indução para aumentar a eficácia, porém apresenta toxicidade hematológica, especialmente em doses mais elevadas ou em tratamentos prolongados, mas seu uso é desencorajado em monoterapia devido à rápida emergência de resistência (O'CONNOR et al., 2013; FALCI; PASQUALOTTO, 2015; SCHWARZ et al., 2006).

Os azóis, como o fluconazol e o itraconazol, são amplamente utilizados nas fases de consolidação e manutenção. O fluconazol, em particular, é o mais utilizado, especialmente por sua boa penetração no sistema nervoso central e pelo perfil de segurança em longo prazo (WILLIAMSON et al., 2017). Entretanto, o uso prolongado de fluconazol pode levar ao desenvolvimento de resistência em algumas cepas de *C. neoformans*, o que tem sido uma preocupação crescente em pacientes imunocomprometidos (DIEKEMA et al., 2003; MARTINEZ, 2006). Em casos de resistência ao fluconazol, voriconazol e o posaconazol têm sido opções alternativas por terem espectro de ação ampliado, embora ainda não amplamente utilizados devido a preocupações com a toxicidade e o custo (DIEKEMA et al., 2003; MARTINEZ, 2006).

A resistência antifúngica, especialmente ao fluconazol, tem se tornado uma questão importante, particularmente em áreas com alta carga de HIV e em pacientes que necessitam de terapia antifúngica prolongada. Estudos indicam que a resistência ao fluconazol pode ocorrer após exposições repetidas ou subdosagem do medicamento (BICANIC et al., 2006; MOLLOY et al., 2018).

Em suma, *C. neoformans* e *C. gattii* continuam a representar uma ameaça significativa à saúde global, especialmente em populações vulneráveis. A contínua

pesquisa sobre a biologia, epidemiologia e patogênese desses fungos é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento.

1.5 Resposta imunológica contra *C. neoformans*

A resposta imunológica contra infecções fúngicas envolve mecanismos complexos que são essenciais para a defesa do hospedeiro. A fagocitose é um dos processos mais importantes nessa defesa, realizada por células como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, que reconhecem e engolfam os fungos invasores (SALAZAR; BROWN, 2018; UNDERHILL; GOODRIDGE, 2012). Esse processo é desencadeado pelo reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns* ou PAMPs) pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (do inglês *Pattern Recognition Receptors* ou PRRs), presentes na superfície das células fagocíticas (BROWN; GORDON, 2001; UNDERHILL; GOODRIDGE, 2012; SALAZAR; BROWN, 2018).

Os receptores fagocíticos são classificados em duas categorias principais: opsônicos e não opsônicos (UNDERHILL; GOODRIDGE, 2012). Receptores opsônicos, como os receptores de fragmento cristalizável (FcRs) e os receptores de complemento (CRs), reconhecem partículas opsonizadas. Receptores não opsônicos, como os PRRs, desempenham um papel importante na fagocitose de fungos patogênicos não-encapsulados, como *Candida albicans*, ao reconhecer diretamente PAMPs presentes na superfície do fungo (SALAZAR; BROWN, 2018).

Os PRRs incluem receptores como a Dectina-1, que reconhece beta-glucanos, um componente da parede celular fúngica; os receptores Toll-like (TLRs), que ativam vias de sinalização inflamatória e promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias; e o receptor de manose, que se liga à manose da parede celular dos fungos (SALAZAR; BROWN, 2018). Após o reconhecimento, os fungos são internalizados em vesículas chamadas fagossomos, que se fundem com lisossomos para formar fagolisossomos. Nesse compartimento, o ambiente é hostil, contendo espécies reativas de oxigênio (ROS), acidificação do fagolisossomo e ativação de enzimas lisossômicas e peptídeos antimicrobianos, que promovem a degradação do patógeno (UNDERHILL; GOODRIDGE, 2012).

Além dos PRRs, os receptores opsônicos desempenham um papel crucial na identificação de patógenos opsonizados, como fungos. Dentre eles, destacam-se os

receptores FcRs, que reconhecem a região Fc das imunoglobulinas, mediando a ligação de partículas opsonizadas às células fagocíticas (FRIDMAN, 1991). Os FcRs são classificados com base na classe de imunoglobulina à qual se ligam: Fc γ R para imunoglobulina γ (IgG), Fc α R para imunoglobulina α (IgA), e Fc ϵ R para imunoglobulina ϵ (IgE) (MANCARDI, D; DAËRON, M, 2014). Nos mamíferos, os FcRs apresentam diferenças em sua distribuição, expressão e especificidade entre espécies, com os Fc γ R sendo particularmente relevantes em humanos devido à sua capacidade de se ligar à IgG (TSUBOI, 2008).

Os Fc γ Rs incluem três subtipos: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16), que estão amplamente expressos em células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DAËRON, 1997). Esses receptores são essenciais no reconhecimento de fungos opsonizados com IgG, facilitando a fagocitose e a ativação da resposta imunológica.

Os anticorpos murinos têm sido amplamente utilizados como ferramentas para o estudo do combate a doenças humanas devido à sua alta especificidade para determinados antígenos e à sua capacidade de mimetizar ou modular respostas imunológicas. A tecnologia de hibridoma combinada com a tecnologia de DNA recombinante permitiu a produção *in vitro* de anticorpos monoclonais (mAbs) específicos contra epítomos únicos (KÖHLER; MILSTEIN, 1975; ECKER; JONES; LEVINE, 2015; MORRISON, 1985). Essas técnicas utilizam linfócitos B de camundongos fusionados com células mieloma, criando linhagens celulares imortalizadas capazes de produzir anticorpos de maneira contínua, e possibilitou a criação de anticorpos humanizados e específicos, reduzindo a imunogenicidade em humanos e aumentando a eficácia terapêutica, embora esses anticorpos não sejam atualmente utilizados na prática clínica (KÖHLER; MILSTEIN, 1975; ECKER; JONES; LEVINE, 2015; MORRISON, 1985).

O mAb 18B7, por exemplo, pertencente à classe IgG1, interage no sistema murino com Fc γ R, que desempenham papéis fundamentais na modulação das respostas imunes efetoras. Os principais receptores murinos relevantes para IgG1 incluem o Fc γ RIII (CD16) e o Fc γ RII (CD32) (CASADEVALL et al., 1998).

Além disso, os CRs, como CR3 e CR4 (compostos pelas integrinas CD11b/CD18 e CD11c/CD18, respectivamente), desempenham um papel complementar ao reconhecer fragmentos opsônicos derivados da ativação do sistema complemento, como C3b e iC3b. Esses receptores promovem a internalização do fungo opsonizado

e sua subsequente destruição no interior do fagossomo, em combinação com os mecanismos mediados pelos FcRs (ZARAGOZA; TABORDA; CASADEVALL, 2003).

A imunidade adaptativa desempenha um papel crucial no combate a infecções fúngicas. Linfócitos T CD4⁺, especialmente a resposta imunológica Th1, são essenciais para a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o interferon-gama (IFN- γ), que ativa macrófagos, aumentando sua capacidade de eliminar fungos. Já a ativação da resposta Th2 também contribui para a defesa, promovendo a produção de IL-4, uma citocina importante no recrutamento de macrófagos e células dendríticas (CHENG; SHAM; KRONSTAD, 2009; CARROLL et al., 2012). Em suma, a imunidade contra fungos envolve uma combinação de resposta inata, com fagocitose e ativação de PRRs, e uma resposta adaptativa, que potencializa a eliminação do patógeno por meio da ativação de células T e produção de anticorpos.

Porém, diferente do que acontece com os outros fungos, o *C. neoformans* desenvolveu mecanismos sofisticados de evasão imunológica, resistindo à fagocitose, ou sendo capaz de sobreviver dentro do citoplasma de macrófagos (ROHATGI; PIROFSKI, 2015). Um dos fatores mais importantes para a virulência de *C. neoformans* é sua cápsula polissacarídica, como abordado no tópico 1.3 deste trabalho. Essa cápsula impede que os PRRs reconheçam os PAMPs fúngicos, como beta-glucanos, escondendo fisicamente os sítios de ligação dos PRRs na parede celular fúngica e reduzindo significativamente a fagocitose desse microrganismo que se traduz em proliferação reduzida de células T e processamento e apresentação de antígenos por macrófagos, tudo resultando em uma interferência na resposta das células T (NAYAK et al., 2010; SYME et al., 1999; VECCHIARELLI et al., 1994a,b). Dessa forma os receptores opsônicos são fundamentais para o reconhecimento e internalização do fungo.

Além disso, *C. neoformans* pode ser fagocitado por macrófagos e neutrófilos, mas ele tem a capacidade de sobreviver e proliferar dentro do fagossomo, já que ele pode resistir às ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e a outras moléculas antimicrobianas, e pode até ser expelido das células hospedeiras por um processo conhecido como exocitose não-lítica (vomocitose), sem sofrer destruição (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; MA et al., 2006).

Outro mecanismo de evasão é a produção de células Titãs, que são significativamente maiores, podendo chegar a 100 μm , e são fisicamente e fisiologicamente mais resistentes à fagocitose, proporcionando ao fungo uma

vantagem na sobrevivência no ambiente do hospedeiro e são associadas a uma maior disseminação do fungo (ZARAGOZA et al., 2010; OKAGAKI et al., 2010; ZARAGOZA; NIELSEN, 2013). A secreção da proteína antifagocítica 1 (App1), secretada pelo *Cryptococcus*, também inibe a fagocitose mediada por complemento, se ligando ao componente CD11b do receptor CR3 e bloqueando a interação entre o receptor CR3 e o fragmento iC3b (TABORDA; CASADEVALL, 2002).

Apesar das estratégias de evasão, *C. neoformans* pode ser opsonizado por anticorpos como IgG, IgM e IgA, que se ligam ao antígeno capsular GXM, facilitando sua fagocitose por receptores Fc (TABORDA; CASADEVALL, 2002). Além disso, a ligação destes anticorpos parece de alguma forma alterar a conformação da cápsula fúngica e permitir que moléculas do complemento se liguem a superfície da cápsula mediando também a sua internalização por meio dos CR3 e CR4 nos macrófagos e neutrófilos, já que a falta de expressão do CD18, um componente desses receptores, reduz drasticamente a fagocitose mesmo na ausência de moléculas do sistema complemento (TABORDA; CASADEVALL, 2002).

A resposta imune adaptativa é crucial para o controle de *C. neoformans*. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ desempenham um papel importante na ativação de macrófagos e no controle da infecção. O IFN- γ , produzido pelas células Th1, é essencial para a ativação de macrófagos, enquanto a resposta Th2, associada à produção de IL-4 e IL-13, está ligada a um pior prognóstico, pois favorece uma resposta mais tolerogênica e ineficaz contra o fungo (CHENG; SHAM; KRONSTAD, 2009; CARROLL et al., 2012).

