

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

**Modulação do inflamassoma por componentes de cápsula
secretados pelo *Cryptococcus neoformans***

Pedro Henrique Miranda Bürgel

Brasília
2015

PEDRO HENRIQUE MIRANDA BÜRCEL

**Modulação do inflamassoma por componentes de cápsula
secretados pelo *Cryptococcus neoformans***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares

Co-orientador: Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente pai, mãe e irmão, que são a razão de eu ter chegado longe e principalmente a razão de eu achar que devo chegar mais longe ainda.

Ao meu orientador Aldo H. Tavares, por ter me resgatado em um momento de dúvida, me mostrado a imunologia, me aceitado mesmo quando eu não correspondia às expectativas e principalmente por ter sido muito mais que somente um orientador durante estes quatro anos de convívio, por ter sido um educador sem igual e um amigo.

À chefe do laboratório e co-orientadora Anamélia Lorenzetti Bocca, por ter prontamente confiado em mim e me passado o que talvez tenha sido o maior desafio da minha carreira até então, este projeto. Agradeço também a disponibilidade para discutir experimentos e resultados, assim como todas as oportunidades profissionais que este projeto trouxe.

À excelentíssima Yasmin Lima, que durante este projeto foi ao mesmo tempo minha maior inspiração e minha pior distração, me fazendo crescer, conhecer novos horizontes e me mantendo no eixo em momentos críticos. Faltam palavras para agradecer apropriadamente.

Aos meus grandes amigos Fernando Sá e Raffael Castro, que dividiram comigo muitas das angústias e alegrias que se tem quando se está em um projeto de mestrado. Fernando com todo seu criticismo nato e Raffael com os famosos favores de última hora prontamente realizados por ele foram ambos essenciais para este trabalho.

A todos os membros do Laboratório de Imunologia Aplicada, o querido LIA, que diretamente ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho, em especial: Luíza Losada, que me auxiliou muito na busca pela microscopia confocal perfeita; Karina Simon e sua “paçoquita cremosa” salvadora no intervalo de longos experimentos; Márcio Jerônimo, sempre disponível para auxiliar em qualquer experimento e Isaque Medeiros, que foi importantíssimo para as discussões finais deste trabalho.

Às minhas duas alunas de iniciação científica, que me ajudaram em grande parte do trabalho e me ensinaram a ensinar, algo que nenhuma matéria seria capaz de fazer tão bem. Maria Beatriz Nóbrega, que infelizmente pegou um momento conturbado deste projeto; e Helena Ipê, que trouxe uma onda de boa sorte demonstrando que ao dizer exaustivamente que um experimento vai dar certo, as chances de ele dar certo aumentam.

Também a outros colegas, entre professores e alunos, do laboratório de Imunologia e Inflamação (LIMI), do Lab3 da BioMol e do laboratório de Bioquímica Nutricional, que sempre me receberam com um sorriso no rosto e as portas abertas quando era necessário.

Às professoras Andréa Maranhão, Elaine Carbonero e Lorena Derengowski, que prontamente aceitaram fazer parte da avaliação deste trabalho.

Aos meus amigos de fora deste ciclo, em especial Daniel Oliveira, Leandro Martins, Lucas Costa, Roland Montenegro, Renato Goulart, Raphael Santiago, Lucas Amorim, Nádia Silva, Bruno Pinheiro, Marcela Freitas e Thaís Ferreira. Todos foram essenciais para meu crescimento pessoal e mesmo eu sumindo e sendo um péssimo amigo de vez em sempre, tenho todos na mais alta consideração.

Finalmente ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
Infecções Fúngicas e Criptococose	13
Fatores de Virulência e a Cápsula Polissacarídica de <i>C. neoformans</i>	19
Receptores da Imunidade Inata e Interações com o <i>C. neoformans</i>	22
Inflamassoma e seus Receptores	27
O Papel do Inflamassoma NLRP3 em Infecções Fúngicas	31
OBJETIVOS	34
Geral.....	34
Específicos	34
METODOLOGIA.....	35
Animais	35
<i>Cryptococcus neoformans</i>	35
Obtenção dos Macrófagos.....	35
Obtenção do Meio Condicionado Bruto.....	37
Fracionamento do Meio Condicionado	38
Ensaio de Interação com Meio Condicionado	39
Detecção da Internalização de GXM por Microscopia Confocal.....	40
Dosagem de IL-1 β , pró- IL-1 β e TNF- α por ELISA.....	41
Dosagem de LDH.....	41
Detecção de Caspase-1 Ativa por Citometria de Fluxo	42
Ensaio de Fagocitose e Morte	44
Ensaio de Resistência ao pH	45
Ensaio de Atividade Fungicida com Transwell.....	46
Análise Estatística	47
RESULTADOS	48
Componentes capsulares secretados pelo <i>C. neoformans</i> são capazes de inibir a produção de IL-1 β em macrófagos primados, porém não a de TNF- α	48
Moléculas responsáveis pela inibição da produção de IL-1 β são pequenas e polares	49

Isolamento e purificação da molécula responsável pela inibição.....	51
GXM purificada bruta não apresenta mesmo padrão de inibição da produção de IL-1 β que CM35	53
Moléculas de GXM presentes no CM35 são internalizadas por macrófagos.....	54
Componentes capsulares impedem morte celular de macrófagos ativados por nigericina	56
Componentes capsulares potencializam ativação de caspase-1 por nigericina	57
Níveis de Pró- IL-1 β intracelular se encontram aumentados em BMMs em interação com CM35 e CMCAP.....	58
Ação fungicida de macrófagos é prejudicada perante a presença de componentes capsulares.....	60
Secreção de componentes capsulares auxilia o <i>C. neoformans</i> a equilibrar pH do meio em que se encontra.....	61
Microambiente derivado de ativação do inflamassoma auxilia macrófagos não estimulados no combate à infecção por <i>C. neoformans</i>	62
DISCUSSÃO	65
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Levedura de <i>C. neoformans</i> corada com tinta-nanquim, com ênfase na cápsula exterior a parede celular fúngica.....	14
Figura 2 – Estimativa de casos anuais de meningite criptocócica em pacientes com HIV	17
Figura 3 – Número de mortes na região da África subsaariana de acordo com a causa, com ênfase nos casos de meningite criptocócica em indivíduos com HIV	18
Figura 4: Esquema simplificado da via de sinalização promovida pela ativação de TLRs e CLRs, finalizando na ativação de NF-κB	27
Figura 5: Esquema simplificado da ativação e ação do inflamassoma NLRP3	30
Tabela 1: Fungos estudados quanto à ativação do inflamassoma, com ênfase nas condições para tal ativação.	32
Figura 6: Esquema demonstrativo de poço de cultura portando o aparato “Transwell”, com ênfase na cultura de dois tipos celulares fornecida pela plataforma, com a manutenção do mesmo meio entre ambas	46
Figura 7 – Componentes capsulares secretados pelo <i>C. neoformans</i> são capazes de inibir a produção de IL-1β em macrófagos primados, porém não a de TNF-α.	48
Figura 8 – Moléculas responsáveis pela inibição do inflamassoma são pequenas.....	49
Figura 9 – Moléculas responsáveis pela inibição do inflamassoma são polares.	50
Figura 10 – Isolamento e purificação da molécula responsável pela inibição.	52
Figura 11 – GXM purificada bruta não apresenta mesmo padrão de inibição da produção de IL-1β que CM35	54
Figura 12 – Moléculas de GXM presentes no CM35 são internalizadas por macrófagos.	55
Figura 13 – Componentes capsulares impedem morte celular de macrófagos ativados por nigericina.	56
Figura 14 – Componentes capsulares potencializam ativação de caspase-1 por nigericina.	58
Figura 15 – Níveis de Pró- IL-1β intracelular se encontram aumentados em BMMs em interação com CM35 e CMCAP	59
Figura 16 - Ação fungicida de macrófagos é prejudicada perante a presença de componentes capsulares.	61
Figura 17 - Secreção de componentes capsulares auxilia o <i>C. neoformans</i> a equilibrar pH do meio em que se encontra	62
Figura 18 - Microambiente derivado de ativação do inflamassoma auxilia macrófagos não estimulados no combate à infecção por <i>C. neoformans</i>.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASC	Proteína do tipo SPECK associada a apoptose que contém CARD
ATP	Adenosina Trifosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BMM	Macrófagos Derivados de Medula Óssea
CFU	Unidade Formadora de Colônias
CLRs	Receptores de Tipo Lecitina
CM35	Meio Condicionado Derivado de B3501
CMCAP	Meio Condicionado Derivado de CAP67
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Dano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de ligação imunoenzimático
FAM	Molécula de Carboxifluoresceína
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FLICA	Inibidor fluorescente de Caspase
GalXM	Galactoxilomanana
GM-CSF	Fator de Crescimento de Granulócitos e Macrófagos
GXM	Glucoronoxilomanana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMGB	Proteínas de Grupo de Alta Mobilidade
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

HSP	Proteína de Choque Térmico
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INOS	Óxido Nítrico Sintase
IPAF	Fator Ativador da Protease ICE
kDa	kilodalton
LCCM	Meio Condicionado Célula L
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeos
M-CSF	Fator de Crescimento de Macrófagos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitros
MM	Meio Mínimo
mM	Milimolar
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B
NLRC	Proteínas do Tipo NOD que contêm CARD
NLRP	Receptor do Tipo NOD que contêm Pirina
NLRs	Receptores de Tipo NOD
nm	Nanômetros
NOD	Domínio de Oligomerização de Nucleotídeos
°C	Graus Celsius
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão

PYD	Domínio contendo Pirina
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Reativos de Oxigênio
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro Fetal Bovino
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Syk	Tirosina-quinase Esplênica
Th	Linfócitos T Auxiliares
TLR	Receptor do Tipo <i>toll</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TWEEN	Polietileno Glicol Monoestearato de Sorbitano
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho
xg	Força Centrífuga Relativa
YVAD	Tirosina, Valina, Alanina e Aspartato

RESUMO

O *Cryptococcus neoformans* é um fungo patogênico humano que afeta majoritariamente indivíduos imunossuprimidos. Ele é o agente causador da meningite criptocócica e tem como principal fator de virulência uma cápsula polissacarídica que recobre sua parede celular. Os componentes desta cápsula estão envolvidos em diversos mecanismos de escape e de supressão da resposta imune desenvolvidos pelo fungo, o que leva a uma resposta não adequada da imunidade inata frente à infecção com consequente disseminação do patógeno. Dentre estes componentes, a glucoronoxilomanana (GXM) se destaca devido à grande variedade de modulações que a mesma é capaz de exercer em diversos tipos celulares.

Neste trabalho, demonstramos uma nova interação entre estes componentes capsulares secretados e macrófagos: a inibição da secreção de IL-1 β e da piroptose em macrófagos previamente ativadas. Primeiramente verificamos que estes componentes possuíam a capacidade de inibir a produção de IL-1 β , sem interferir na ativação fornecida pelo primeiro sinal – necessária para a produção da dada citocina. Caracterizamos parcialmente a molécula responsável por esta inibição, chegando a uma molécula pequena (menor que 1kDa), resistente ao calor (121 °C) e polar. Também verificamos que a piroptose dos macrófagos estimulados era prevenida por estes componentes capsulares, confirmando a interferência na via do inflamassoma destas células. Posteriormente realizamos ensaios para definir o mecanismo de ação pelo qual esta interferência estava ocorrendo. Verificamos que existiam depósitos da citocina intracelular pró-IL-1 β e também que a enzima caspase-1 estava ativada nos macrófagos em contato com os componentes capsulares do *C. neoformans*. Por último, realizamos ensaios de interação entre os macrófagos e leveduras de *C. neoformans*, observando uma replicação intracelular exacerbada do fungo nas células tratadas com os componentes capsulares. Estes resultados demonstram a presença de uma molécula com caráter anti-inflamatório, acrescentando mais um mecanismo de modulação ao já extenso arsenal de fatores de virulência expressos pelo *C. neoformans*.