Pacientes imunocomprometidos, como aqueles com HIV/AIDS, são particularmente vulneráveis à infecção por *C. neoformans*, pois a baixa contagem de linfócitos T CD4⁺ prejudica a capacidade do sistema imunológico de montar uma resposta eficaz contra o fungo (MAY et al., 2016). Nesses indivíduos, a infecção pode progredir rapidamente para meningite criptocócica, uma condição associada a alta mortalidade (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

A interação entre o *Cryptococcus* e o sistema imunológico do hospedeiro envolve um equilíbrio dinâmico entre mecanismos de defesa imunológica e estratégias de evasão do patógeno. A fagocitose desempenha um papel central na tentativa do sistema imunológico de eliminar a infecção, mas a resistência fúngica frequentemente subverte esses esforços, resultando em desafios significativos para o tratamento de infecções criptocócicas, já que a sua capacidade de crescimento à temperatura do

corpo humano (37 °C), produção de melanina, urease e desenvolvimento de cápsula polissacarídica são fatores que contribuem para a patogenicidade dos *Cryptococcus* spp (CASADEVALL; PERFECT, 1998; NAYAK et al., 2010).

Apesar de todos esses mecanismos, estudos mostraram que *C. neoformans* poderia ser internalizado nos macrófagos tanto por FcRs, que ligam a porção constante dos anticorpos, quanto por CR3 e CR4, que interagem com fragmentos opsônicos do complemento, CRs, como pode ser visto no modelo proposto na Figura 2 (TABORDA; CASADEVALL, 2002). A opsonização por anticorpos, como IgM e IgA, que poderia ligar-se ao antígeno capsular GXM de *C. neoformans*, faz com que haja uma mudança conformacional na cápsula de GXM do fungo, levando a uma maior interação com CR3 e CR4 e fagocitose independente do complemento (TABORDA; CASADEVALL, 2002). Fragmentos $F(ab')_2$, que faltam na região Fc do anticorpo, também já foram demonstrados como opsoninas para a *C. neoformans* em vários subtipos de células fagocitárias, indicando que a ligação da região Fc aos receptores FcR pode não ser necessária para a opsonização, mas pode também ser mediada por CRs mesmo na ausência de moléculas do complemento (TABORDA; CASADEVALL, 2002).

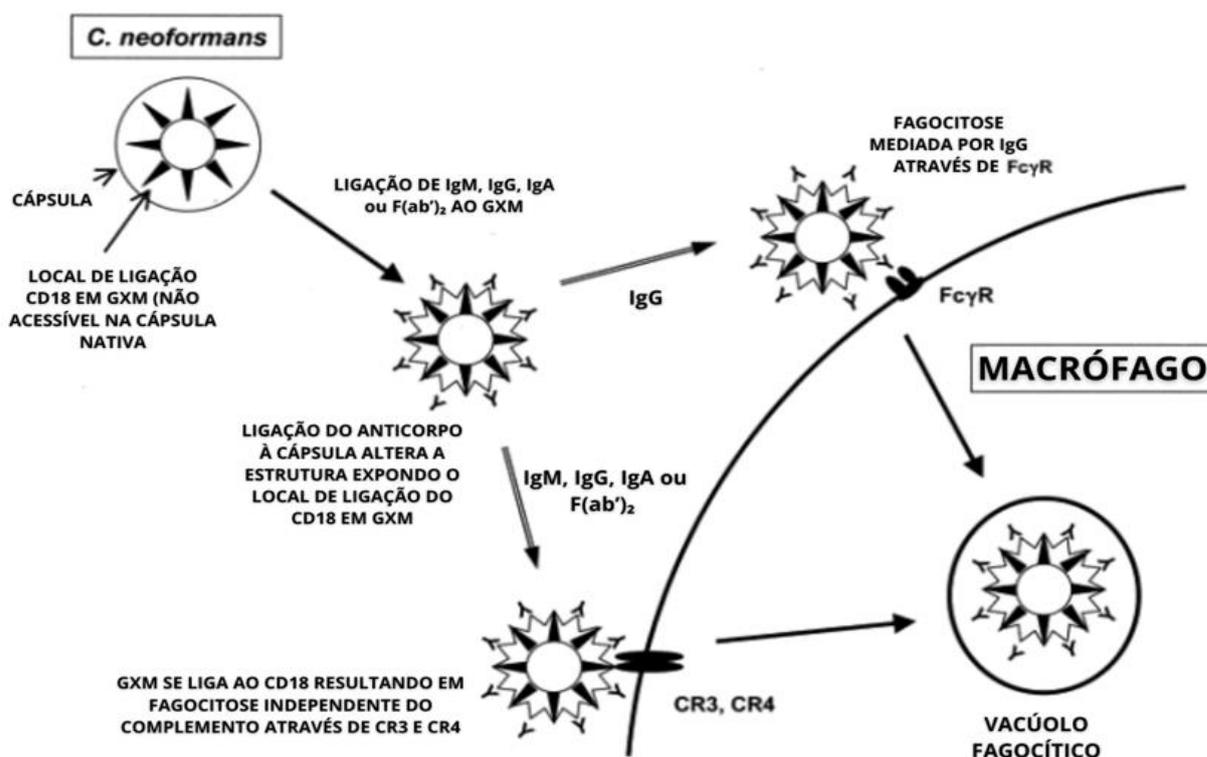


Figura 2. Mecanismo proposto para a internalização de *C. neoformans* por macrófagos após opsonização com fragmentos de IgM, IgG1, IgA e $F(ab')$. Adaptado de TABORDA e CASADEVALL, 2002.

A validade dessa teoria foi confirmada por achados de laboratório que mostraram que a fagocitose de *C. neoformans* opsonizado por IgM e IgA diminui muito quando submetidos à interação com macrófagos J774 que não expressam a proteína CD18 (camundongos B6.129S7-Itgb2 tm1Bay) que é um dos componentes dos receptores CR3 e CR4 (TABORDA; CASADEVALL, 2002). Isso indica que a eficácia fagocitária desse patógeno é diretamente proporcional à expressão dos receptores CRs na célula alvo.

Estudos mostraram também que o fungo pode induzir alterações na expressão de genes relacionados à fagocitose, estresse oxidativo, inflamação, metabolismo celular e sinalização intracelular, o que facilita sua sobrevivência dentro dos macrófagos (ZARAGOZA; NIELSEN, 2013). Neste trabalho, exploramos as alterações mediadas pelas opsoninas na expressão de genes previamente associados à resposta dos macrófagos à infecção por *C. neoformans*. Entre esses genes, destacam-se o gene **iNos** (óxido nítrico sintase induzível), que codifica a enzima responsável pela produção de óxido nítrico, essencial para a atividade microbicida e defesa contra patógenos, sendo também um indicador de uma resposta imune mais inflamatória (MURPHY, 1999). O gene **Arg1** (arginase 1) compete com a iNOS pelo substrato L-arginina, direcionando o metabolismo para a produção de poliaminas e prolina, favorecendo a reparação tecidual (RATH et al., 2014). Esse gene está associado aos macrófagos M2, que possuem uma resposta anti-inflamatória e podem favorecer a sobrevivência de *C. neoformans*. Também analisamos a expressão do gene **Lamp1** (proteína de membrana associada lisossomal 1), essencial para a manutenção da integridade do fagolisossomo e para a fusão das vesículas contendo o fungo com os lisossomos (HUYNH et al., 2007). Esse gene facilita a degradação do fungo fagocitado, mas sua disfunção pode levar à sobrevivência intracelular de *C. neoformans*. O gene **Atg5** (proteína de autofagia 5), por sua vez, é fundamental para a formação de autofagossomos, uma estratégia alternativa de eliminação de patógenos intracelulares, ajudando a capturar e degradar fungos que escapam do fagolisossomo (ZHAO et al., 2008). Também investigamos a expressão de genes que codificam citocinas, como **IL-6** (interleucina 6), uma citocina envolvida em diversos aspectos da resposta imunológica. Ela promove a diferenciação de células T em Th17, que ajudam a controlar infecções fúngicas, além de estimular a produção de moléculas inflamatórias e a proliferação de linfócitos B (VELDHOEN et al., 2006; MANGAN et al., 2006; BETTELLI et al., 2006; GUGLANI; KHADER, 2010). Por outro

lado, **IL-10** (interleucina 10) desempenha um papel anti-inflamatório, inibindo a produção de TNF- α e IFN- γ , reduzindo a ativação dos macrófagos (FIORENTINO et al., 2016). No contexto de *C. neoformans*, níveis elevados de IL-10 podem favorecer a sobrevivência do fungo, ao suprimir a imunidade celular (TEITZ-TENNENBAUM et al., 2018). O **Tnf- α** (fator de necrose tumoral alfa), uma importante citocina pró-inflamatória, tem sua redução associada à maior susceptibilidade à criptococose (HORCAJADA et al., 2007). Também foi analisada as quimiocinas **Ccl2** (ligante de quimiocina 2) e **Cxcl10** (ligante de quimiocina C-X-C 10). Níveis elevados de **Ccl2** estão associados a uma resposta imune eficaz contra *C. neoformans* (HUFFNAGLE et al., 1995; KAWAKAMI et al., 2001), enquanto **Cxcl10** atrai células T CD4⁺ e CD8⁺, além de ativar os macrófagos para a eliminação dos patógenos. É crucial para uma resposta Th1 eficaz, combatendo o fungo através da produção de IFN- γ e da ativação de macrófagos (YONEYAMA et al., 2002; XIAO et al., 2008; SOARES et al., 2007). Por fim, também investigamos a expressão dos genes **Nfkr** (regulação transcricional), **Pik3r4** (subunidade reguladora 4 da fosfoinositídeo 3-quinase) e **CtsB** (catepsina B). **Nfkr** é uma proteína inibitória de NF- κ B, possivelmente relacionada à ativação da apoptose de macrófagos no estágio inicial da infecção (GONÇALVES, 2010); **Pik3r4** regula a autofagia, uma via de defesa alternativa contra o fungo intracelular (HALE et al., 2013); e **CtsB** codifica a catepsina B, uma serina-protease fagolisossomal que demonstrou atividade anticriptocócica em extratos de células dendríticas quando confrontada com *Cryptococcus neoformans* (HOLE et al., 2012).

Durante a infecção, as células do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos, modificam seu perfil de expressão gênica em resposta ao patógeno. A análise do mRNA revela o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, que são essenciais para a defesa contra infecções fúngicas (SYME et al., 1999).

Portanto, o sistema imunológico do hospedeiro pode seguir três caminhos distintos ao enfrentar uma infecção por *Cryptococcus*: eliminação completa da infecção, disseminação fatal sem tratamento, ou controle parcial com latência do fungo no corpo (LEOPOLD WAGER et al., 2016) A interação entre *C. neoformans* opsonizado e os receptores Fc e CRs é crucial para a fagocitose eficiente e no subsequente destino desse patógeno. Além disso, esses mecanismos também destacam a função crítica dos CRs no combate de processos infecciosos, uma vez

que destacam sua importância, na medida em que atuam não só na indução de um processo inflamatório, mas também na opsonização de microrganismos.

O entendimento sobre a biologia e interação de *Cryptococcus* com células do hospedeiro vem crescendo a cada dia, mas ainda é preciso investigar melhor diferentes aspectos dessa interação para poder melhor entender a complexidade da relação patógeno-hospedeiro. Analisando como a fagocitose mediada por diferentes opsoninas poderia nos fornecer ideias se essas moléculas mediadoras da fagocitose do fungo poderiam ter um papel relevante na latência, destruição do fungo ou na sua disseminação nos tecidos do hospedeiro.

2. JUSTIFICATIVA

A compreensão dos mecanismos de interação entre patógenos fúngicos e o sistema imunológico do hospedeiro é essencial para desenvolver tratamentos mais eficazes contra infecções fúngicas, que têm se tornado mais comuns devido ao aumento de casos de imunossupressão causada por doenças crônicas e terapias imunomoduladoras. Entre esses patógenos, *C. neoformans* é particularmente preocupante. Amplamente encontrado no ambiente, ele representa uma grave ameaça para pessoas imunocomprometidas, como pacientes com HIV/AIDS e transplantados. Apesar de avanços na pesquisa, ainda há muitas lacunas no entendimento de como esse fungo interage com as células do sistema imunológico inato.

Embora entenda-se que opsoninas, como anticorpos e componentes do sistema complemento, facilitam a fagocitose de *C. neoformans*, pouco ainda é conhecido sobre as diferenças nos mecanismos de internalização associados a cada tipo de opsonina. Não há estudos suficientes que explorem completamente as diferenças na expressão gênica dos macrófagos em resposta à internalização do fungo mediada por receptores CR ou receptores Fc. Essa é uma lacuna crucial, pois essas vias podem influenciar a sobrevivência do fungo dentro dos macrófagos e determinar o tipo de resposta imune que será ativada.

A hipótese central deste trabalho é que existem diferenças na resposta do macrófago ao *C. neoformans*, dependendo se o fungo é internalizado por meio de receptores CR ou Fc. Essas diferenças podem afetar a capacidade de sobrevivência do fungo e o perfil da resposta imune do hospedeiro. Para investigar essa hipótese, esta dissertação propõe analisar os perfis de expressão gênica dos macrófagos em resposta à internalização mediada por diferentes opsoninas, com foco no acúmulo de mRNAs associados à resposta imune inata.

Os resultados esperados deste estudo visam preencher uma importante lacuna no conhecimento sobre a interação entre *C. neoformans* e o sistema imunológico do hospedeiro. Saber como o fungo manipula os macrófagos para sua sobrevivência e disseminação, pode embasar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas direcionadas a interromper esses processos patogênicos. Em um contexto de crescente incidência de infecções fúngicas oportunistas, tais descobertas têm relevância significativa para a saúde pública.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a expressão gênica de macrófagos murinos em resposta à internalização de *Cryptococcus neoformans* opsonizado com complemento ou anticorpos monoclonais anti-GXM, para compreender seu papel na resposta imune à criptococose.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar a interação de macrófagos J774 com *C. neoformans* na presença de moléculas para o bloqueio dos receptores Fc ou CR.

Analisar o índice de fagocitose do macrófago com os ensaios de interação hospedeiro-patógeno com bloqueadores dos receptores CR e Fc.

3.2.2 Avaliar a expressão de determinados genes relacionados à resposta imunológica do fungo em macrófagos infectados por *C. neoformans* após a fagocitose mediada pelo anticorpo ou por moléculas do complemento.

Realizar a avaliação do perfil de expressão dos genes dos mRNAs das amostras e sua possível associação com a resposta imunológica mediada pelo sistema complemento e pelos FcRs.

4 METODOLOGIA

4.1 Modelo de infecção do fungo *C. neoformans* em uma linhagem de macrófagos (J774).

4.1.1 Condições de cultivo de macrófagos J774

Foi utilizada a linhagem imortalizada de macrófagos J774A.1 (ATCC® TIB-67) de camundongos (BALB/c) derivadas de um sarcoma reticular. As células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium), cultivadas à 37°C e 5% CO₂, com suplementação de aminoácidos não essenciais, 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e 50 µg/mL de gentamicina (Life Technologies, Inc.), e repicadas a cada 2 ou 3 dias.

4.1.2 Condições de cultivo de *C. neoformans* e preparo do inóculo

Foi utilizada a linhagem H99 (sorotipo A, ATCC® 208821™) de *C. neoformans*, linhagem característica da espécie, cultivada segundo condições padrão descritas na literatura (NIELSEN et al., 2003). Brevemente, a linhagem foi cultivada em meio líquido *Sabouraud* (Peptona 10 g/L, glicose 20 g/L, pH 5,5) a 30°C durante à noite. As leveduras foram coletadas, lavadas com solução salina tamponada (PBS) e contadas na câmara de Neubauer. Posteriormente, opsonizadas com 20% de soro de cobaia (Rhea Biotech, Brasil) ou 10 µg/mL de anticorpo monoclonal 18B7 (Doado pelo Prof. Dr. Arturo Casadevall, Bloomberg School of Public Health of Johns Hopkins University, Baltimore, MD, EUA) por 30 minutos antes dos ensaios de interação com macrófagos murinos.

4.1.3 Interação *in vitro* de J774 com *C. neoformans*

As células J774 foram cultivadas na ausência (controle) e na presença de células leveduriformes da linhagem H99 de *C. neoformans*, na proporção de duas leveduras para um macrófago (2:1; MOI 2) a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Após o tempo de 2 horas de co-cultura, os macrófagos J774 aderidos foram lavados 3 vezes com PBS estéril e recuperados para extração de RNA total. Em todos os experimentos foram deixados alguns poços de cada condição experimental para avaliação da fagocitose por meio da coloração celular com o kit Panótico (NewProv) para controle

de fagocitose. Foram feitas pelo menos três replicatas biológicas de cada experimento.

4.1.4 Inibição dos receptores do sistema complemento e receptores Fc em J774

Os macrófagos da linhagem J774 foram semeados em placas de cultura de 96 poços. Em seguida, diferentes anticorpos que bloqueiam os receptores CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18) e Fc (CD16 e CD32) foram acrescentados em concentrações de 1 µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL por 30 min. Depois, adicionadas às leveduras de *C. neoformans*, como descrito nos experimentos de interação. Os anticorpos usados foram os seguintes: 1) 2.4G2 – IgG2b monoclonal de rato, bloqueia as atividades das subunidades CD16 e CD32 dos receptores FcγRII e FcγRIII de camundongo; 2) M1/70 – IgG2b monoclonal de rato, bloqueia a subunidade de CR CD11b; 3) HL3 – IgG monoclonal de hamster, bloqueia a subunidade de CR CD11c; 4) GAME-46 – IgG1 monoclonal de rato, bloqueia a subunidade de CR CD18. Infelizmente alguns dos anticorpos acabaram durante o processo de otimização dos experimentos e seria necessário importa-los. Os ensaios com os anticorpos de bloqueio seriam controles para os ensaios com as opsoninas, no entanto, tendo em vista o prazo longo para a importação dos anticorpos, os ensaios de interação para purificação de RNA e análise de expressão de genes foram feitos sem esses controles.

4.2 Avaliação do acúmulo de mRNAs de J774 infectados por *C. neoformans*

4.2.1 Extração de RNA total de J774 infectados com *C. neoformans*

A extração do RNA total de macrófagos murinos infectados com *C. neoformans* ocorreu usando-se o TRIzol de acordo com as recomendações do fabricante no TRIzol *Reagent User Guide* (Thermo fisher scientific). A quantificação do RNA total foi feita por espectrofotometria no equipamento Nanodrop (Invitrogen). Posteriormente, a qualidade das amostras de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.2.2 Quantificação do acúmulo de mRNAs de macrofagos infectados com *C. neoformans* por RT-qPCR

Os níveis de um conjunto de genes de mRNAs previamente selecionados como importantes na regulação da resposta imune inata a patógenos, conforme nossos

trabalhos prévios e dados da literatura, foram analisados pela metodologia de *RT-PCR* em tempo real (*RT-qPCR*). Nossos experimentos tiveram três grupos experimentais, macrófagos sozinhos, macrófagos interagindo com *C. neoformans* previamente opsonizado com mAB 18B7 e macrófagos interagindo com *C. neoformans* previamente opsonizado com 20% de soro. A transcrição reversa foi realizada a partir do RNA total, utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit User Guide (Life Technologies, Inc.)*, seguida por reação de *qRT-PCR* com primers específicos e o reagente *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix para qPCR (Applied Biosystems)*. Os ensaios foram realizados conforme recomendações definidas pelo fabricante, usando-se o instrumento *7500 Fast System SDS Software (Applied Biosystems)* com um total de 40 ciclos de amplificação (cutoff 38). O threshold foi definido automaticamente pelo software, e os valores de Ct (threshold cycle) foram registrados para 108 amostras, sendo 3 poços de cada condição para cada gene.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados na leitura dos genes.

GENES	FOWARD	REVERSE
<i>iNos</i>	CGAAACGCTTCACTTCCAA	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
<i>CtsB</i>	CATGCACTGGAGAAGGAGATAC	CTGTTAGACACGCTGTAGGAAG
<i>Pik3r4</i>	GAGGCGTCTAAGTTACCCAA	TGAGGCCTGACTTTAGGTCA
<i>Il-6</i>	GGGACTGATGCTGGTGACAA	GACAGGTCTGTTGGGAGTGG
<i>Arg1</i>	GTTCCCAGATGTACCAGGATTC	CGATGTCTTTGGCAGATATGC
<i>Lamp1</i>	CACAAACCCCACTGTATCCA	GGCTCTGTTCTTGTCTCCA
<i>Atg5</i>	CTGAAAGAGAAGCAGAACCA	ATGTTCCAAGGAAGAGCTGA
<i>Cxcl10</i>	CATCCTGCTGGGTCTGAGTG	ATTCTCACTGGCCCGTCATC
<i>Il-10</i>	AGAGAAGCATGGCCCAGAAA	GGGGAGAAATCGATGACAGC
<i>Nfkr</i>	ACCTTTCAACCTACGATGGTCAGA	GAGCTCTCACATGGAATTTGGAA
<i>Ccl2</i>	CAAGAGGATCACCAGCAGCA	ATTCCTTCTTGGGGTCAGCA
<i>Tnf-α</i>	GTACCTTGTCTACTCCCAGGTTCTCT	GTGGGTGAGGAGCACGTAGTC

4.2.3 Análise estatística

Os valores de $\Delta C(t)$ para normalização foram calculados para cada gene-alvo em relação ao controle endógeno de actina, utilizando dados agregados de quatro experimentos distintos. Foram avaliadas três condições experimentais: macrófagos sozinhos, macrófagos interagindo com fungo opsonizado por 18B7 e macrófagos interagindo com fungo opsonizado por soro. Os valores de $\Delta C(t)$ de cada condição foram plotados em um gráfico, no qual os retângulos representam a faixa interquartil dividida pela mediana, enquanto as barras de dispersão indicam os valores máximo e mínimo observados.