Palavras chave: *C. neoformans*, componentes capsulares, inflamassoma, piroptose

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is a human pathogenic fungus that affects mainly immunocompromised individuals. It is the causative agent of the cryptococcal meningitis and its major virulence factor is a polysaccharide capsule that covers its cell wall. The components of this capsule are involved in various mechanisms of evasion and suppression of the immune response developed by the fungus, which leads to an inadequate answer of the innate immunity to the infection and consequent dissemination of the pathogen. Among these components, the glucuronoxylomannan (GXM) stands out due to the great variety of modulations that it is able to perform in several cell types.

In this study, we demonstrated a novel interaction between these capsular components secreted by the fungus and macrophages: the inhibition of IL-1 β secretion and pyroptosis in previously stimulated macrophages. First, we verified that these components had the ability to inhibit the production of IL-1 β without interfering in the activation led by the first signal – necessary for the production of this given cytokine. Then we partially characterized the molecule responsible for this inhibition, discovering that it was a small molecule (smaller than 1kDa), heat resistant (121 °C) and polar. We also found that the pyroptosis was being prevented in the stimulated macrophages, confirming the interference in the inflammasome pathway of these cells. Later we performed tests to define the mechanism of action by which these interferences were occurring. We found deposits of the intracellular cytokine pro-IL-1 β and also activated caspase-1 enzyme in macrophages that were in contact with *C. neoformans* capsular components. Ultimately, we performed interaction tests between macrophages and yeast cells of *C. neoformans*, observing an exacerbated intracellular growth of the fungus inside the cells treated with the capsular components. These results demonstrated the presence of a molecule with anti-inflammatory character, adding another modulatory mechanism into the already extensive arsenal of virulence factors expressed by the *C. neoformans*.

Key words: *C. neoformans*, capsular components, inflammasome, pyroptosis

INTRODUÇÃO

Infecções Fúngicas e Criptococose

Os fungos estão associados a uma ampla variedade de processos patológicos, desde pequenas lesões na pele e no pulmão até lesões extensas em diversos órgãos do hospedeiro. Este caráter sistêmico das infecções fúngicas geralmente está associado a hospedeiros que apresentam imunossupressão, pelo fato da maioria dos fungos não serem parasitas primários e sim, patógenos oportunistas. Nas últimas décadas foi possível verificar um aumento na prevalência destas micoses sistêmicas, principalmente pelo aumento no número de hospedeiros imunossuprimidos, por diversos fatores como: infecção por HIV, tratamento contra rejeição de transplante de órgãos e tratamento contra câncer, gerando um aumento no interesse e nos estudos dedicados as mesmas. Além disso, está previsto que o aquecimento global trará uma maior incidência de infecções fúngicas (GARCIA-SOLACHE; CASADEVALL, 2010).

Por afetar principalmente indivíduos imunocomprometidos, as infecções fúngicas sistêmicas apresentam importância dentro do ambiente hospitalar. Os principais patógenos fúngicos localizados nestas infecções nosocomiais são espécies do gênero *Candida* e *Aspergillus*, seguidos de outros gêneros relevantes como *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Histoplasma*, *Coccidioides* e *Paracoccidioides* (BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014; PFALLER; DIEKEMA, 2010). Esses patógenos apresentam-se atualmente como grande preocupação nos centros hospitalares, sendo o gênero *Candida*, em hospitais nos Estados Unidos, o quarto patógeno mais encontrado em septicemias e representando entre trinta a cinquenta por cento de mortalidade, dependendo da apresentação clínica (PFALLER; DIEKEMA, 2010). O gênero *Aspergillus*, por sua vez, apresenta entre cinquenta a noventa por cento de mortalidade, dependendo do fator que levou o paciente à imunossupressão (LIN et. al., 2001). Outro fator preocupante é que, devido à extrapolação de tratamentos imunossupressores e a possível internação de crianças com doenças imunossupressoras, as infecções sistêmicas fúngicas também se tornaram uma constante em centros pediátricos. Neste âmbito, o gênero *Candida* aparece entre os principais patógenos mais encontrados em septicemias, apresentando taxas de mortalidade de cerca de trinta por cento (BRISAUD et. al., 2012).

O *Cryptococcus neoformans*, agente da criptococose e da meningite criptocócica, é um basidiomiceto, apresentando-se habitualmente na forma de basídio e basidiósporos em seu habitat natural. Apesar disso, a forma relacionada com a patologia e a mais fácil de ser cultivada é a forma de levedura unicelular (Figura 1). A principal característica desta levedura é a presença de uma cápsula mucopolissacarídica (LIN, 2009). Diferenças nos epítomos apresentados nesta cápsula subdividem a espécie em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) (NAKAMURA et. al., 2000). Os sorotipos D e a hibridização AD são denominados de *C. neoformans var neoformans*. O sorotipo A, por diferenças genótípicas e por sua elevada importância clínica, é atualmente denominado *C. neoformans var grubii*. Os sorotipos B e C, que recentemente foram classificados como uma diferente espécie e apresentam manifestações clínicas distintas dos outros sorotipos, são denominados *C. gattii* (LIN; HEITMAN, 2006).

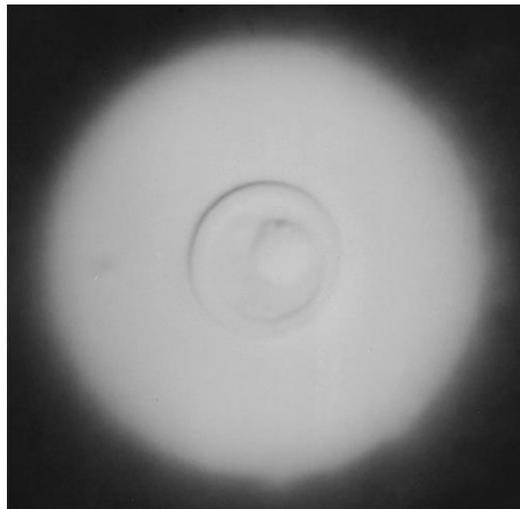


Figura 1 – Levedura de *C. neoformans* corada com tinta-nanquim, com ênfase na cápsula exterior a parede celular fúngica. Retirado de (MITCHELL; PERFECT, 1995)

Os sorotipos A e D se apresentam distribuídos mundialmente, o sorotipo A sendo encontrado amplamente distribuído por todo o mundo e o sorotipo D sendo encontrado principalmente em zonas temperadas (MARTINEZ et. al., 2001). Já os sorotipos B e C se apresentam restritos nas zonas tropicais e subtropicais (LIN; HEITMAN, 2006). Estas diferenças geográficas podem ser explicadas se levarmos em consideração os habitats ecológicos predominantes de cada espécie. Os sorotipos A e D são encontrados em solo, troncos de árvores, vegetais em processo de apodrecimento e, principalmente, em excreta de aves, predominantemente em pombos. Este tropismo por esta espécie de ave mundialmente distribuída pode explicar a distribuição mundial destes sorotipos. Em contrapartida os

sorotipos B e C são encontrados predominantemente em folhas de eucalipto, o que explicaria sua restrição geográfica. (SORRELL; ELLIS, 1997; LIN, 2009).

A criptococose é caracterizada como uma micose sistêmica que pode ser contraída tanto por indivíduos imunocomprometidos quanto indivíduos hígidos, dependendo de qual sorotipo seja o causador da mesma. Neste âmbito os sorotipos A e D se apresentam como patógenos oportunistas, enquanto os sorotipos B e C se apresentam como patógenos primários (IDNURM et al., 2005). Apesar de serem patógenos primários, a restrição geográfica do *C. gattii* faz com que ele seja responsável por apenas um por cento dos casos de criptococose registrados. Ainda não se sabe por qual motivo estes sorotipos geralmente não são encontrados em infecções de indivíduos imunossuprimidos. Em contraste, o *C. neoformans var grubii* é responsável por noventa e cinco por cento dos casos de criptococose registrados, fato parcialmente explicado devido sua ampla distribuição geográfica e também por sua maior virulência quando comparado ao *C. neoformans var neoformans* (LIN, 2009).

A infecção se dá a partir da inalação dos esporos, micélios ou ainda leveduras dessecadas do fungo (LIN; HEITMAN, 2006). As células fúngicas, devido ao seu pequeno tamanho, conseguem atingir os alvéolos. As formas infectantes do fungo não possuem grande resistência às barreiras e defesas imunológicas do organismo, logo se acredita que é necessária uma rápida transformação para levedura, que é uma forma mais resistente, para uma colonização e penetração efetiva do fungo no sistema respiratório (LIN, 2009; SABIIT; MAY, 2012). Nos tecidos pulmonares ocorre a primeira interação entre as células fúngicas e o sistema imune do hospedeiro. Esta interação pode resultar em: (1) eliminação do fungo, gerando a cura do hospedeiro; (2) latência do crescimento, resultando em infecção assintomática que pode ser reativada em caso de comprometimento da imunidade do hospedeiro; (3) restrição temporária do fungo nos pulmões, gerando infecção sintomática seguida de disseminação sistêmica (SABIIT; MAY, 2012). O desfecho da doença então depende de uma série de características que envolvem a capacidade imune do hospedeiro e os fatores de virulência do patógeno, sendo a progressão da infecção pulmonar e subsequente disseminação preferencialmente observada em indivíduos imunossuprimidos, em especial entre aqueles que portam o vírus do HIV (VILCHEZ; FUNG; KUSNE, 2002).

O *C. neoformans* produz enzimas líticas que promovem a degradação da membrana celular nas células do hospedeiro. Estas enzimas auxiliam na disseminação do fungo do tecido pulmonar para a corrente sanguínea (SABIIT; MAY, 2012). Na corrente sanguínea, já

possuindo a capacidade de se disseminar para vários tecidos do hospedeiro, o *C. neoformans* pode infectar praticamente qualquer região do corpo humano, já tendo sido localizado em: adrenais, coração, linfonodos, articulações, ossos, rins, trato gastrointestinal, cavidade ocular e próstata (MITCHELL; PERFECT, 1995; LIN; HEITMAN, 2006). Porém na grande maioria dos casos, a levedura apresenta tropismo pelo sistema nervoso central. A causa para este tropismo permanece desconhecida, porém existem possíveis explicações para este fenômeno, como por exemplo: (1) a presença de substratos que favoreçam o crescimento do fungo; (2) o fornecimento de um refúgio para o fungo conseguir evadir da resposta imune do hospedeiro; (3) a presença de receptores específicos que atraiam mais fortemente o fungo, quando comparado com outros órgãos (LIN; HEITMAN, 2006). Outro fator desconhecido até o momento é sobre o mecanismo utilizado pelo fungo para penetrar a barreira hematoencefálica. Três possíveis mecanismos estão entre as hipóteses mais discutidas: (1) migração paracelular, por meio de dano provocado pela secreção de enzimas; (2) migração transcelular, por meio da adesão a células endoteliais microvasculares; (3) modelo cavalo-de-tróia, por meio da migração de um macrófago infectado pelo fungo (CASADEVALL, 2010; KRONSTAD et. al., 2011; SABIIT; MAY, 2012). Este tropismo e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica elucidam o fato de o *C. neoformans* ser considerado um dos principais agentes causadores de meningite e o principal da meningite fúngica (PARK et. al., 2009).