A análise estatística foi conduzida por ANOVA bidirecional, com os fatores "condição experimental" (macrófagos, 18B7, soro) e "gene-alvo", para investigar possíveis diferenças nos $\Delta C(t)$ entre as condições. A análise foi realizada no software GraphPad Prism (versão 8.3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fagocitose com bloqueadores de Fc e CR

Os primeiros experimentos focaram na avaliação do impacto do bloqueio de receptores Fc e CR na fagocitose de *C. neoformans* pelos macrófagos J774. Utilizou-se o anticorpo monoclonal 18B7 como opsonina, conhecido por sua alta afinidade pela cápsula polissacarídica do fungo. Observou-se que o bloqueio dos receptores Fc (anticorpo anti-CD16/CD32) reduziu a fagocitose em mais de 50%. Em contraste, os bloqueadores das subunidades dos receptores CR (CD11b, CD11c ou CD18) não apresentaram efeito significativo (Figura 3). Como as condições foram feitas de forma isolada para cada subunidade de cada receptor, ainda existia a possibilidade de fagocitose pelos outros receptores.

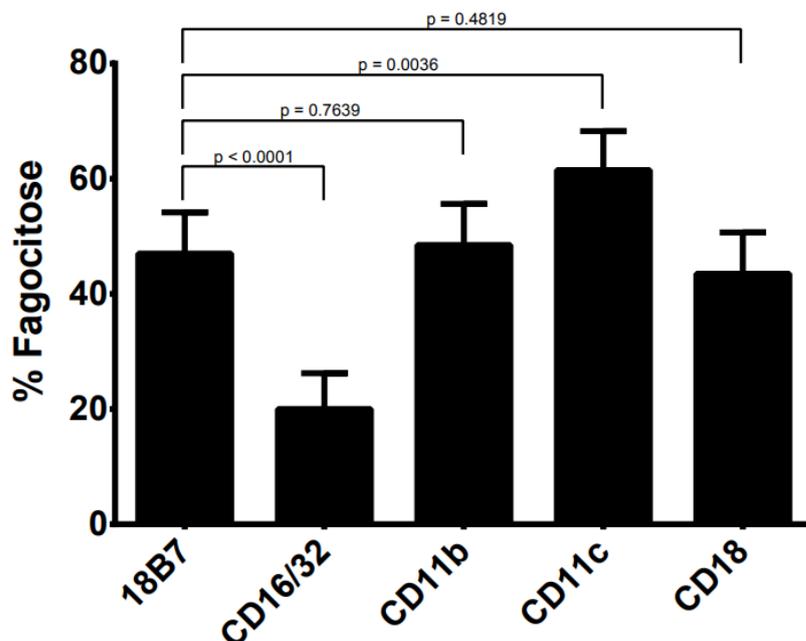


Figura 3. Ensaio de bloqueio de fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos na presença do mAB 18B7 como opsonina. Macrófagos foram incubados com células fúngicas previamente opsonizadas com 1 µg/mL do mAB 18B7. Após 2h de interação as células foram lavadas para remoção de leveduras não internalizadas e coradas com kit panótico para contagem do percentual de macrófagos contendo leveduras internalizadas na presença da opsonina apenas, ou na presença da opsonina e diferentes combinações dos mABs de bloqueio. Para bloqueio dos receptores CR3 e CR4 foram usados o mAB CD11b, mAB CD11c ou mAB CD18. Para bloqueio dos receptores FC foi usado o mAB CD16/32. Para cada condição experimental foram contados 100 macrófagos. O experimento apresentado nesta figura representa a média de três replicatas biológicas para cada condição.

Um segundo ensaio foi então realizado em que se usou tanto o anticorpo quanto diferentes concentrações de soro como fonte de moléculas do complemento (Figura 4). Nesse ensaio, foram testados apenas os bloqueadores para as diferentes subunidades dos receptores CR, usando o bloqueador anti-CD18 isolado ou em conjunto com os bloqueadores para CD11b e CD11c (mix com os três anticorpos de bloqueio). Surpreendentemente, observa-se um aumento significativo na fagocitose mediada pelo anticorpo 18B7 tanto na presença do bloqueio do CD18 sozinho ou quando em conjunto com os bloqueadores para CD11b e CD11c (mix). No entanto, não conseguimos achar uma explicação para esse aumento na fagocitose mediada por receptores Fc na presença de bloqueio dos receptores CR (Figura 4).

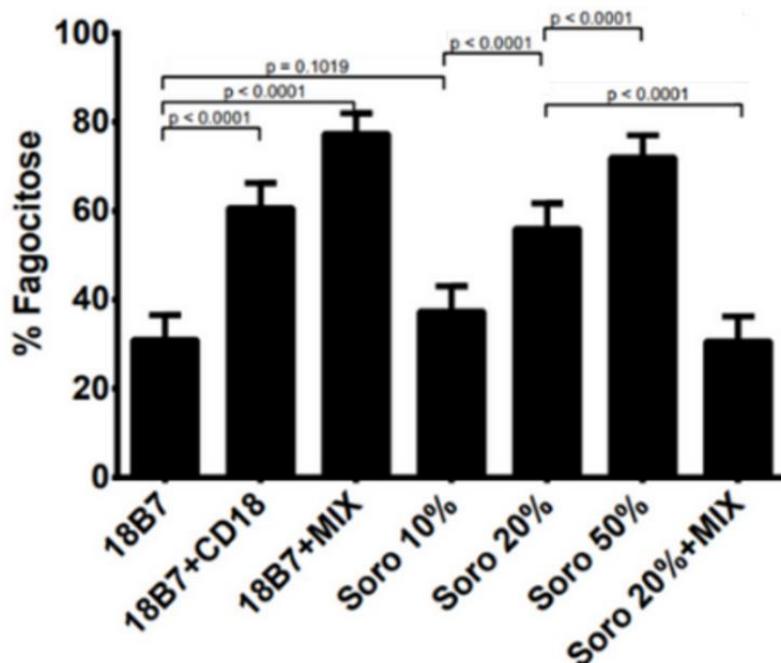


Figura 4. Ensaio de bloqueio de fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos na presença do mAB 18B7 e soro de cobaia em diferentes concentrações como opsoninas. Macrófagos foram incubados com células fúngicas previamente opsonizadas com 1 µg/mL do mAB 18B7 ou concentrações de 10%, 20% ou 50% de soro de cobaia. Após 2h de interação as células foram lavadas para remoção de leveduras não internalizadas e coradas com kit panótico para contagem do percentual de macrófagos contendo leveduras internalizadas na presença da opsonina apenas, ou na presença da opsonina e diferentes combinações dos mABs de bloqueio. Para bloqueio dos receptores FC, CR3 e CR4 opsonizados por mAB 18B7 foram usados o mAB CD18 ou mix de mAB CD18+CD16/32+CD11b+CD11c. Para bloqueio dos receptores CR3 e CR4 opsonizados por soro de cobaia foram usados o mAB mix de CD11b+CD11c+CD18. Para cada condição experimental foram contados 100 macrófagos. O experimento apresentado nesta figura representa a média de três replicatas biológicas para cada condição.

Por sua vez, um efeito dose dependente na fagocitose do fungo mediada na presença de 3 concentrações diferentes de soro é mostrado (Figura 4). Além disso, quando testado o potencial de inibição do mix contra as três subunidades dos CRs, uma diminuição significativa na fagocitose do fungo é notada, indicando que o bloqueio estava acontecendo embora não tenha sido completo, semelhante ao que se observa no bloqueio do receptor Fc na fagocitose mediada por anticorpo.

Para avaliar se o mix de anticorpos bloqueadores contra Fc ou CR poderia funcionar melhor em concentrações mais altas, testamos três concentrações finais 1, 5 e 10 µg/mL dos anticorpos de bloqueio contra o receptor Fc gama (Figura 5a) ou contra os receptores CR (Figura 5b). Quando a fagocitose foi mediada pelo mAB 18B7 na presença de diferentes concentrações do anticorpo de bloqueio CD16/CD32 observamos resultados pouco consistentes, diferentes do que observamos na figura 3, onde observamos uma diminuição significativa na fagocitose na presença de

1 μg do anticorpo de bloqueio. Nesse conjunto de experimentos observamos uma diminuição significativa apenas na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sugerindo que o anticorpo poderia estar perdendo sua atividade (Figura 5a). Por sua vez os experimentos onde a fagocitose foi mediada por soro, observamos um efeito dose dependente na diminuição da fagocitose na presença de concentrações crescentes dos anticorpos de bloqueio, em especial nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 5b). No entanto, essas concentrações inviabilizaram o uso desses anticorpos de bloqueio como controles nos experimentos de fagocitose e análise de expressão gênica dos macrófagos em resposta a internalização do fungo mediada por essas opsoninas, por questões econômicas. Além disso, um dos anticorpos de bloqueio acabou no meio das diferentes replicatas, e precisaria ser importado, inviabilizando a sua utilização.

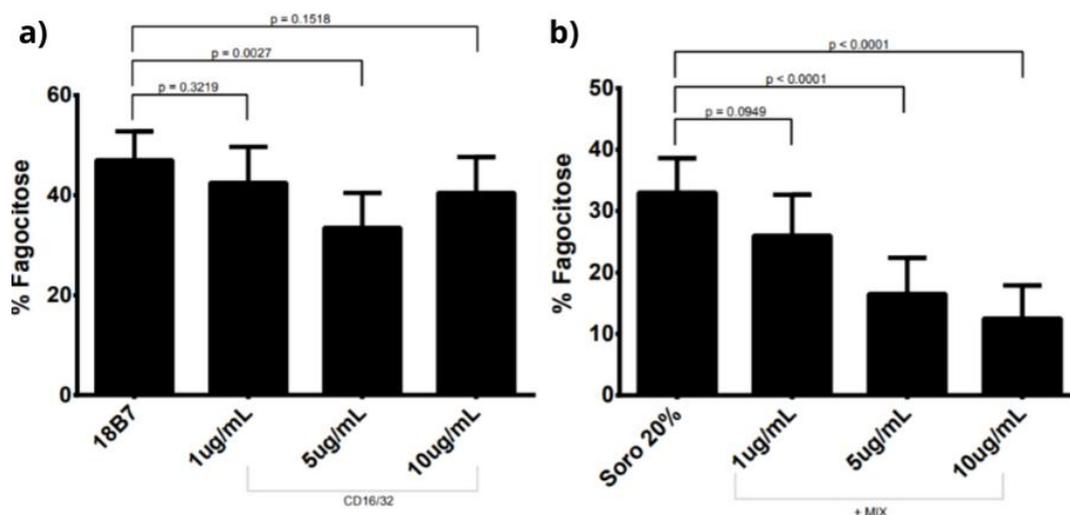


Figura 5. Ensaio de bloqueio de fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos na presença do mAB 18B7 e soro de cobaia como opsoninas em diferentes concentrações de bloqueadores. Macrófagos foram incubados com células fúngicas previamente opsonizadas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do mAB 18B7 ou com soro de cobaia 20%. Após 2h de interação as células foram lavadas para remoção de leveduras não internalizadas e coradas com kit panótico para contagem do percentual de macrófagos contendo leveduras internalizadas na presença da opsonina apenas, ou na presença da opsonina e diferentes combinações dos mABs de bloqueio. (A) Fagocitose na presença do mAB 18B7 sozinho ou na presença de diferentes concentrações do anticorpo de bloqueio para o receptor Fc mAB anti CD16/32 nas concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (B) Fagocitose na presença de soro de cobaia (fonte de moléculas do complemento) sozinho ou na presença do mix de mAB de bloqueio (anti-CD18+CD11b+CD11c) nas concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para cada condição experimental foram contados 100 macrófagos. O experimento apresentado nesta figura representa a média de três replicatas biológicas para cada condição.

Dessa forma, em todos os nossos experimentos o bloqueio dos receptores se mostrou parcial, inviabilizando em parte seu uso como condição controle de interação dos macrófagos com o fungo sem que houvesse internalização de *C. neoformans*. Esses resultados levaram a crer que os bloqueadores não estavam funcionando como deveriam, o que pode ter sido resultado de perda da atividade dos anticorpos.

A partir destes resultados, devido à falta de bloqueadores suficientes para dar continuidade nos experimentos, visto que somente percebeu-se uma inibição significativa em concentrações altas que inviabilizaram o experimento, decidimos continuar os ensaios sem os controles de bloqueio dos receptores de Fc ou CR como planejado e com base nos resultados descritos por Taborda e Casadevall (2002). Segundo os autores a fagocitose por 18B7 pode ser mediada tanto por Fc quanto por CR. Estudos anteriores sugerem que *C. neoformans* pode escapar da resposta imunológica do hospedeiro utilizando sua cápsula polissacarídica como barreira física, dificultando o reconhecimento pelas células fagocitárias (CASADEVALL; PERFECT, 1998; NAYAK et al., 2010). Essa cápsula não apenas bloqueia a fagocitose eficiente, mas também inibe diretamente a ativação de vias inflamatórias essenciais para a eliminação do fungo. A capacidade do *C. neoformans* de modular sua interação com macrófagos sugere que ele pode criar um ambiente de latência ou minimizar a inflamação, evitando uma resposta exacerbada que poderia eliminá-lo (BUCHANAN; MURPHY, 1998; HULL; HEITMAN, 2002; NAYAK et al., 2010).

Além disso, a literatura indica que a variação no tamanho das células de *C. neoformans* pode contribuir para a evasão da resposta imunológica. Células gigantes, conhecidas como "células Titãs", são grandes demais para serem fagocitadas eficientemente, o que reduz a ativação de vias pró-inflamatórias nos macrófagos (ZARAGOZA et al., 2010; OKAGAKI et al., 2010; ZARAGOZA; NIELSEN, 2013). Embora não tenha sido estudado diretamente essas células gigantes, é plausível que a heterogeneidade nas características do fungo influencie a resposta imunológica observada nos nossos resultados.

5.2 Expressão de genes relacionados à resposta imunológica do fungo em macrófagos infectados por *C. neoformans*.

As imagens obtidas dos experimentos de interação mostraram resultados favoráveis à fagocitose na presença de 18B7 e soro 20%. A observação feita através

da coloração com o Kit Panótico revelou que houve um aumento da fagocitose nos poços com a presença das opsoninas em relação ao controle sem opsoninas, como era esperado pela equipe.

Baseado na confirmação da fagocitose e na quantificação e análise de integridade do RNA apresentando resultados promissores, foi realizada a RT-qPCR para os genes selecionados e os resultados da análise estatística são mostrados no gráfico (Figura 6).

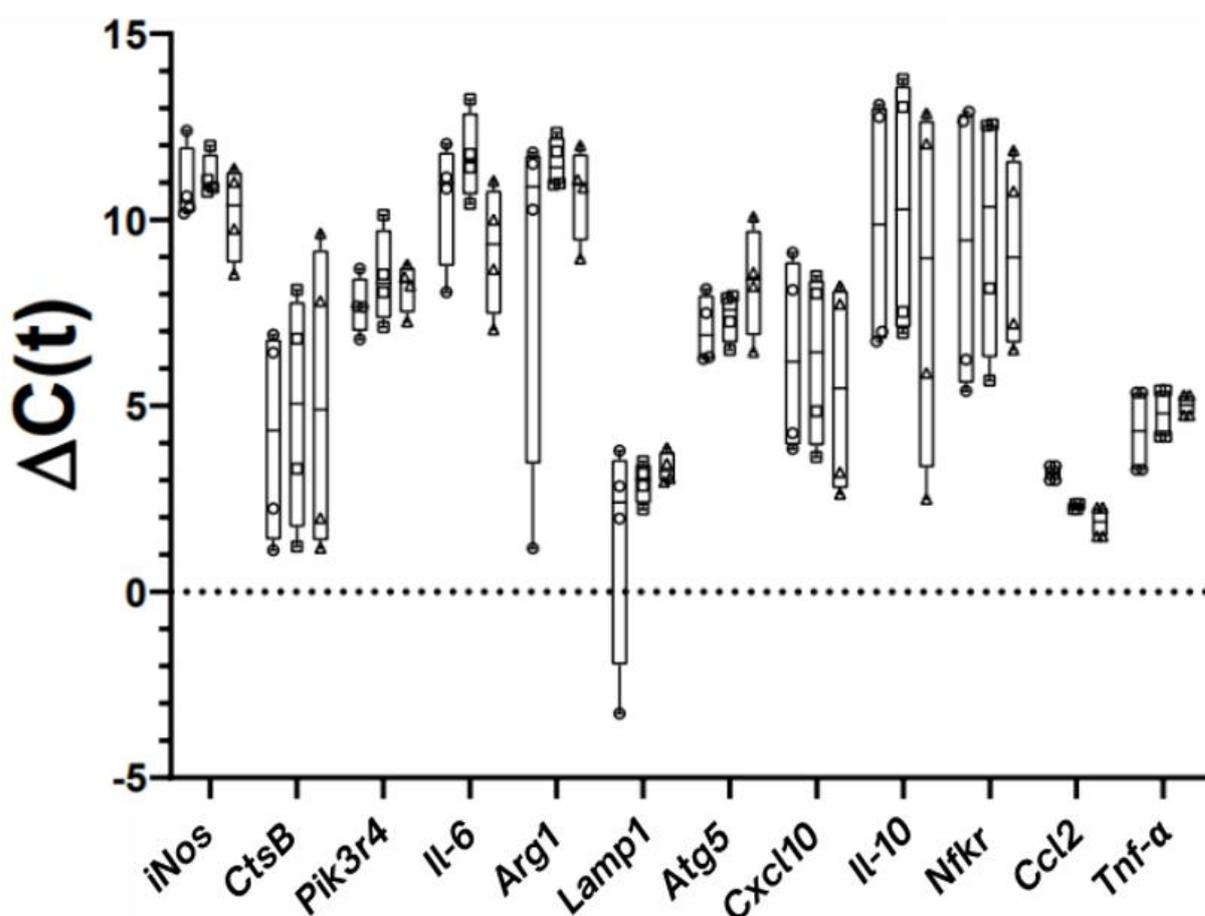


Figura 6. Gráfico delta-C(t)s para cada um dos genes-alvos em relação ao controle endógeno da actina. Análise do acúmulo de transcritos para diferentes genes relacionados à resposta imunitária contra *C. neoformans* em macrófagos sozinhos (círculos), macrófagos que foram incubados na presença do fungo previamente opsonizado com 18B7 (quadrados) e macrófago com fungo previamente opsonizado por soro 20% (triângulos). Os valores de $\Delta C(t)$ para normalização foram calculados para cada gene-alvo em relação ao controle endógeno de actina, utilizando dados agregados de quatro experimentos distintos.

A comparação por ANOVA bidirecional não mostrou diferença estatística em relação à condição de controle para nenhum dos 12 genes relacionados à resposta inflamatória, incluindo marcadores clássicos como TNF- α e IL-6, não revelou diferenças estatisticamente significativas entre as condições (Figura 6).

A ausência de alterações detectáveis na expressão desses genes pode ser explicada por diversos fatores. Uma possível hipótese é que esses genes sejam modulados por mecanismos pós-transcricionais, que não são capturados na análise de RNA mensageiro. Por exemplo, modificações em proteínas, como fosforilação ou ubiquitinação, podem desempenhar papéis cruciais na ativação da resposta inflamatória sem que ocorram mudanças detectáveis nos níveis de transcritos (LIN et al., 2024; OECKINGHAUS;GHOSH, 2009). Alternativamente, os genes analisados podem não ser os principais mediadores da resposta inflamatória sob as condições experimentais empregadas, sugerindo a necessidade de explorar outras vias ou marcadores inflamatórios mais diretamente envolvidos na interação com *C. neoformans*.

Além disso, o tempo de interação de 2 horas pode ter sido insuficiente para capturar alterações significativas na expressão gênica. Estudos prévios indicam que a ativação gênica pode variar significativamente ao longo do tempo, dependendo da dinâmica da interação hospedeiro-patógeno (SIRONI et al., 2015). Assim, experimentos futuros podem considerar análises cinéticas para mapear a expressão gênica em diferentes intervalos de tempo, permitindo uma visão mais abrangente das respostas temporais.

Outras possibilidades incluem o papel modulador da cápsula polissacarídica de *C. neoformans*. Estudos anteriores demonstraram que a cápsula é altamente eficiente em inibir tanto a fagocitose eficiente quanto a ativação de vias inflamatórias (CASADEVALL; PERFECT, 1998; NAYAK ET AL., 2010). Essa estrutura também pode mascarar epítomos reconhecíveis, reduzindo a ativação imune (ZARAGOZA ET AL., 2010).

Os resultados foram reproduzidos em três replicatas biológicas, o que reforça a robustez dos dados, embora ressalte a necessidade de ampliar a análise para incluir outros genes e mecanismos. Por exemplo, genes relacionados à autofagia, apoptose e metabolismo energético podem desempenhar papéis críticos na resposta dos macrófagos a *C. neoformans* (NICOLA et al., 2012). Adicionalmente, seria

interessante avaliar a produção de citocinas e quimiocinas no nível proteico, uma vez que alterações transcricionais podem não refletir diretamente a funcionalidade celular.

Outro aspecto relevante é a natureza imunomoduladora dos componentes do soro. Apesar de seu papel crítico como fonte de opsoninas, proteínas presentes no soro podem suprimir parcialmente a resposta inflamatória ou interferir nas vias de sinalização ativadas. Estudos sugerem que o fator de ativação plaquetária (PAF) e proteínas reguladoras do complemento podem influenciar na expressão gênica e na fagocitose (SHALIT et al., 1988). Assim, a composição do soro utilizado pode ser outro fator a ser considerado em futuros experimentos.

5.3 Implicações dos resultados e limitações do estudo

Os achados deste estudo oferecem percepções importantes sobre a interação entre *C. neoformans* e macrófagos, mas também destacam as limitações enfrentadas. A ausência de variações na expressão gênica inflamatória pode refletir a capacidade de *C. neoformans* de evitar a ativação imune, uma estratégia evolutiva para sobreviver no hospedeiro. Contudo, limitações técnicas e experimentais devem ser consideradas.