Neste contexto, o *Cryptococcus neoformans* apresenta-se como um dos patógenos mais importantes dentro das infecções fúngicas sistêmicas. Assim como *Candida* e *Aspergillus*, o *C. neoformans* é um patógeno secundário ou oportunista, usualmente não promovendo doença e quadro sintomatológico em pacientes imunocompetentes. Desta maneira, sua relevância dentro da área clínica era restrita, não sendo registrados numerosos casos e nem taxa de mortalidade significativa decorrente de infecções, salvo em pacientes acometidos por câncer. Este quadro mudou após o surto nos casos de AIDS na década de 80, colocando o *C. neoformans* no quarto lugar das doenças infecciosas que acometem indivíduos portadores do vírus HIV, sendo o patógeno fúngico que apresenta maior taxa de mortalidade entre estes pacientes (MITCHELL; PERFECT, 1995; ARMSTRONG-JAMES; MEINTJES; BROWN, 2014).

Apesar de não ser a doença fúngica com a maior prevalência, a criptococose se destaca por ser extremamente agressiva, difícil de ser combatida e com altos índices de mortalidade, graças à meningite criptocócica. A forte correlação entre a imunossupressão provocada pela infecção pelo HIV e altas taxas de infecção e morte pelo *C. neoformans* foi colocada em

bastante evidência ao longo dos anos. Estima-se que anualmente um milhão de novos casos de meningite criptocócica surgem em pacientes infectados por HIV (BROWN et. al., 2014). Esta severidade da infecção é importante em regiões onde existe um número maior de pacientes HIV positivos, assim como um menor acesso ao tratamento e acompanhamento desta doença (PARK et. al., 2009). Um exemplo claro disso é a distribuição dos aproximadamente um milhão de casos anuais pelos continentes. Apesar de sua distribuição geográfica pancontinental, setenta e cinco por cento das infecções por *C. neoformans* acontecem na região da África subsaariana, com a região sudeste da Ásia em segundo lugar, com quase quinze por cento de incidência de infecção (Figura 2).

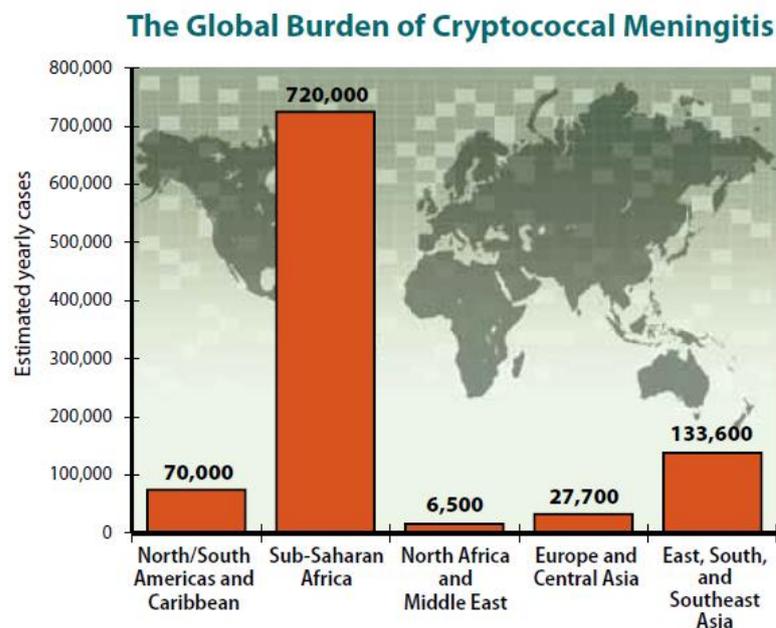


Figura 2 – Estimativa de casos anuais de meningite criptocócica em pacientes com HIV. Retirado de (CDC, em <http://www.cdc.gov/fungal/pdf/at-a-glance-508c.pdf>)

O impacto da meningite criptocócica não se contém apenas à taxa de infecção, mas principalmente a taxa de mortalidade apresentada por estes pacientes infectados. Em um contexto global, a taxa de mortalidade pela infecção aproxima-se dos trinta por cento (JARVIS; HARRISON, 2007), porém na região da África subsaariana, esta taxa alcança incríveis setenta e três por cento de mortalidade (Figura 3), ultrapassando doenças conhecidas por sua alta letalidade, como exemplo a tuberculose, e se estabelecendo como a quarta principal causa de morte de pacientes com HIV nesta região (PARK et. al., 2009).

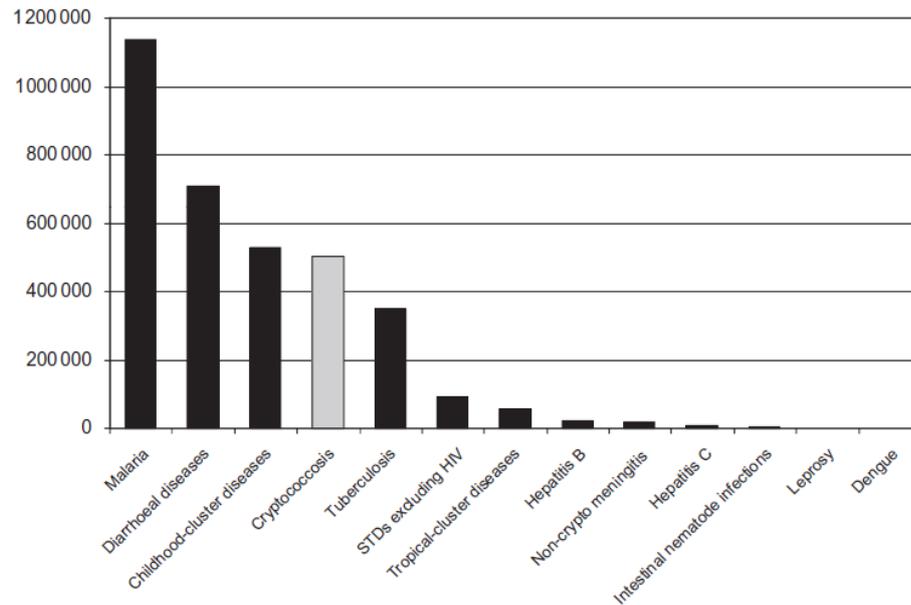


Figura 3 – Número de mortes na região da África subsaariana de acordo com a causa, com ênfase nos casos de meningite criptocócica em indivíduos com HIV. Retirado de (PARK et. al., 2009)

Se por um lado a meningite criptocócica é extremamente fatal em pacientes com HIV com pouco acesso a terapia antirretroviral, nos países desenvolvidos as evoluções nesta terapia e principalmente uma série de cuidados no manejo destes pacientes estão sendo essenciais para uma redução nos casos e na taxa de mortalidade desta infecção, principalmente a partir do final da década de noventa (PYRGOS et. al., 2013). Fatores como agulhas espinais descartáveis, terapias antirretrovirais mais efetivas e uma vigilância global destes pacientes vêm ajudando no controle e combate da meningite criptocócica (ARMSTRONG-JAMES; MEINTJES; BROWN, 2014). Apesar das melhorias no manejo da infecção por HIV, isso não é o suficiente para controlar a infecção por *C. neoformans*. A terapia antifúngica ainda está longe de ser a ideal, devido a sua alta toxicidade (JARVIS; HARRISON, 2007; LIN, 2009). Além disso, existem diversos outros fatores além do HIV que provocam imunossupressão e que podem levar o indivíduo infectado a desenvolver a meningite criptocócica. Em estudo realizado nos Estados Unidos entre 1996 e 2010 (PAPPAS, 2013), aproximadamente dois terços dos pacientes identificados com criptococose não eram HIV positivos (vinte e oito por cento eram pacientes transplantados e trinta e seis por cento pacientes normais ou com algum fator imunossupressor, como doenças de base). A taxa de mortalidade entre os grupos não apresentou variações, podendo-se inferir que a mesma porcentagem de pacientes HIV positivos, transplantados e com outros fatores de imunossupressão morreram ao longo de um ano (cerca de trinta por cento). É conhecido que indivíduos transplantados e com criptococose apresentam baixa taxa de mortalidade, porém neste estudo estes pacientes também apresentavam várias doenças de base, como diabetes e

insuficiência renal. A maior atenção se deve ao terceiro grupo, que apresentou grande taxa de mortalidade mesmo não contendo pacientes infectados por HIV e que apresentou quase um terço de pacientes com criptococose sem nenhum fator de imunossupressão aparente. No Brasil, durante o mesmo período, esta tendência também foi verificada. Em um estudo realizado em Uberlândia entre 1998 e 2003 (MOREIRA et. al., 2006), apesar de somente vinte por cento dos pacientes estudados com criptococose não serem HIV positivos, cerca de cinquenta por cento destes foram a óbito, contra setenta e cinco por cento dos pacientes estudados que eram HIV positivos.

No Brasil os dados epidemiológicos referentes à criptococose se assemelham aos encontrados no resto do mundo. O *C. neoformans* é um dos principais agentes infecciosos em pacientes com HIV, podendo chegar a ser responsável por até cinquenta por cento destas infecções. Foi observada também uma redução nos casos de criptococose associados com HIV (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Em relação à distribuição geográfica, pode-se inferir que é possível isolar *C. neoformans* de todas as regiões brasileiras, com ênfase na região sudeste, devido ao maior número de estudos realizados nestes estados (QUEIROZ et. al., 2008).