Primeiramente, os custos elevados e a indisponibilidade de reagentes, como anticorpos bloqueadores, restringiram a amplitude dos experimentos. Essa limitação é particularmente relevante em estudos envolvendo múltiplas vias de sinalização, onde a disponibilidade de reagentes de alta qualidade é essencial. Além disso, a eficiência variável dos anticorpos utilizados sugere a necessidade de testes de validação mais rigorosos antes de sua aplicação.

Outro aspecto a ser considerado é o uso de uma linha celular de macrófagos murinos (J774), que pode não refletir completamente as respostas de macrófagos humanos. Apesar de sua ampla utilização em estudos experimentais, diferenças interespecies podem influenciar os resultados e sua aplicabilidade clínica. Assim, futuros estudos podem incluir outros modelos, como macrófagos derivados de monocitos humanos, ou macrófagos derivados de medula óssea de camundongos.

Finalmente, a ausência de análises cinéticas limita a interpretação dos dados de expressão gênica. Como discutido anteriormente, alterações dinâmicas na expressão de genes inflamatórios podem ocorrer em diferentes momentos após a infecção. Estudos futuros devem incorporar abordagens temporais mais detalhadas,

permitindo uma compreensão mais abrangente das respostas inflamatórias ao longo do tempo.

Adicionalmente, a escolha dos genes analisados pode não ter capturado os principais mediadores da interação fungo-hospedeiro. Estudos mais recentes sugerem que vias metabólicas, como a glicólise e a beta-oxidação de ácidos graxos, podem estar diretamente envolvidas na ativação de macrófagos em contextos infecciosos (MALEMNGANBA; RATTAN; PRAJAPATI, 2024). A inclusão de genes associados a essas vias pode trazer novas perspectivas sobre os mecanismos subjacentes à interação com *C. neoformans*.

Por fim, é importante considerar o impacto potencial do ambiente experimental *in vitro*. As condições artificiais podem não refletir completamente o microambiente dos tecidos humanos, onde interações mais complexas ocorrem entre células imunes e o patógeno. Isso ressalta a importância de validar os achados em modelos fisiologicamente similares, como estudos *in vivo* ou organóides.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a fagocitose mediada por opsoninas é eficiente, evidenciando o papel essencial dos receptores Fc e CR na internalização de *C. neoformans* pelos macrófagos. No entanto, essa eficiência não se traduziu em alterações significativas na expressão dos genes inflamatórios analisados, sugerindo que o fungo emprega estratégias sofisticadas de evasão imunológica para evitar a ativação de respostas inflamatórias.

A ausência de variações na expressão gênica pode refletir a regulação pós-transcricional ou a supressão direta da sinalização celular pelo fungo.

Esses achados têm implicações importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra a criptococose. A identificação de vias alternativas de sinalização inflamatória e de novos alvos moleculares pode contribuir para o avanço de abordagens mais eficazes no combate à infecção. Para estudos futuros, recomenda-se investigar outros genes e proteínas envolvidos na resposta imune, realizar estudos cinéticos para identificar momentos críticos na interação fungo-hospedeiro, explorar modelos experimentais mais representativos, incluindo macrófagos primários murinos ou humanos, avaliar a produção de citocinas e quimiocinas no nível proteico para complementar os dados transcricionais, estudar

vias metabólicas e seu papel na ativação ou supressão da resposta imune e validar os achados em modelos *in vivo* para melhor contextualizar os resultados em condições fisiológicas.

Em suma, os resultados deste estudo ampliam a compreensão das estratégias adaptativas de *C. neoformans* e oferecem uma base sólida para investigações futuras, contribuindo para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas contra a criptococose. Tais avanços podem levar a tratamentos mais eficazes, especialmente para pacientes imunossuprimidos, que permanecem altamente vulneráveis a essa infecção potencialmente fatal.

7 REFERÊNCIAS

ALVAREZ, Mauricio; CASADEVALL, Arturo. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2161-2165, 2006.

BETTELLI, Estelle; CARRIER, Yijun; GAO, Wenda; KORN, Thomas; STROM, Terry B.; OUKKA, Mohamed; WEINER, Howard L.; KUCHROO, Vijay K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235-238, 2006.

BICANIC, Tihana; HARRISON, Thomas; NIEPIEKLO, Alina; DYAKOPU, Nontobeko; MEINTJES, Graeme. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 8, p. 1069-1070, 2006.

BILLMYRE, R. Blake; CLANCEY, Shelly Applen; HEITMAN, Joseph. Natural mismatch repair mutations mediate phenotypic diversity and drug resistance in *Cryptococcus deuterogattii*. **Elife**, v. 6, p. e28802, 2017.

BIVANCO, Fabiana Carla; MACHADO, Carlos D.'Aparecida; MARTINS, Eduardo Lacaz. Criptococose cutânea. **Arquivos Médicos do ABC**, v. 31, n. 2, 2006.

BOVERS, Marjan; HAGEN, Ferry; BOEKHOUT, Teun. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 1, p. S4, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e Epidemiológica da Criptococose** - Brasília/ DF, p. 1-18, 2012.

BROWN, Gordon D.; GORDON, Siamon. A new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36-37, 2001.

BUCHANAN, Kent L.; MURPHY, Juneann W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 71, 1998.

CARROLL, Scott F.; LAFFERTY, Erin I.; FLACZYK, Adam; FUJIWARA, T. Mary ; HOMER, Robert; MORGAN, Kenneth; LOREDO-OSTI, J C.; QURESHI, Salman T..

Susceptibility to progressive *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection is regulated by loci on mouse chromosomes 1 and 9. **Infection and immunity**, v. 80, n. 12, p. 4167-4176, 2012.

CASADEVALL, Arturo; PERFECT, John R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington, DC: ASM press, 1998.

CASADEVALL, Arturo; CLEARE, Wendy; FELDMESSER, Marta; GLATMAN-FREEDMAN, Aharona; GOLDMAN, David L.; KOZEL, Thomas R.; LENDVAI, Nikoletta; MUKHERJEE, Jean; PIROFSKI, Liise-anne; RIVERA, Johanna; ROSAS, Angel L; SCHARFF, Matthew D.; VALADON, Philippe; WESTIN, Katherine; ZHONG, Zhaojing. Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1437-1446, 1998.

CHAI, S. M.; TEOH, S. C. Ocular cryptococcosis as a presenting manifestation of cryptococcal meningitis in a patient with HIV. **International journal of STD & AIDS**, v. 23, n. 5, p. 377-378, 2012.

CHAND-GOYAL, T.; SPOTTS, R. A. Enumeration of bacterial and yeast colonists of apple fruits and identification of epiphytic yeasts on pear fruits in the Pacific Northwest United States. **Microbiological research**, v. 151, n. 4, p. 427-432, 1996.

CHANG, M. R; PANIAGO, A. M. M.; SILVA, M. M.; LAZÉRA, M. S.; WANKE B.. Prostatic cryptococcosis: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, p. 378-385, 2008.

CHAYAKULKEEREE, Methee; SORRELL, Tania C.; SIAFAKAS, A. Rosemary; WILSON, Christabel F.; PANTARAT, Namfon; GERIK, Kimberly J.; BOADLE, Ross; DJORDJEVIC, Julianne T. Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 69, n. 4, p. 809-826, 2008.

CHEN, S. C; WRIGHT, L C; SANTANGELO, R. T.; MULLER, M.; MORAN, V. R.; KUCHEL, P. W.; SORRELL, T. C.. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 65, n. 2, p. 405-411, 1997.

CHENG, Ming-Fang; CHIOU, Christine C.; LIU, Yung-Ching; WANG, Hao-Zan; HSIEH, Kai-Sheng. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1608-1611, 2001.

CHENG, Po-Yan; SHAM, Anita; KRONSTAD, James W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 10, p. 4284-4294, 2009.

COSTA, Ana KF; SIDRIM, José J. C.; CORDEIRO, Rossana A.; BRILHANTE, Raimunda S. N.; MONTEIRO, André J.; ROCHA, Marcos F. G.. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. **Mycopathologia**, v. 169, p. 207-213, 2010.

COX, Gary M; MUKHERJEE, Jean; COLE, Garry T.; CASADEVALL, Arturo; PERFECT, John R.. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.

DAËRON, Marc. Structural bases of FcγR functions. **International reviews of immunology**, v. 16, n. 1-2, p. 1-27, 1997.

DIEKEMA, D. J; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A.. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3623-3626, 2003.

ECKER, Dawn M.; JONES, Susan Dana; LEVINE, Howard L. The therapeutic monoclonal antibody market. In: **MAbs**. Taylor & Francis, 2015. p. 9-14.

ELLIS, David H.; PFEIFFER, Tania J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1642-1644, 1990.

ENGELTHALER, David M; HICKS, Nathan D.; GILLECE, John D.; ROE, Chandler C.; SCHUPP, James M.; DRIEBE, Elizabeth M.; GILGADO, Felix; CARRICONDE, Fabian; TRILLES, Luciana; FIRACATIVE, Carolina; NGAMSKULRUNGROJ, Popchai; CASTAÑEDA, Elizabeth; LAZERA, Marcia dos Santos; MELHEM, Marcia S. C.;

PÉREZ-BERCOFF, Åsa; HUTTLEY, Gavin; SORRELL, Tania C.; VOELZ, Kerstin; MAY, Robin C.; FISHER, Matthew C.; THOMPSON III, George R.; LOCKHART, Shawn R.; KEIM, Paul; MEYER, Wieland. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. **MBio**, v. 5, n. 4, p. 10.1128/mbio.01464-14, 2014.

FAGANELLO, Josiane. Estudo da variabilidade e diferenças morfológicas entre as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* por análise de diferença representacional e microscopia eletrônica de varredura. 2008.

FALCI, Diego Rodrigues; PASQUALOTTO, Alessandro Comaru. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical and biomedical research. Porto Alegre. Vol. 35, n. 2,(2015), p. 65-82**, 2015.

FIORENTINO, David F.; ZLOTNIK, A; MOSMANN, T R; HOWARD, M; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 197, n. 5, p. 1539-1546, 2016.

FRIDMAN, Wolf H. Fc receptors and immunoglobulin binding factors 1. **The FASEB journal**, v. 5, n. 12, p. 2684-2690, 1991.

FRIEDMAN, Deanna; KONGTHAVONSAKUL, Kritsana; OBERDORFER, Peninnah. Disseminated cryptococcosis in an HIV-positive boy. **Case Reports**, v. 2012, p. bcr2012007036, 2012.

FROTHINGHAM, Langdon. A tumor-like lesion in the lung of a horse caused by a blastomyces (torula). **The Journal of Medical Research**, v. 8, n. 1, p. 31, 1902.

GONÇALVES, Laura Maria Barbosa. Análise da expressão de genes em macrófagos durante uma cinética de interação com o paracoccidioides brasiliensis. 2010. 63 f. **Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)**-Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

GRANADOS, D. P.; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microbial ecology**, v. 49, p. 282-290, 2005.

GUGLANI, Lokesh; KHADER, Shabaana A. Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 2, p. 120-127, 2010.

HALE, Amber N.; LEDBETTER, Dan J.; GAWRILUK, Thomas R.; RUCKER III, Edmund B. Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy*, v. 9, n. 7, p. 951-972, 2013.