Fatores de Virulência e a Cápsula Polissacarídica de *C. neoformans*

A capacidade de um microrganismo sobreviver dentro de um hospedeiro susceptível, coloniza-lo, proliferar e promover uma patologia a partir de um pequeno número de células é denominada virulência. Fatores de virulência são considerados certos componentes, mecanismos ou ações que permitem que o patógeno alcance a capacidade supracitada (CROSS, 2008). Existem diversos argumentos contraditórios acerca do que se enquadraria ou não dentro destes fatores. Desde a concretização da teoria do germe e a percepção de que existiam microrganismos que provocavam ou não a patologia no hospedeiro (patógeno contra comensal), tentou se achar quais eram as características que separavam estes dois tipos de microrganismos. Muitos destes achados foram contraditos, principalmente quando se descobriu o fato de que microrganismos comensais também podiam promover patologias, porém estes estudos foram essenciais para pavimentar a base de conhecimento atual e direcionar novos achados. Atualmente o que se busca é um entendimento mais aprofundado destes fatores de virulência, em um contexto molecular, genético e de interação com o hospedeiro, visando alvos específicos para a terapia e prevenção de infecções (CASADEVALL; PIROFSKI, 2009; ALLEN et. al., 2014). Existem diversos mecanismos e

componentes que podem ser classificados como fatores de virulência, merecendo ser citados: toxinas, adesinas, motilidade, cápsulas, pigmentos (melanina), mecanismos que favorecem a apoptose das células do hospedeiro, formação de biofilme, possibilidade de crescimento intracelular, habilidade de promover “*quorum sensing*”, entre outros (CASADEVALL; PIROFSKI, 2009). A resistência aos antibióticos já foi postulada como um fator de virulência, porém hoje é tratada como uma característica a parte, que inclusive tem relações intrínsecas com diversos fatores de virulência (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Os fungos apresentam diversos dos fatores de virulência citados. Entre eles se destacam aqueles que permitem que o patógeno fuja do reconhecimento e respostas do sistema imune. Um dos mais eficazes é a utilização de moléculas que não são reconhecidas pelos receptores de células imunes inatas para a formação ou proteção da parede celular. Um exemplo é a expressão de α -glucana na parede celular da levedura de *Histoplasma capsulatum* (RAPPEYE; EISSENBERG; GOLDMAN, 2007), que recobre outro polímero de glucose, β -glucana, que é altamente imunoestimulatório. Esta fuga também pode ocorrer a partir da transformação do fungo em uma forma não reconhecida, como é o exemplo da forma de hifa da *C. albicans*, que não expõem β -glucanas na porção externa de sua parede. Outros mecanismos de evasão incluem imunomodulação do sistema complemento por *A. fumigatus* e *C. albicans* (a partir do recrutamento de moléculas regulatórias do hospedeiro ou moléculas fúngicas que degradam o complemento) ou do balanço inflamatório sinalizado pelo sistema imune (a partir da ativação de TLR2 por *C. albicans*, estimulando uma resposta anti-inflamatória) (NETEA et al., 2008; BROWN, 2011). Por último os fungos podem induzir sua fagocitose por células não especializadas na eliminação dos mesmos, como células epiteliais. Esta fagocitose induzida ajuda fungos como *C. albicans*, e *A. fumigatus* a escaparem de fagócitos (ROMANI, 2011; BROWN, 2011).

O *C. neoformans* apresenta vários dos fatores de virulência já comentados, o que o torna um patógeno especialista em se aproveitar das brechas fornecidas por um sistema imune comprometido. Entre esses fatores podemos citar: (1) Crescimento em 37°C; (2) Secreção de enzimas como fosfolipase B (auxilia na desestabilização da membrana celular do hospedeiro), urease (auxilia na disseminação para o sistema nervoso central) e lacase (media a produção de melanina); (3) Presença de melanina em sua parede celular quando dentro do hospedeiro; (4) Presença de uma cápsula mucopolissacarídica, que geralmente se apresenta anexada à parede celular do fungo (LIN; HEITMAN, 2006; KOZUBOWSKI; LEE; HEITMAN, 2009; KRONSTAD et. al., 2011). Graças a esses fatores, o fungo consegue diversas vantagens

frente à resposta imune, como: (1) Resistência contra estresse oxidativo; (2) Evasão do reconhecimento imune e fagocitose; (3) Crescimento do fungo dentro de macrófagos do hospedeiro; (4) “Extrusão” ou “vomocitose”, aonde o fungo é expulso das células sem ativar uma resposta inflamatória (BROWN, 2011; KRONSTAD et. al., 2011; ROMANI, 2011).

A cápsula polissacarídica do *C. neoformans*, um dos seus principais e mais singulares fatores de virulência (CHANG; KWON-CHUNG, 1994; MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2006), é composta essencialmente pelos polissacarídeos glucoronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), além de uma pequena fração de manoproteínas. GXM compõem cerca de noventa por cento da cápsula, possuindo um tamanho variado e bastante amplo (usualmente entre 1700 a 7000 kDa). GalXM compõem cerca de oito por cento da cápsula e possui um tamanho diminuto quando comparada ao GXM (entre 100 e 1700 kDa). Mesmo representando uma porcentagem menor na constituição da cápsula, GalXM é relativamente mais abundante do que GXM, cerca de duas a três moléculas de GalXM por uma de GXM (fato explicado devido ao tamanho bem menor de uma em relação à outra) (MCFADDEN; DE JESUS; CASADEVALL, 2006; ZARAGOZA et. al., 2009). As manoproteínas compreendem os dois por cento restantes da composição da cápsula. Existem poucos estudos acerca da importância destas manoproteínas na estrutura capsular, mas já é conhecido o fato que essas moléculas são reconhecidas pelo sistema imune, ativando-o (PIETRELLA et. al., 2005; ZARAGOZA et. al., 2009; RAMIREZ-ORTIZ; MEANS, 2012). Apesar do reconhecimento fornecido pelas manoproteínas, a cápsula do *C. neoformans* é notoriamente conhecida pela sua capacidade de inibição da fagocitose desempenhada por macrófagos residentes, que são a primeira linha de defesa encontrada pelo fungo (KOZEL; GOTSCHLICH, 1982). Na verdade, a cápsula se mostra como a principal forma de defesa do fungo contra o hospedeiro, sendo que o primeiro responde dinamicamente e aumenta a síntese de sua cápsula frente a situações impostas pelo segundo, como: (1) Baixa quantidade de ferro; (2) Acidificação do pH no meio; (3) Baixa quantidade de glicose; (4) Hipóxia (FELDMESSER; KRESS; CASADEVALL, 2001; O’MEARA; ALSPAUGH, 2012). Relatos indicam que este aumento no tamanho da cápsula é importante para a sobrevivência do *C. neoformans* dentro das células do hospedeiro, graças à capacidade adquirida de resistir às espécies reativas de oxigênio geradas pela resposta imune, como exemplo (ZARAGOZA et. al., 2008).

Porém não é somente para ficar na defensiva que o *C. neoformans* sintetiza sua cápsula. Já são bem descritas as ações que a GXM exerce sobre as células e moléculas do

sistema imune, inibindo ou abortando totalmente o pleno funcionamento das mesmas. Estas intervenções podem ocorrer em vários níveis de complexidade e interferir em funções distintas, tanto na imunidade inata quanto adaptativa (MONARI; BISTONI; VECCHIARELLI, 2006; VECCHIARELLI et. al., 2013). Podemos citar como exemplos: (1) Interferir na deposição de complemento C3 na superfície do fungo, a partir da modificação do volume e compactação da cápsula, chegando até a internalizar esta molécula em suas camadas, impedindo assim sua função opsonizadora (ZARAGOZA; TABORDA; CASADEVALL, 2003); (2) Inibir a adesão de neutrófilos ao epitélio ativado, interferindo nas integrinas dos neutrófilos quanto nas selectinas do epitélio (ELLERBROEK et. al., 2002, 2004); (3) Reduzir a produção de quimiocinas por neutrófilos (MONARI et. al., 2002); (4) Reduzir a proliferação e atividade de linfócitos T, tanto na apresentação de antígenos por células dendríticas quanto na presença de mitógenos diretos, por meio de mecanismos que não incluem a morte celular destes linfócitos (MARIANO-ANDRADE et. al., 2003; YAUCH; LAM; LEVITZ, 2006); (5) Reduzir diretamente a ativação e produção de moléculas co-estimulatórias em macrófagos e células dendríticas, especialmente MHC de classe II (VECCHIARELLI et. al., 2003; MONARI et. al., 2005a); (6) Promover a apoptose de linfócitos T, a partir da ativação da via Fas em macrófagos (MONARI et. al., 2005b). Essas intervenções servem para elucidar fatos como a redução na migração celular leucocitária (LIPOVSKY et. al., 1998) e a diminuição das respostas pró-inflamatórias durante a infecção (VECCHIARELLI et. al., 1996), novamente demonstrando como a cápsula e seus componentes são o principal fator de virulência do *C. neoformans*.

Receptores da Imunidade Inata e Interações com o *C. neoformans*

Como já demonstrado, os fatores de virulência desempenham funções essenciais no estabelecimento da doença no hospedeiro, porém não são a única variável importante no curso de uma infecção. O desenvolvimento de resposta imunológica competente indica também qual será o prognóstico que o hospedeiro apresentará quando em contato com o *C. neoformans*. Neste aspecto a imunidade inata apresenta importante função, por modular a resposta adaptativa e ser a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o patógeno. O sistema imune inato é composto basicamente por células epiteliais, células fagocitárias e proteínas microbidas, sendo que estes atuam por três mecanismos distintos: barreira física contra a entrada de microrganismos; proteção de fagócitos residentes no subepitélio e circulantes; proteínas microbidas na circulação sanguínea (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI,

2012). Dentro de um processo infeccioso promovido pelo *C. neoformans*, as três principais células da resposta imune inata possuem papéis distintos. Células dendríticas funcionam como uma das primeiras linhas de defesa localizadas no pulmão do hospedeiro, agindo no reconhecimento e internalização do fungo. Na criptococose estas células são responsáveis pela comunicação entre a resposta imune inata e adaptativa, a partir da apresentação de antígenos para a ativação de linfócitos T específicos contra o *C. neoformans* (WOZNIAK; VYAS; LEVITZ, 2006; VOELZ; MAY, 2010). Os neutrófilos funcionam como um ataque direto contra o fungo, produzindo espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos. Na criptococose estas células não são consideradas essenciais na ação microbicida contra o fungo, devido ao seu pequeno número localizado no tecido pulmonar. Macrófagos, assim como as células dendríticas, funcionam como uma primeira linha de defesa localizada no pulmão, reconhecendo e fagocitando o fungo (VOELZ; MAY, 2010).

Atualmente os macrófagos vêm sendo considerados o tipo celular mais importante para o desfecho da criptococose, devido à interação peculiar que o fungo tem com eles. Primeiramente, foi graças ao estudo entres essas interações que se descobriu que o *C. neoformans* agia como um patógeno intracelular facultativo (FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001). A partir desta descoberta, várias outras interações, algumas delas únicas, foram observadas entre o fungo fagocitado e o macrófago, merecendo citações: (1) Permissão da fusão do fagossomo com o lisossomo e de sua acidificação; (2) Capacidade de permanência e proliferação no fagolisossomo ativado; (3) Expulsão ou “extrusão” do interior do macrófago sem a lise do mesmo, a partir de mecanismos independentes do citoesqueleto de actina; (4) Transferência do fungo do interior de um macrófago para o interior de outro; (5) Disseminação sistêmica a partir da permanência do fungo no interior do macrófago (VOELZ; MAY, 2010). É possível perceber que todas as interações supracitadas apresentam uma vantagem para o fungo frente à resposta do hospedeiro, que resiste à função dos macrófagos de internalizar, conter e matar patógenos durante o primeiro contato na infecção, tornando o interior desta célula um local propício para seu crescimento e disseminação. Neste sentido, estudos demonstraram que a depleção de macrófagos diminuía a disseminação do fungo, sendo benéfica para o hospedeiro durante a criptococose (KECHICHIAN; SHEA; DEL POETA, 2007; CHARLIER et. al., 2009), enquanto outros estudos demonstraram que diferenças na atividade dos macrófagos (ação efetora, permissividade ao crescimento intracelular e capacidade fagocítica) refletiam no prognóstico do hospedeiro (SHAO et. al., 2005; ZARAGOZA et. al., 2007). Desta maneira, todos esses estudos corroboram a grande

importância que a interação entre o *C. neoformans* e os macrófagos tem no desfecho da criptococose.