HOLE, Camaron R; BUI, Hoang; WORMLEY, Floyd L.; WOZNIAK, Karen L. Mechanisms of dendritic cell lysosomal killing of *Cryptococcus*. **Scientific reports**, v. 2, n. 1, p. 739, 2012.

HORCAJADA, Juan P.; PEÑA, Jose L.; MARTÍNEZ-TABOADA, Víctor M.; PINA, Trinitario; BELAUSTEGUI, Isabel; CANO, María Eliecer; GARCÍA-PALOMO, Daniel; FARIÑAS, M Carmen. Invasive cryptococcosis and adalimumab treatment. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 953, 2007.

HUANG, Hua-Rong; FAN, Li-Chao; RAJBANSHI, Bhavana; XU, Jin-Fu. Evaluation of a new cryptococcal antigen lateral flow immunoassay in serum, cerebrospinal fluid and urine for the diagnosis of cryptococcosis: a meta-analysis and systematic review. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0127117, 2015.

HUFFNAGLE, Gary B.; STRIETER, R M; STANDIFORD, T J; MCDONALD, R A; BURDICK, M D; KUNKEL, S L; TOEWS, G B. The role of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4⁺ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 155, n. 10, p. 4790-4797, 1995.

HULL, Christina M.; HEITMAN, Joseph. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annual review of genetics**, v. 36, n. 1, p. 557-615, 2002.

HUYNH, Cassidy K.; ESKELINEN, Eeva-Liisa; SCOTT, Cameron C.; MALEVANETS, Anatoly; SAFTIG, Paul; GRINSTEIN, Sergio. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. **The EMBO journal**, v. 26, n. 2, p. 313-324, 2007.

JANBON, Guilhem; ORMEROD, Kate L.; PAULET, Damien; BYRNES III, Edmond J; YADAV, Vikas; CHATTERJEE, Gautam; MULLAPUDI, Nandita; HON, Chung-Chau; BILLMYRE, R. Blake; BRUNEL, François; BAHN, Yong-Sun; CHEN, Weidong; CHEN,

Yuan; CHOW, Eve, W. L.; COPPÉE, Jean-Yves; FLOYD-AVERETTE, Anna; GAILLARDIN, Claude; GERIK, Kimberly J.; GOLDBERG, Jonathan; GONZALEZ-HILARION, Sara; GUJJA, Sharvari; HAMLIN, Joyce L.; HSUEH, Yen-Ping; IANIRI, Giuseppe; JONES, Steven; KODIRA, Chinnappa D.; KOZUBOWSKI, Lukasz; LAM, Woei; MARRA, Marco; MESNER, Larry D.; MIECZKOWSKI, Piotr A.; MOYRAND, Frédérique; NIELSEN, Kirsten; PROUX, Caroline; ROSSIGNOL, Tristan; SCHEIN, Jacqueline E.; SUN, Sheng; WOLLSCHLAEGER, Carolin; WOOD, Ian A.; ZENG, Qiandong; NEUVÉGLISE, Cécile; NEWLON, Carol S.; PERFECT, John R.; LODGE, Jennifer K.; IDNURM, Alexander; STAJICH, Jason E.; KRONSTAD, James W.; SANYAL, Kaustuv; HEITMAN, Joseph; FRASER, James A.; CUOMO, Christina A.; DIETRICH, Fred S.. Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reveals complex RNA expression and microevolution leading to virulence attenuation. **PLoS genetics**, v. 10, n. 4, p. e1004261, 2014.

KAWAKAMI, Kazuyoshi; KINJO, Yuki; UEZU, Kaori; YARA, Satomi; MIYAGI, Kazuya; KOGUCHI, Yoshinobu; NAKAYAMA, Toshinori; TANIGUCHI, Masaru; SAITO, Atsushi. Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V α 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6525-6532, 2001.

KÖHLER, Georges; MILSTEIN, Cesar. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KWON-CHUNG, K. J. A new species of Filobasidiella, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycologia**, v. 68, n. 4, p. 942-946, 1976.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; RHODES, J. C. Taxonomic studies on Filobasidiella species and their anamorphs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 48, p. 25-38, 1982.

KWON-CHUNG, Kyung J; FRASER, James A.; DOERING, Tamara L.; WANG, Zhuo A.; JANBON, Guilhem; IDNURM, Alexander; BAHN, Yong-Sun. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

LIN, Yunfan; LIN, Pei; LU, Ye; ZHENG, Jiarong; ZHENG, Yucheng; HUANG, Xiangyu; ZHAO, Xinyuan; CUI, Li. Post-Translational Modifications of RNA-Modifying Proteins in Cellular Dynamics and Disease Progression. **Advanced Science**, v. 11, n. 44, p. 2406318, 2024.

LITTMAN, Me L. Cryptococcosis (Torulosis): Current concepts and therapy. **The American journal of medicine**, v. 27, n. 6, p. 976-998, 1959.

MA, Hansong; CROUDACE, Joanne E.; LAMMAS, David A.; MAY, Robin C. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2156-2160, 2006.

MA, Hansong; MAY, Robin C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in applied microbiology**, v. 67, p. 131-190, 2009.

MAFRA, Mayara de Oliveira; NEVES, Rejane Nina M.; LIMA, Domingos Sávio N.; TAKATANI, Massanobu; PASSOS, Luiz Fernando de Souza; RIBEIRO, Sandra Lúcia Euzébio. Criptococose disseminada em lúpus eritematoso sistêmico juvenil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, p. 373-378, 2008.

MALEMNGANBA, Takhellambam; RATTAN, Aditi; PRAJAPATI, Vijay Kumar. Decoding macrophage immunometabolism in human viral infection. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, v. 140, p. 493-523, 2024.

MANCARDI, D; DAËRON M. Fc receptors in immune responses. **Reference module in biomedical sciences**. 2014. O'Quinn,

MANGAN, Paul R.; HARRINGTON, Laurie E.; O'QUEEN, Darrell B.; HELMS, Whitney S.; BULLARD, Daniel C.; ELSON, Charles O.; HATTON, Robin D.; WAHL, Sharon M.; SCHOEB, Trenton R.; WEAVER, Casey T. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.

MARTINEZ, Roberto. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, p. 449-460, 2006.

MAY, Robin C; STONE, Neil R.H.; WIESNER, Darin L.; BICANIC, Tihana; NIELSEN, Kirsten. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106-117, 2016.

SHALIT, Meir; ALLMEN, Carolyn Von; ATKINS, Paul C; ZWEIMAN, Burton. Platelet Activating Factor Increases Expression of Complement Receptors on Human Neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 44, n. 3, p. 212–217, 1988.

MEYER, Wieland; MARSZEWSKA, Krystyna; AMIRMOSTOFIAN, Mitra; IGREJA, Ricardo Pereira; HARDTKE, Claudia; METHLING, Katharina; VIVIANI, Maria Anna; CHINDAMPORN, Ariya; SUKROONGREUNG, Samaniya; JOHN, Melanie Ann; ELLIS, David H.; SORRELL, Tania C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **ELECTROPHORESIS: An International Journal**, v. 20, n. 8, p. 1790-1799, 1999.

MEYER, Wieland; CASTAÑEDA, Alexandra; JACKSON, Stuart; HUYNH, Matthew; CASTAÑEDA, Elizabeth. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 2, p. 189, 2003.

MOLLOY, Síle F; KANYAMA, Cecilia; HEYDERMAN, Robert S.; LOYSE, Angela; KOUANFACK, Charles; CHANDA, Duncan; MFINANGA, Sayoki; TEMFACK, Elvis; LAKHI, Shabir; LESIKARI, Sokoine; CHAN, Adrienne K.; STONE, Neil; KALATA, Newton; KARUNAHARAN, Natasha; GASKELL, Kate; PEIRSE, Mary; ELLIS, Jayne; CHAWINGA, Chimwemwe; LONTSI, Sandrine; NDONG, Jean-Gilbert; BRIGHT, Philip; LUPIYA, Duncan; CHEN, Tao; BRADLEY, John; ADAMS, Jack; van der Horst, Charles; VAN OOSTERHOUT, Joep J.; SINI, Victor; MAPOURE, Yacouba N.; MWABA, Peter; BICANIC, Tihana; LALLOO, David G; WANG, Duolao; HOSSEINIPOUR, Mina C.; LORTHOLARY, Olivier; JAFFAR, Shabbar; HARRISON, Thomas S.. Antifungal combinations for treatment of cryptococcal meningitis in Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 11, p. 1004-1017, 2018.

MORRISON, Sherie L. Transfectomas provide novel chimeric antibodies. **Science**, v. 229, n. 4719, p. 1202-1207, 1985.

MURPHY, William J. GENES, I. NITRIC OXIDE SYNTHASE. Transcriptional regulation of the genes encoding nitric oxide synthase. **Cellular and Molecular Biology of Nitric Oxide**, p. 1, 1999.

NAYAK, J.B.; BRAHMBAHTT, M. N.; SAVALIA, C. V.; PAL, M.; BHANDERI, B. B. Cryptococcosis: a garded mycosis threat. **Research Journal of Veterinary Sciences**, v. 3, n. 2, p. 101-112, 2010.

NICOLA, André Moraes; ALBUQUERQUE, Patrícia; MARTINEZ, Luis R; DAL-ROSSO, Rafael Antonio; SAYLOR, Carolyn; JESUS, Magdia De; NOSANCHUK, Joshua D; CASADEVALL, Arturo. Macrophage autophagy in immunity to *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infection and immunity*, v. 80, n. 9, p. 3065-3076, 2012.

NOVERR, Mairi C.; COX, Gary M.; PERFECT, John R.; HUFFNAGLE, Gary B. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1538-1547, 2003.

O'CONNOR, Lucy; LIVERMORE, Joanne; SHARP, Andrew D.; GOODWIN, Joanne; GREGSON, Lea; HOWARD, Susan J.; FELTON, Timothy W.; SCHWARTZ, Julie A.; NEELY, Michael N.; HARRISON, Thomas S.; PERFECT, John R.; HOPE, William W. Pharmacodynamics of liposomal amphotericin B and flucytosine for cryptococcal meningoencephalitis: safe and effective regimens for immunocompromised patients. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 2, p. 351-361, 2013.

OECKINGHAUS, Andrea; GHOSH, Sankar. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 4, p. a000034, 2009.

OKAGAKI, Laura H.; STRAIN, Anna K.; NIELSEN, Judith N.; CHARLIER, Caroline; BALTES, Fabrice CHRÉTIEN, Nicholas J.; HEITMAN, Joseph; DROMER, Françoise; NIELSEN, Kirsten. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000953, 2010.

PAL, Mahendra; MEHROTRA, B. S. Cryptococcal Mastitis in Daily Animals/Cryptococccen-Mastitis bei Milchvieh. **Mycoses**, v. 26, n. 12, p. 615-616, 1983.

PANTOJA, Maria das Graças Lopes; SILVEIRA, Daniela Maria Raulino da; SILVA, Liene Duarte. Criptococose disseminada em paciente imunocompetente: relato de caso. **Rev. Paraense Med**, v. 23, n. 3, p. 1-6, 2009.