A ativação da resposta fagocítica e microbicida dos macrófagos é na maioria das vezes estimulada pelo reconhecimento de Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs). PAMPs são estruturas moleculares exclusivas e geralmente essenciais para os microrganismos. A habilidade de reconhecimento destes PAMPs pela imunidade inata é inerente ao organismo, ou seja, ele consegue expressar receptores para os PAMPs em qualquer ciclo de sua vida. O fato de estes PAMPs serem essenciais para a sobrevivência dos microrganismos limita as tentativas de evasão do mesmo, visto que estas estruturas devem estar sempre presentes e, na grande maioria das vezes, inalteradas dentro da estrutura microbiana. Em relação aos fungos, os principais PAMPs reconhecidos são estruturas de parede celular. Polissacarídeos (quitina, manana e glucanas) e proteínas sintetizados durante a formação da parede celular estão entre os PAMPs mais estudados em infecções fúngicas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011).

O reconhecimento dos PAMPs é realizado por Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), que são expressos em diversas células do sistema imune, principalmente em macrófagos e células dendríticas. Os PRRs são divididos em várias classes, porém todas apresentam certas especificidades, como o fato de reconhecerem seletivamente PAMPs e padrões moleculares associados a dano (DAMPs), bem como o fato de serem expressos a partir de genes constitutivos, ou seja, independem de fatores etários ou de memória imunológica. Essas diversas classes conferem aos PRRs a habilidade de reconhecerem moléculas de diferentes espécies de patógenos, tanto no meio intracelular quanto extracelular. Apesar de apresentarem certa seletividade, a especificidade dos PRRs é extremamente reduzida quando comparada a apresentada pelos receptores das células de resposta adaptativa (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Entre as famílias conhecidas de PRRs, a mais bem descrita é a dos receptores *Toll-like* (TLRs). Os TLRs foram primeiramente identificados em espécies de mosca do gênero *Drosophila*, onde desenvolviam um papel importante em seu desenvolvimento embrionário. Algum tempo depois se descobriu que este receptor desempenhava um papel antifúngico essencial, bem como outro receptor semelhante apresentava função antibacteriana. Estes foram os primeiros indícios do papel imunológico exercido por esta classe de PRR. Atualmente existem doze receptores identificados em mamíferos pertencentes à classe dos

TLRs, sendo que destes, dez são expressos em humanos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; BOWIE; O'NEILL, 2000). Por conta de sua ampla diversidade quanto às classes, os TLRs são capazes de reconhecer DAMPs e PAMPs de praticamente todos os tipos de patógenos como micobactérias, bactérias, fungos, vírus e parasitas (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Alguns TLRs já foram descritos como sendo capazes de reconhecer PAMPs presentes no *C. neoformans*, sendo eles os TLRs 2, 4 e 9. Os TLRs 2 e 4 estão presentes no reconhecimento de GXM, da cápsula polissacarídica, enquanto que o TLR9 apresenta-se importante no reconhecimento do DNA fúngico (CUNHA; ROMANI; CARVALHO, 2010). Apesar de promoverem o reconhecimento da célula fúngica, os TLRs apresentam na grande maioria dos estudos resultados negativos quanto à importância no combate à infecção.

Neste contexto, TLR2 apresentou resultados contraditórios, sendo visto primeiramente como importante no reconhecimento de *C. neoformans*. Nestes estudos os animais nocaute para TLR2 apresentaram uma mortalidade maior e uma produção diminuída de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos frente à infecção fúngica (YAUCH et. al., 2004; BIONDO et al., 2005). Porém outro estudo demonstrou que o nocaute de TLR2 em camundongos não alterava o perfil de citocinas produzidas e nem alterava a gravidade da infecção no pulmão, quando comparado a animais controle, creditando assim pouca importância no papel do TLR2 frente ao reconhecimento do fungo (NAKAMURA et al., 2006). Interessantemente todos os estudos acima também demonstraram que o TLR4 apresentava pouca importância no reconhecimento do *C. neoformans*, sendo que a deleção do receptor não gerava alterações no perfil de citocinas expressas por células dendríticas e por macrófagos, assim como não alterava a mortalidade do hospedeiro, corroborando com estudo anterior (SHOHAM et. al., 2001). O TLR9 é tido como responsável no balanço entre a resposta Th1 vs Th2, sendo visto como protetor diante a criptococose graças a uma polarização da resposta Th1, com aumento das citocinas IL12 e TNF, assim como aumento na produção de NO por macrófagos (NAKAMURA et. al., 2008; WANG et. al., 2011). Apesar da ativação da imunidade inata, o reconhecimento pelo TLR9 não se traduz em um combate efetivo contra o fungo durante o início da infecção, mas se mostra essencial para a montagem da resposta adaptativa. Esta resposta então leva a uma diminuição da carga fúngica pulmonar presente no hospedeiro durante a infecção tardia (ZHANG et. al., 2010).

Outra família importante de PRRs é a família dos receptores do tipo C-lectina (CLRs). Diversos receptores, com variadas estruturas e vias de sinalização, fazem parte desta família,

explicando o fato dela ser importante para o reconhecimento de basicamente todos os tipos de patógenos, especialmente fungos. Outra importância dos CLR's é a gama de variadas respostas que cada um destes receptores desencadeia quando ativado, o que ajuda em uma resposta diversificada do sistema imune inato (GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009). Entre os CLR's que são capazes de reconhecer componentes do *C. neoformans*, merecem ser citados os receptores dectina-1, dectina-2 e receptor de manose.

Dectina-1 é o único receptor descrito até o momento capaz de reconhecer β -glucana, que é o principal componente da parede celular fúngica. Apesar de sua enorme importância para o reconhecimento de diversos patógenos fúngicos, durante a criptococose a ausência deste receptor não trouxe nenhum agravamento na condição do hospedeiro (NAKAMURA et. al., 2007). Dectina-2 é um receptor capaz de reconhecer mananas, que estão presentes tanto na parede celular quanto na cápsula do *C. neoformans*, porém em pequenas quantidades. Dectina-2 foi o primeiro dos CLR's a ser associado com uma resposta predominantemente pró-inflamatória (TAYLOR et. al., 2005), e durante a criptococose este fato foi confirmado. Um estudo recente demonstrou que a deleção de dectina-2 durante a infecção pelo *C. neoformans in vitro* promove uma queda drástica na resposta pró-inflamatória, enquanto que *in vivo* promove um aumento na resposta anti-inflamatória (NAKAMURA et. al., 2014). Por último o receptor de manose é um receptor capaz de reconhecer manoproteínas, que são um dos principais constituintes da cápsula (MANSOUR; SCHLESINGER; LEVITZ, 2002; MANSOUR; LATZ; LEVITZ, 2006). Graças a esta capacidade de reconhecimento, a ativação dos receptores de manose leva a proteção do hospedeiro contra a criptococose, com um desfecho melhor do hospedeiro, menor carga fúngica e uma maior migração de linfócitos T para o local primário da infecção (DAN et. al., 2008).

Um dos principais desfechos na ativação dos receptores previamente comentados é a ativação do fator de transcrição NF- κ B. A ativação do NF- κ B promove a translocação desta proteína do citoplasma para o núcleo, aonde ela irá exercer sua função, ativando a transcrição de genes (Figura 4). Quando esta ativação é promovida por PAMPs, ela é conhecida como ativação clássica, sendo que este tipo de ativação promove a transcrição de fatores e componentes pró-inflamatórios. Sendo assim, é válido dizer que a ativação do NF- κ B é de extrema importância para a montagem de uma resposta eficaz contra infecções fúngicas, graças ao direcionamento do sistema imune para uma resposta pró-inflamatória, com destaque para a produção de enzimas como INOS, moléculas de adesão como ICAM e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (BONIZZI; KARIN, 2004).

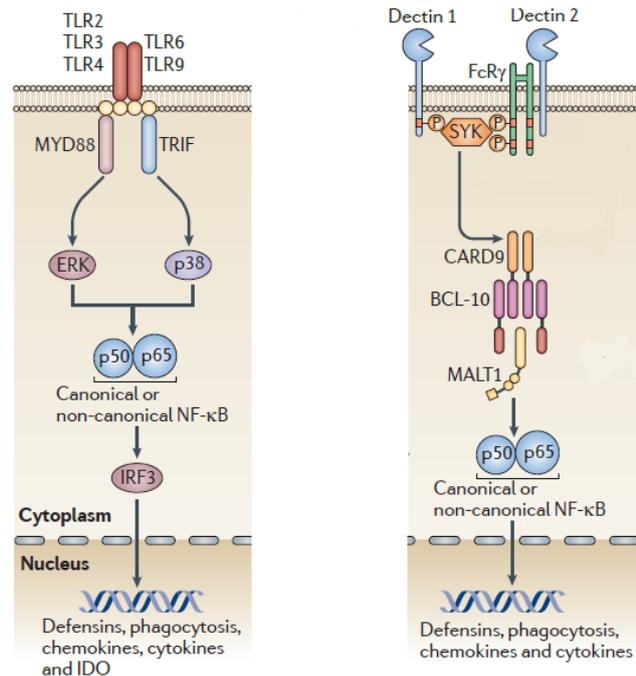


Figura 4: Esquema simplificado da via de sinalização promovida pela ativação de TLRs e CLRs, finalizando na ativação de NF- κ B (modificado de ROMANI, 2011)

Inflamassoma e seus Receptores

Outra família de receptores de extrema importância para o reconhecimento de infecções é a dos receptores do tipo NOD (NLRs). Todos os integrantes desta família se localizam na porção citoplasmática das células, sendo considerados extremamente importantes no combate contra bactérias e vírus, a partir do reconhecimento de PAMPs destes patógenos, quando internalizados (KAPARAKIS; PHILPOTT; FERRERO, 2007). Os NLRs podem ser divididos em três subtipos distintos, denominados NOD; NLRP e IPAF (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

A grande maioria dos receptores que compõem esta família ainda não foi extensamente estudada, o que gera um acúmulo de funções e mecanismos que ainda não foram completamente elucidados. Um dos fatores mais estudados, ao se tentar entender a importância destes receptores, foi a de como os NLRs de mamíferos se assemelhavam e se diferenciavam com os de vegetais. Estudos tentaram entender como, apesar da semelhança estrutural entre estes receptores, os NLRs nos vegetais possuíam atividades muito mais amplas e ao mesmo tempo específicas quando comparados com os NLRs de mamíferos, capazes de reconhecerem uma gama menor de ligantes (MAEKAWA; KUFER; SCHULZE-LEFERT, 2011; BONARDI et. al., 2012). Outra questão bastante abordada era sobre a importância dos NLRs em relação à manutenção da microbiota do hospedeiro e a tolerância

contra ela, levando em consideração a importância destes receptores no reconhecimento de bactérias, especialmente nas mucosas e epitélios (KAPARAKIS; PHILPOTT; FERRERO, 2007). Atualmente tem-se que os subtipos NOD são responsáveis por este controle da microbiota no sistema gastrointestinal, sendo que mutações nestes receptores levam a uma perda de tolerância e a inflamações crônicas (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009).

Outro subtipo dos NLRs, o NLRP, é conhecido devido à habilidade de seus receptores de reconhecerem uma ampla variedade de DAMPs. DAMPs são sinais de perigo que não derivam diretamente de um patógeno, mas sim do possível dano que ele ou outras patologias trazem às células do hospedeiro. Desta maneira, é possível destacar algumas ações destes sinais, como: (1) sendo liberados pelas células do hospedeiro após uma morte não programada, ou propositalmente por células do sistema imune; (2) sendo ativadores do sistema imune inato; (3) sendo responsáveis pela reposição da homeostasia. Os DAMPs são em sua grande maioria de origem intracelular, podendo ser encontrados após o rompimento das células (proteínas de grupo de alta mobilidade – HMGB1) ou após serem secretados pelas mesmas (proteína do choque térmico – HSP). Essas moléculas podem ser proteicas (complemento C3a) ou não (RNA próprio ou adenosina trifosfato – ATP) (BIANCHI, 2007; TANG et. al., 2012). Neste contexto, o reconhecimento destes DAMPs pelos NLRP é de vital importância para a manutenção da homeostasia, principalmente por meio de respostas inflamatórias exacerbadas. Esta função dos NLRP foi comprovada a partir da constatação de que estes receptores tem a capacidade de se oligomerizar, formando um complexo proteico denominado inflamassoma (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Inflamassoma é o termo designado para nomear um complexo proteico com alta massa molecular capaz de ativar caspases pró-inflamatórias. Existem diversos receptores capazes de gerarem inflamassomas, o que faz com que diversos tipos de DAMPs e PAMPs sejam responsáveis pela ativação destes inflamassomas (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). Entre os principais inflamassomas podemos citar: NLRP1b, responsável por reconhecer e combater toxinas de *Bacillus anthracis* (BOYDEN; DIETRICH, 2006); NLRC4, inflamassoma gerado a partir da ativação de um receptor do subtipo IPAF que é capaz de reconhecer um padrão presente na flagelina (MIAO et. al., 2006) e em outras proteínas presentes no aparato secretório de bactérias como *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* e *Shigella flexner* (MIAO et. al. 2010); NLRP6, que assim como os receptores NOD, apresenta uma relação íntima com a manutenção da microbiota intestinal, provavelmente a partir do controle da secreção de muco

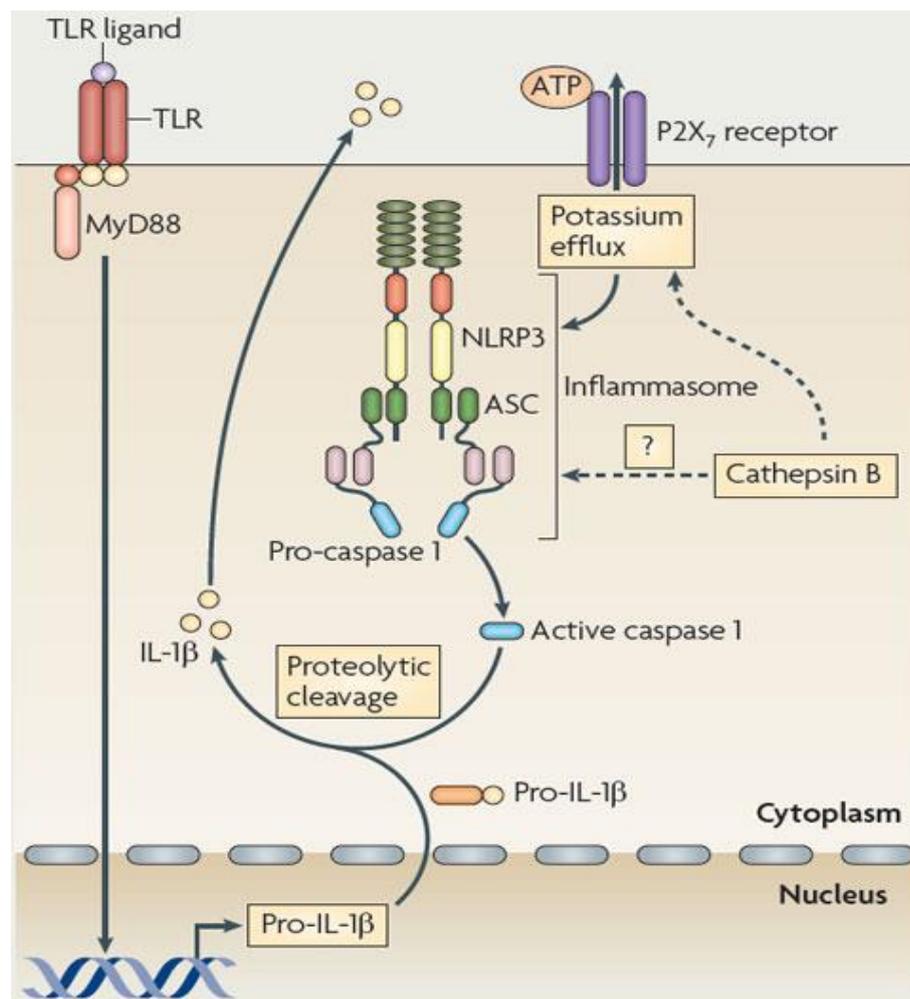
(WLODARSKA et. al., 2014); e NLRP3, que é o principal inflamassoma estudado atualmente, devido a sua importância em diversas patologias e sua capacidade de ser ativado por infecções bacterianas, virais, parasitárias e fúngicas (LAMKANFI; DIXIT, 2012).

Devido a esta grande diversidade de ativadores do inflamassoma NLRP3, é postulado que estes microrganismos ativem este receptor de maneira indireta, através de DAMPs liberados a partir de danos gerados durante a infecção. Corroborando com este pressuposto, estudos descobriram que diversos DAMPs como ATP, ácido úrico, cristais de colesterol, entre outros, são capazes de ativar o NLRP3. Como mais uma evidência, também foi constatado que irritantes ambientais como sílica, amianto e radiação UVB eram capazes de ativar o inflamassoma NLRP3 (SCHRODER; TSCHOPP, 2010; BAUERNFEIND; HORNUNG, 2013). Ainda assim, a hipótese da ativação do inflamassoma pelos DAMPs ainda não explica como moléculas que não compartilham nenhum padrão em comum são capazes de ativar um único receptor. Desta forma, graças a estudos que demonstraram que alguns fenômenos são essenciais para o funcionamento do inflamassoma, surgiram três modelos hipotéticos para a ativação do NLRP3: (1) a partir do efluxo de potássio (PÉTRILLI et. al., 2007) e outros íons (LAMKANFI; DIXIT, 2012); (2) a partir da produção de reativos de oxigênio (ROS) mitocondriais (ZHOU et. al., 2011); (3) a partir da desestabilização de fagolisossomos, com a liberação de catepsina B (HENTZE et. al., 2003). Apesar das evidências, estes três modelos possuem algumas lacunas (DOSTERT et. al., 2009; BAUERNFEIND et. al., 2011; LAMKANFI; DIXIT, 2009), não conseguindo elucidar a ativação do inflamassoma NLRP3 isoladamente, o que sugere mecanismos de redundância ou ainda não propostos. Mesmo toda a gama de ligantes tendo sido reduzida a três mecanismos, ainda assim estes mecanismos apresentam produtos muito distintos entre si, o que novamente reforça que a ativação do NLRP3 que conhecemos até o momento é indireta, necessitando de adaptadores ainda desconhecidos para a ligação direta com o receptor (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Sob o ponto de vista estrutural, o inflamassoma NLRP3 é composto de um receptor (NLRP3), uma proteína adaptadora (ASC) e uma proteína efetora (caspase-1). A ativação clássica deste inflamassoma, como descrita acima, envolve a ativação do receptor NLRP3, levando ao recrutamento e interação com o adaptador ASC, que por sua vez recruta a pró-caspase-1, fazendo uma ligação entre estas proteínas. A ligação das pró-caspases-1 promovem uma auto clivagem da mesma, gerando a caspase-1, proteína ativa que exerce a função efetora do inflamassoma. Sob o ponto de vista funcional, o inflamassoma NLRP3 é responsável pela clivagem das citocinas pró-IL1 β e pró-IL18, promovendo a secreção de suas partes ativas IL-

IL-1 β e IL-18, respectivamente (SCHRODER; TSCHOPP, 2010; MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009).

Apesar de parecer uma via de sinalização bastante direta, o inflamassoma é regulado em dois momentos diferentes, necessitando de sinais específicos para a sua total ativação e funcionamento. Primeiramente é importante saber que os níveis de NLRP3 expressos nos mais diversos tipos celulares são, na grande maioria das vezes, extremamente baixos, sendo necessário um sinal prévio para que haja a produção de um número suficiente destes receptores para a oligomerização do inflamassoma. Este sinal é fornecido a partir da ativação do NF- κ B, que induz a produção de NLRP3, assim como também aumenta a produção de pró-IL1 β e pró-IL18, substratos necessários para a ação do inflamassoma, como visto acima. O segundo sinal é o sinal já discutido previamente, ou seja, a ativação do NLRP3 em si (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013, LAMKANFI; DIXIT, 2012).



Nature Reviews | Immunology

Figura 5: Esquema simplificado da ativação e ação do inflamassoma NLRP3 (retirado de MARRACK, MCKEEC, MUNKS, 2009)

Graças à rápida liberação das citocinas IL-1 β e IL-18, é possível afirmar que a ativação do inflamassoma leva a uma resposta intensamente pró-inflamatória, o que em um primeiro momento é benéfico no combate de determinadas infecções (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013), mas que em longo prazo pode gerar mais danos do que benefícios ao hospedeiro. Este fato explica a necessidade de um controle rígido sobre essa via de sinalização.

O Papel do Inflamassoma NLRP3 em Infecções Fúngicas

Desde a descoberta dos inflamassomas e de seu papel essencial no combate às infecções, diversos estudos foram realizados buscando a importância deles nas respostas imunes contra patógenos fúngicos. Devido à sua importância clínica, a *C. albicans* foi o primeiro patógeno no qual este complexo multiprotéico foi analisado. Em um único ano, três estudos foram publicados (GROSS et. al., 2009; HISE et. al., 2009; JOLY et.al., 2009), descrevendo os receptores (TLR-2 e dectina-1), as vias de sinalização (SyK dependente) e os mecanismos para ativação (produção de ROS, efluxo de potássio e liberação de cathepsina B) envolvidos. Mas o principal achado que os três estudos compartilharam foi o de que o inflamassoma NLRP3, por sua via de ativação clássica (ativação do adaptador ASC e da proteína caspase-1), era o responsável pelo reconhecimento e combate da *C. albicans*. Outro resultado que estes estudos compartilhavam era de que, havendo depleção de qualquer uma das principais proteínas do inflamassoma NLRP3, havia um desfecho pior da infecção para o hospedeiro. Um estudo realizado posteriormente corroborou os dados encontrados e mostrou que a ativação do inflamassoma era crucial para uma polarização Th1/Th17 da resposta adaptativa, que é conhecidamente protetora contra o fungo (VAN DE VEERDONK et. al., 2011). Finalmente novos estudos surgiram demonstrando que, além do NLRP3 e sua ativação clássica, outras vias também são importantes contra a *C. albicans*, como o inflamassoma NLRC4, em infecções orais (TOMALKA et. al., 2011), e a via da ativação não canônica do NLRP3, contra componentes de parede do fungo (GANESAN et. al., 2014). Apesar destes novos estudos, a importância destas novas vias não está completamente elucidada, mantendo o inflamassoma NLRP3 como central no combate à candidíase.