PAPPALARDO, Mara CSM; MELHEM, Márcia SC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 299-305, 2003.

PAPPAS, Peter G.; PERFECT, John R.; CLOUD, Gretchen A.; LARSEN, Robert A.; PANKEY, George A.; LANCASTER, Daniel J.; HENDERSON, Harold; KAUFFMAN, Carol A.; HAAS, David W.; SACCENTE, Michael; HAMILL, Richard J.; HOLLOWAY, Melissa S.; WARREN, Robert M.; DISMUKES, William E.. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 690-699, 2001.

PARK, Benjamin J.; WANNEMUEHLER, Kathleen Ab; MARSTON, Barbara Jc; GOVENDER, Neleshd; PAPPAS, Peter Ge; CHILLER, Tom Ma . Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.

PEDROSO, R.S.; CANDIDO, R.C. Diagnóstico laboratorial da criptococose. **NewLab**, v.77, p.94-102, 2006.

PERFECT, John R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 463-468, 2006.

PERFECT, John R.; BICANIC, Tihana. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 49-54, 2015.

PYRGOS, Vasilios; SEITZ, Amy E.; STEINER, Claudia A.; PREVOTS, D. Rebecca; WILLIAMSON, Peter R. Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997–2009. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56269, 2013.

RAJASINGHAM, Radha; GOVENDER, Nelesh P; JORDAN, Alexander; LOYSE, Angela; SHROUFI, Amir; DENNING, Prof David W.; MEYA, David B; CHILLER, Tom M; BOULWARE, Prof David R. The global burden of HIV-associated cryptococcal

infection in adults in 2020: a modelling analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 22, n. 12, p. 1748-1755, 2022.

RATH, Meera; MÜLLER, Ingrid; KROPF, Pascale; CLOSS, Ellen I.; MUNDER, Markus. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 532, 2014.

ROHATGI, Soma; PIROFSKI, Liise-anne. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. **Future microbiology**, v. 10, n. 4, p. 565-581, 2015.

ROBERT, Vincent A.; CASADEVALL, Arturo. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 10, p. 1623-1626, 2009.

SAAG, Michael S.; GRAYBILL, Richard J.; LARSEN, Robert A.; PAPPAS, Peter G.; PERFECT, John R.; POWDERLY, William G.; SOBEL, Jack D.; DISMUKES, William E. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 710-718, 2000.

SALAS, S. D.; BENNETT, J E; KWON-CHUNG, K J; PERFECT, J R; WILLIAMSON, P R. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 2, p. 377-386, 1996.

SALAZAR, Fabián; BROWN, Gordon D. Antifungal innate immunity: a perspective from the last 10 years. **Journal of innate immunity**, v. 10, n. 5-6, p. 373-397, 2018.

SATIE-KON, Adriana; GRUMACH, Anete Svciaovic; COLOMBO, Arnaldo Lopes; PENALVA, Augusto César Oliveira; WANKE, Bodo; TELLES, Flavio de Queiroz; SEVERO, Luiz Carlos; ARANHA, Luis Fernando; LAZÉRA, Márcia dos Santos; RESENDE, Mariângela Ribeiro; SALMITO, Maria do Amparo; SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida; MORETTI, Maria Luiza; FERREIRA, Marcelo Simão; SILVA-VERGARA, Mario León; ANDRADE, Najara Maria Procópio; TRABASSO, Plínio; MENDES, Rinaldo Pôncio; MARTINEZ, Roberto; PONZIO, Vinicius. Consenso em criptococose – 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 524-544, 2008.

SCHWARZ, Patrick; SCHWARZ, Patrick; DROMER, Françoise; LORTHOLARY, Olivier; DANNAOUI, Eric. Efficacy of amphotericin B in combination with flucytosine against flucytosine-susceptible or flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* during disseminated murine cryptococcosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 113-120, 2006.

SCIENTIFIC, Thermo Fisher. Cell culture basics handbook. **UK: Gibco**, 2015.

SEVERO, Cecília Bittencourt; GAZZONI, Alexandra Flávia; SEVERO, Luiz Carlos. Capítulo 3: criptococose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, p. 1136-1144, 2009.

SEVERO, Cecília Bittencourt; XAVIER, Melissa Orzechowski; GAZZONI, Alexandra Flávia; SEVERO, Luiz Carlos. Cryptococcosis in children. **Paediatric respiratory reviews**, v. 10, n. 4, p. 166-171, 2009.

SIRONI, Manuela; CAGLIANI, Rachele; FORNI, Diego; CLERICI, Mario. Evolutionary insights into host–pathogen interactions from mammalian sequence data. *Nature Reviews Genetics*, v. 16, n. 4, p. 224-236, 2015.

SOARES, Helena; WAECHTER, Haena; GLAICHENHAUS, Nicholas; MOUGNEAU, Evelyne; YAGITA, Hideo; MIZENINA, Olga; DUDZIAK, Diana; NUSSENZWEIG, Michel C.; STEINMAN, Ralph M. A subset of dendritic cells induces CD4⁺ T cells to produce IFN- γ by an IL-12–independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *The Journal of experimental medicine*, v. 204, n. 5, p. 1095-1106, 2007.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety gattii. **Medical mycology**, v. 39, n. 2, p. 155-168, 2001.

SPRINGER, Deborah J.; BILLMYRE, R. Blake; FILLER, Elan E.; VOELZ, Kerstin; PURSALL, Rhiannon; MIECZKOWSKI, Piotr A.; LARSEN, Robert A.; DIETRICH, Fred S.; MAY, Robin C.; FILLER, Scott G.; HEITMAN, Joseph. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004285, 2014.

SYME, Rachel M.; BRUNO, Tony F.; KOZEL, Thomas R.; MODY, Christopher H. The capsule of *Cryptococcus neoformans* reduces T-lymphocyte proliferation by reducing phagocytosis, which can be restored with anticapsular antibody. **Infection and immunity**, v. 67, n. 9, p. 4620-4627, 1999.

SYME, Rachel M.; Spurrell, Jason C. L.; Amankwah, Ernest K.; Green, Francis H. Y.; Mody, Christopher H. Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fcγ receptor II for presentation to T lymphocytes. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 5972-5981, 2002.

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

TEITZ-TENNENBAUM, Seagal; VIGLIANTI, Steven P; ROUSSEY, Jonathan A; LEVITZ, Stuart M; OLSZEWSKI, Michal A; OSTERHOLZER, John J. Autocrine IL-10 signaling promotes dendritic cell type-2 activation and persistence of murine cryptococcal lung infection. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 7, p. 2004-2015, 2018.

TELLO, Mercedes; GUTIÉRREZ, Ericson; BÉJAR, Vilma; GALARZA, Carlos; RAMOS, Willy; ORTEGA-LOAYZA, Alex G. Criptococosis. **Revista Médica de Risaralda**, v. 19, n. 2, p. 147-153, 2013.

TSUBOI, Naotake; ASANO, Kenichi; LAUTERBACH, Michael; MAYADAS, Tanya N. Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. **Immunity**, v. 28, n. 6, p. 833-846, 2008.

UNDERHILL, David M.; GOODRIDGE, Helen S. Information processing during phagocytosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 7, p. 492-502, 2012.

VECCHIARELLI, Anna; DOTTORINI, M; PIETRELLA, D; MONARI, C; RETINI, C; TODISCO, T; BISTONI, F. Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 11, n. 2, p. 130-137, 1994a.

VECCHIARELLI, Anna; PIETRELLA, D; DOTTORINI, M; MONARI, C; RETINI, C; TODISCO, T; BISTONI, F. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* regulates fungicidal activity and the antigen presentation process in human alveolar macrophages. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 98, n. 2, p. 217-223, 1994b.

VECCHIARELLI, Anna. Fungal capsular polysaccharide and T-cell suppression: the hidden nature of poor immunogenicity. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 27, n. 6, 2007.

VELDHOEN, Marc; HOCKING, Richard J.; ATKINS, Christopher J.; LOCKSLEY, Richard M.; STOCKINGER, Brigitta. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 179-189, 2006.

VIDAL, José E.; TONIOLO, Carolina; PAULINO, Adriana; COLOMBO, Arnaldo L.; MARTINS, Marilena dos Anjos; MEIRA, Cristina da Silva; AZEVEDO, Renata Guise Soares; PEREIRA-CHIOCCOLA, Vera Lucia; GOMES, Hélio Rodrigues; LAZERA, Marcia dos Santos; DE OLIVEIRA, Augusto C. Penalva; BOULWARE, David R. Performance of cryptococcal antigen lateral flow assay in serum, cerebrospinal fluid, whole blood, and urine in HIV-infected patients with culture-proven cryptococcal meningitis admitted at a Brazilian referral center. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, p. e1, 2018.

WANG, Yulin; CASADEVALL, Arturo. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen-and oxygen-derived oxidants. **Infection and immunity**, v. 62, n. 7, p. 3004-3007, 1994.

WILLIAMSON, Peter R.; JARVIS, Joseph N.; PANACKAL, Anil A.; FISHER, Matthew C.; MOLLOY, Síle F.; LOYSE, Angela; HARRISON, Thomas S. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, p. 13-24, 2017.

WILSON, D. E.; BENNETT, John E.; BAILEY, Johnsie W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 127, n. 3, p. 820-823, 1968.

XIAO, Yanling; PEPERZAK, Victor; KELLER, Anna M.; BORST, Jannie. CD27 instructs CD4⁺ T cells to provide help for the memory CD8⁺ T cell response after protein immunization. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 2, p. 1071-1082, 2008.

YONEYAMA, Hiroyuki; NARUMI, Shosaku; ZHANG, Yanyun; MURAI, Masako; BAGGIOLINI, Marco; LANZAVECCHIA, Antonio; ICHIDA, Takafumi; ASAKURA, Hitoshi; MATSUSHIMA, Kouji. Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 10, p. 1257-1266, 2002.

ZARAGOZA, Oscar; TABORDA, Carlos P.; CASADEVALL, Arturo. 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**, v. 33, n. 7, p. 1957-1967, 2003.

ZARAGOZA, Oscar; RODRIGUES, Marcio L.; DE JESUS, Magdia; FRASES, Susana; DADACHOVA, Ekaterina; CASADEVALL, Arturo. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in applied microbiology**, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZARAGOZA, Oscar; GARCÍA-RODAS, Rocío; NOSANCHUK, Joshua D.; CUENCA-ESTRELLA, Manuel; RODRÍGUEZ-TUDELA, Juan Luis; CASADEVALL, Arturo. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000945, 2010.

ZARAGOZA, Oscar; NIELSEN, Kirsten. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 4, p. 409-413, 2013.

ZHAO, Zijiang; FUX, Blima; GOODWIN, Megan; DUNAY, Ildiko R; STRONG, David; MILLER, Brian C; CADWELL, Ken; DELGADO, Monica A; PONPUAK, Marisa; GREEN, Karen G; SCHMIDT, Robert E; MIZUSHIMA, Noboru; DERETIC, Vojo; SIBLEY, L David; VIRGIN, Herbert W. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. **Cell host & microbe**, v. 4, n. 5, p. 458-469, 2008.