A importância do inflamassoma NLRP3 também foi investigada em diversos outros gêneros de fungos. O reconhecimento da forma hifal do *A. fumigatus*, causador da segunda infecção fúngica mais prevalente, promove uma ativação do NLRP3, sendo esta dependente

da via SyK (e consequentemente da ativação de dectina-1), a produção de ROS e o efluxo de potássio (SAÏD-SADIER et. al., 2010). Fungos causadores de dermatofitoses também foram investigados. O inflamassoma NLRP3 se mostrou importante no combate contra *Trichophyton schoenleinii* (LI et. al., 2013) e *Microsporum canis* (MAO et. al., 2014), sendo que seus três mecanismos de ativação propostos são essenciais para o funcionamento do mesmo. O estudo realizado com o *M. canis* também indicou a necessidade da ativação de dectina-1 e da via SyK, sendo que esta necessidade também foi encontrada para algumas espécies do gênero *Malassezia*, um fungo comensal causador de infecções cutâneas (KISTOWSKA et. al., 2014). Saindo das infecções oportunistas, nosso grupo verificou a importância do NLRP3 contra o *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo termodimórfico que atua como patógeno primário na América Latina. Novamente foi verificada a importância de dectina-1, SyK e dos três mecanismos propostos de ativação do inflamassoma (TAVARES et. al., 2013). Juntos, todos esses estudos reforçam a importância já conhecida do receptor dectina-1 contra infecções fúngicas, acrescentando o inflamassoma NLRP3 como outro componente central na imunidade antifúngica.

Tabela 1: Fungos estudados quanto à ativação do inflamassoma, com ênfase nas condições para tal ativação.

Agente Infeccioso	Inflamassoma Envolvido	Via de Ativação do NF-κB	Mecanismos de Ativação do Inflamassoma	Deleção de Componentes do Inflamassoma	Referência Bibliográfica
<i>C. albicans</i>	NLRP3/NLRC4	TLR2/ Dectina-1/ SyK	ROS/ K ⁺ / Catepsina B	Susceptibilidade do Hospedeiro	Hise et al., 2009 Gross et al., 2009 Joly et al., 2009 Tomalka et al., 2011
<i>A. fumigatus</i>	NLRP3	SyK	ROS/ K ⁺	Não Estudado	Saïd-sadier et al., 2010
<i>C. neoformans</i>	NLRP3	SyK	ROS/ K ⁺ / Catepsina B	Susceptibilidade do Hospedeiro	Lei et al., 2013 Guo et al., 2014
<i>T. schoenleinii</i>	NLRP3	Não Estudado	ROS/ K ⁺ / Catepsina B	Não Estudado	Li et al., 2013
<i>M. canis</i>	NLRP3	Dectina-1/ SyK	ROS/ K ⁺ / Catepsina B	Não Estudado	Mao et al., 2014
<i>Malassezia</i> spp.	NLRP3	Dectina-1/ SyK	K ⁺	Não Estudado	Kistowska et al., 2014
<i>P. brasiliensis</i>	NLRP3	Dectina-1/ SyK/ MyD88	ROS/ K ⁺ / Catepsina B	Não Estudado	Tavares et al., 2013

Com o *C. neoformans* não é diferente. O primeiro estudo com criptococose revelou que uma cepa proveniente de infecção não era capaz de ativar o inflamassoma NLRP3, em sua forma usual de levedura capsular. No entanto, quando o fungo era induzido a formar biofilme, a ativação do inflamassoma era observada. Enquanto nenhuma produção significativa de IL-1 β era observada quando células do sistema imune interagiam com as leveduras, a interação com a forma de biofilme levava a altas produções desta citocina, sendo esta produção dependente da ativação clássica do NLRP3, ou seja, sendo necessária a ativação do receptor NLRP3, do adaptador ASC e da proteína caspase-1. Foi verificado também que esta ativação era dependente dos mecanismos propostos para a ativação do inflamassoma, ou seja, a inibição na produção de ROS, o bloqueio do efluxo de potássio e o impedimento da liberação de catepsina B impediam a produção de IL-1 β frente à infecção pelo biofilme do *C. neoformans*. Ultimamente, o estudo também demonstrou que a deleção do receptor NLRP3 ou do adaptador ASC levava ao agravamento da criptococose no hospedeiro, indo de concordância com os resultados encontrados para candidíase (LEI et. al., 2013). Recentemente um trabalho trouxe a luz sobre algumas peculiaridades referentes à ativação do inflamassoma pelo *C. neoformans*. A partir da infecção por leveduras de uma cepa acapsular, o padrão de ativação do inflamassoma e suas consequências permaneceram as mesmas do estudo anterior. As novidades ficaram por conta da demonstração de que era necessário o fungo viável para a ativação do inflamassoma e de que a reposição artificial da cápsula na cepa inibia esta ativação (GUO et. al., 2014). Juntos, os estudos demonstram que o *C. neoformans* ativa o inflamassoma NLRP3 e que o mesmo é importante para o hospedeiro no combate a infecção. Mais importante, ambos demonstram que a presença da cápsula ou de seus componentes parece ser decisiva na defesa do fungo, a partir da inibição da ativação do inflamassoma, provavelmente pela prevenção de reconhecimento dos PRRs de membrana plasmática.

OBJETIVOS

Geral

Tendo em vista a inatividade do sistema inflamassoma em macrófagos perante a infecção por *C. neoformans*, este trabalho visa aprofundar os conhecimentos acerca da interação entre os componentes capsulares secretados pelo *C. neoformans* e o sistema inflamassoma NLRP3, principalmente no que tange a inibição da ativação do mesmo.

Específicos

- Isolamento e caracterização parcial da molécula(s) capsular(es) responsável pela inibição do inflamassoma NLRP3
- Investigação do possível mecanismo de ação da inibição exercida por esta(s) molécula(s)
- Verificação das interações adicionais entre os componentes capsulares e os macrófagos, sob o ponto de vista funcional dos mesmos perante infecção por *C. neoformans*

METODOLOGIA

Animais

Os animais utilizados para o estudo foram camundongos da linhagem C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade, obtidos por meio de endocruzamento (linhagem isogênica). A linhagem C57BL/6 é amplamente utilizada em modelos de estudo para infecção por *C. neoformans*, sendo considerada uma linhagem susceptível à infecção quando nesta idade, apresentando resposta imune polarizada para Th2 (BLACKSTOCK; MURPHY, 2004; CHEN et. al., 2008). Todos os camundongos foram criados no biotério do Instituto de Biologia – UnB, sendo mantidos em padrão sanitário, recebendo água e alimentação “*ad libitum*”.

Cryptococcus neoformans

Foram utilizadas três cepas de *C. neoformans*, H99 (*C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A), B3501 (*C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D) (KWON-CHUNG; VARMA, 2006) e CAP67 (*C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D - mutante acapsular derivado da cepa B3501) (FROMTLING; SHADOMY; JACOBSON, 1982). Estas cepas foram inoculadas em um meio de congelamento, composto de 70% de caldo Sabouraud (Himedia) e 30% glicerol (Vetec), e mantidas em alíquotas congeladas em -20°C por até dois anos (SILVA; COSTA; RECHE, 2008). Antes de ser utilizada em experimentos, a alíquota foi descongelada e cultivada em meio caldo Sabouraud por 72 horas, a 30°C sob agitação de 120 RPM. Após este período, uma pequena alíquota destas leveduras foi retirada e cultivada em um novo meio caldo Sabouraud, desta vez por 48 horas, nas mesmas condições de cultivo. Após este segundo crescimento as leveduras eram preparadas para serem utilizadas nos experimentos subsequentes. O preparo das leveduras era realizado centrifugando uma alíquota a 1200xg por cinco minutos e ressuspensando as células em tampão fosfato salina (PBS), repetindo esta operação por mais duas vezes. Após estas lavagens, o fungo estava pronto para ser utilizado.

Obtenção dos Macrófagos

Foram utilizados neste estudo macrófagos obtidos a partir de duas origens diferentes: macrófagos derivados de medula óssea (BMM) e macrófagos peritoneais. As células de medula óssea foram coletadas do interior do fêmur e tíbia dos camundongos, a partir da técnica de lavado femoral. Resumidamente, os camundongos foram sacrificados por meio de

asfixia com CO₂, seguido pela retirada do fêmur e tíbia das duas patas, separadamente. As epífises do fêmur e tíbia foram cortadas, e foi realizado um lavado do interior destes utilizando-se uma seringa de agulha fina contendo meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), obtendo-se assim as células. Estas células posteriormente eram contadas, ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino (SFB – Gibco) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) e acondicionadas em criotubos, na concentração de 5x10⁶/mL. Os criotubos foram acondicionados em um compartimento denominado “Mr. Frosty” (Thermo Scientific), que mantém a viabilidade celular durante o congelamento, a partir de uma queda de temperatura constante (-1°C por minuto). Este compartimento permanece por 24 horas em freezer -80°C, sendo os criotubos transferidos após este período para um tanque de nitrogênio líquido.

Prioritariamente ao início do procedimento de diferenciação, os criotubos foram submetidos a 37°C em banho-maria, para seu descongelamento, sendo transferidos para um tubo de plástico contendo 10 mL de RPMI-1640 aquecido a 37°C (MARIM et. al., 2010). As células foram então analisadas quanto à quantidade e viabilidade, por meio do corante azul de tripan (Sigma). Depois de contadas, as células foram ressuspensas em meio de diferenciação LCCM (20% de SFB, 50% de RPMI-1640 e 30% de sobrenadante de L929) e transferidas para placas de cultivo na concentração de 2x10⁶ por 10 mL por placa, sendo colocadas em situação de cultivo (37°C sob atmosfera de 5% de CO₂). Após 4 dias, mais 10 mL de meio de diferenciação LCCM foram adicionados por placa. No oitavo dia de cultivo, o sobrenadante foi retirado da placa e as células foram recobertas com um líquido denominado “Tryple Express” (Life Technologies), sendo deixado durante 15 minutos a 37°C. O “Tryple Express” promove a dissociação dos BMM do fundo da placa e é uma alternativa mais segura que a tripsina. Após a coleta e contagem destes macrófagos, os mesmos eram ressuspensos em meio de experimento (10% de SFB, 85% de RPMI-1640 e 5% de sobrenadante de L929), sendo colocados nas placas de cultura e repousando por 24 horas. Após este tempo, o meio contido nas placas foi renovado e os experimentos subsequentes foram realizados (ZAMBONI; RABINOVITCH, 2003).

A linhagem celular L929 é uma cultura de hibridomas murinos com característica de fibroblastos. Quando em cultura, esta linhagem celular apresenta a capacidade de expressar grandes quantidades de fator de crescimento de macrófagos (M-CSF) e uma pequena quantidade de fator de crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (ENGLÉN et. al., 1995). Estes fatores são os responsáveis pela diferenciação das células de medula óssea

em macrófagos primários no procedimento de diferenciação supracitado. Para a obtenção destes fatores, células L929 foram cultivadas em garrafas de cultura e deixadas em crescimento (90% de RPMI-1640 e 10% de SFB) até a obtenção da confluência (todo o espaço de cultivo preenchido). Atingindo este evento, o meio foi repostado e as células permaneceram em situação de cultivo por 7 dias. O sobrenadante resultante deste cultivo foi filtrado em poro 0,22 μ m, dando origem ao sobrenadante de L929, utilizado no meio de diferenciação LCCM.

A obtenção de macrófagos peritoneais foi realizada em camundongos previamente estimulados, a partir da técnica de lavado peritoneal. Para isso, 2 mL de tioglicolato caldo (Laborclin) foram injetados, com uma seringa de 10 mL, na cavidade intraperitoneal de cada camundongo. O tioglicolato é um agente de elicitação de monócitos, ou seja, ele promove a migração e transformação dos mesmos em macrófagos. Após três dias de reação, os camundongos foram sacrificados por meio de asfixia por CO₂ e os macrófagos foram recuperados através da lavagem da cavidade peritoneal, realizada a partir da inserção de 10 mL de RPMI-1640 gelado por uma seringa de 10 mL na cavidade peritoneal e recuperação deste líquido pela mesma seringa (ZHANG; GONÇALVES; MOSSER, 2008). Após a recuperação de todo o líquido, as células foram lavadas em RPMI-1640 e contadas, sendo colocadas posteriormente em placas de cultura e descansando por 24 horas em meio experimental (10% de SFB e 90% de RPMI-1640). Após este período de tempo, o meio era renovado e os experimentos subsequentes iniciados.

Obtenção do Meio Condicionado Bruto

As cepas B3501 e CAP67, após serem preparadas como anteriormente descrito, foram colocadas para cultivo em um meio de cultura quimicamente definido, denominado de meio mínimo (MM). O meio mínimo é composto de: glicose (15 mM - Vetec), sulfato de magnésio (10 mM - Isofar), fosfato monopotássico (29.4 mM - Biotec), glicina (13 mM - Invitrogen) e tiamina (3 μ M - Vetec), ajustado com hidróxido de potássio (2N) para o pH 5,5. O meio mínimo é indicado na literatura pela pressão que exerce no *C. neoformans*, induzindo o aumento de sua cápsula e conseqüente maior liberação de vesículas contendo os componentes de cápsula, principalmente GXM e GalXM (FRASES et. al., 2009). O fungo foi inoculado em uma concentração de 10⁵ leveduras por mL e permanece em crescimento por 5 dias. Após este

período, o meio de cultura com os fungos foi coletado e centrifugado por duas vezes a 1200xg para a remoção das células fúngicas. O sobrenadante resultante foi filtrado em membrana de porosidade 0,22 μ m e o líquido filtrado liofilizado. O produto liofilizado foi ressuspendido em água padrão Milli-Q, sendo concentrado 10 vezes (10X), gerando assim o meio condicionado bruto, que para a cepa B3501 foi denominado CM35 e para a cepa CAP67 foi denominado CMCAP.

Fracionamento do Meio Condicionado

O meio condicionado bruto CM35 passou por diversos fracionamentos e tratamentos, sendo eles: fracionamento por tamanho por ultrafiltração, fracionamento por polaridade, autoclavagem, tratamento com proteases e fracionamento por cromatografia líquida (HPLC), por tamanho e carga. O meio condicionado CMCAP passou somente pelo fracionamento por tamanho por ultrafiltração. Todos estes processos foram realizados no laboratório de Biologia Molecular, pela Dra. Patrícia Albuquerque.

Para o fracionamento por tamanho, foi utilizado um sistema de ultra filtração (Millipore), com filtros de membrana variando entre 100kDa e 1kDa. O objetivo deste fracionamento foi a obtenção serial de frações com moléculas de tamanho menor que o filtro, ou seja, foram obtidas primeiramente frações com moléculas menores que 100kDa (CM35 <100kDa), após menores que 10kDa (CM35 <10kDa) e por último menores que 1kDa (CM35 <1kDa e CMCAP <1kDa). Também foi realizada a coleta de amostra de um dos filtros, aonde a amostra foi obtida através da junção das moléculas que passaram pelo filtro de 100kDa e das moléculas que ficaram retidas e foram recuperadas do filtro de 10kDa (100kDa > CM35 > 10kDa). Já o fracionamento por polaridade foi realizado a partir da técnica de Bligh-Dyer (BLIGH; DYER, 1959). Resumidamente, esta técnica permite a separação de componentes lipídicos da amostra, a partir de uma solução de clorofórmio, metanol e água. Após o fracionamento, a solução apresenta duas fases, sendo que uma contém os lipídeos extraídos (CM35 – Fração apolar) e a outra contém as outras moléculas do meio condicionado (CM35 – Fração polar). Para os ensaios, as duas frações foram coletadas.

Dois tratamentos foram realizados com o CM35. Primeiramente, o meio condicionado passou por um ciclo de autoclavagem (121°C por 20 minutos) gerando o CM35 autoclavado. O CM35 também foi tratado com três proteases, sendo que estas foram acrescentadas ao meio

condicionado e deixadas durante 24 horas, a 37°C. As três proteases utilizadas foram: pronase (CM35 + pronase), tripsina (CM35 + tripsina) e termolisina (CM35 + termolisina).

Finalmente, as moléculas do CM35 <1kDa foram isoladas e purificadas por HPLC. Para a realização das corridas, duas colunas diferentes foram utilizadas, ambas com afinidade por substâncias polares. A primeira foi uma coluna denominada “Hypercarb” (Thermo Scientific – 100 X 0,3mm), sendo realizada uma corrida de 30 minutos tendo como solvente um gradiente de água e acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoroacético. A segunda foi uma coluna denominada “Aminex HPX-87P” (Bio-Rad – 300 X 7,8mm), sendo realizada uma corrida de 30 minutos tendo como solvente água. Esta coluna necessita de um forno a 80 °C durante a corrida. As corridas foram realizadas em um UPLC (Shimadzu) e os espectros dos picos obtidos em 280 nm.

Ensaio de Interação com Meio Condicionado

Para a realização dos experimentos de interação entre macrófagos e os meios condicionados, macrófagos peritoneais ou BMM foram plaqueados em placas de cultura de 6, 24 ou 48 poços, sempre respeitando a concentração de 1×10^6 células por mL. Após a renovação do meio de cultura, comentada acima, as células eram estimuladas com lipopolissacarídeos de *E. coli* (LPS - 500 ng/mL – Sigma-Aldrich) por 4 horas, exceto pelo controle negativo. Este é considerado o primeiro sinal para ativação do inflamassoma, a partir da ativação de NF- κ B. Após este período, eram acrescentados os meios condicionados brutos, suas frações, meio mínimo ou GXM purificada (gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Márcio Rodrigues – UFRJ), sendo deixados juntamente com a cultura overnight (aproximadamente 18 horas). No dia seguinte, as culturas recebiam nigericina (20 μ M – Invivogen) por 40 ou 90 minutos, exceto pelo controle negativo. Este é considerado o segundo sinal para a ativação do inflamassoma, a partir da ativação no NLRP3 por promover o efluxo de potássio. Após este tempo, o sobrenadante foi coletado, sendo utilizado para a dosagem de citocinas e de LDH.

As células também foram utilizadas, sendo coletadas na análise de ativação de caspase-1 e de internalização de GXM. O lisado celular também foi utilizado para a análise de citocinas intracelulares. Para a obtenção do lisado celular, após a coleta do sobrenadante dos ensaios de interação as células foram lavadas duas vezes com PBS, sendo adicionado RPMI +10% SFB após as lavagens. As células passaram então por três ciclos de congelamento (-80

°C) e descongelamento (37 °C). Após os ciclos, as amostras foram centrifugadas para descartar as sobras celulares e o sobrenadante resultante do lisado foi coletado.

Detecção da Internalização de GXM por Microscopia Confocal

Para este ensaio, os meios condicionados CM35, CMCAP e CM35 <1kDa foram utilizados em interação com BMMs. Para tal, as células foram plaqueadas em placa de cultura de 24 poços na concentração de 1×10^6 células por mL, sendo que no fundo de cada poço havia uma lamínula circular. As células foram estimuladas com LPS por 4 horas e após este período entraram em interação com os meios condicionados (exceto o controle negativo).

Após 24 horas de interação, as culturas foram lavadas três vezes com PBS e as células foram permeabilizadas e fixadas com metanol puro (Vetec), durante dez minutos. Os cultivos foram então novamente lavadas três vezes com PBS e bloqueadas durante 60 minutos com uma solução de bloqueio (PBS + 10% de SFB), para a inibição de ligações não específicas dos anticorpos adicionados posteriormente. As culturas foram novamente lavadas três vezes com solução de lavagem (PBS + 2% SFB) e o anticorpo 18B7 (20ug/mL – anticorpo primário com ligação em GXM) foi incluído em todos os poços, durante 60 minutos. Este anticorpo foi gentilmente cedido pelo Dr. Arturo Casadevall (*Albert Einstein College of Medicine – Nova Iorque*). O 18B7 é um anticorpo monoclonal murino do tipo IgG1 que possui especificidade contra a GXM, apresentando potente característica opsonizante para *C. neoformans* de todos os sorotipos, auxiliando diversos tipos celulares humanos e murinos na fagocitose das leveduras (CASADEVALL et. al., 1998). Logo após se procedeu mais uma lavagem das culturas com solução de lavagem, sendo em seguida adicionado o anticorpo “Alexa Fluor® 633 Goat Anti-Mouse IgG” (Life Technologies – anticorpo secundário acoplado ao fluoróforo Alexa 633, com ligação em porção Fc de anticorpo murino) por 60 minutos. A partir deste momento, todas as etapas posteriores do ensaio foram realizadas em ambiente escuro. Após o período de marcação, as células foram novamente lavadas com solução de lavagem, desta vez sendo acrescentada uma solução de DAPI (Life Technologies – marcador para núcleo de células de mamífero), por 5 minutos. As células foram então lavadas uma última vez com solução de lavagem e as lamínulas circulares foram retiradas do fundo dos poços, sendo colocadas em uma lâmina de microscopia tradicional (a face com as células em contato com a lâmina). As lamínulas foram então fixadas na lâmina tradicional com a ajuda de esmalte de unha, que foi passado nas laterais das lamínulas. Logo após, as amostras foram levadas para

um microscópio de fluorescência denominado “TCS SP8” (Leica). As amostras foram lidas em filtros específicos para cada fluoróforo, em objetiva com aumento de 63X e imersão em óleo.

Dosagem de IL-1 β , pró- IL-1 β e TNF- α por ELISA

Os sobrenadantes obtidos a partir do ensaio de interação entre os macrófagos e os meios condicionados foram utilizados para a dosagem das citocinas IL-1 β , pró- IL-1 β e TNF- α , a partir da técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) do tipo sanduíche. Foram utilizados kits comerciais, denominados Mouse IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!®, Mouse IL-1 beta (Pro form) ELISA Ready-SET-Go!® e Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!® (Ebioscience). Todos os reagentes necessários para o procedimento estavam contidos nos kits (anticorpos, citocina padrão, diluentes, estreptavidina, substrato e solução de parada), com exceção da solução de lavagem (PBS 1X e TWEEN-20 a 0,05%), que foi preparada no laboratório. Após a parada da reação, as placas foram lidas no espectrofotômetro de placa “Multiskan™ FC Microplate Photometer” (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 450 nm. Resumidamente, o princípio do teste se baseia na geração de cor a partir da quebra de substrato por uma enzima acoplada indiretamente às citocinas presentes. Logo, quanto maior a presença destas citocinas na amostra, maior a coloração gerada ao final do ELISA. Durante o ensaio, uma curva de diferentes concentrações conhecidas das citocinas é realizada, utilizando os padrões contidos nos kits. Esta curva é necessária para, a partir das absorbâncias obtidas durante o teste, ser realizada uma quantificação aproximada do total de citocinas presente em cada amostra. Para tal, as absorbâncias da curva e das amostras são processadas em um programa denominado SoftMax (Molecular Devices). Este programa realiza uma curva de calibração (log-log) a partir das absorbâncias obtidas do padrão e, com estes dados, calcula-se a quantidade de citocina correspondente a cada absorbância encontrada, fornecendo assim a quantificação das amostras.

Dosagem de LDH

Para a análise de morte celular, um grupo adicional foi preparado na etapa do ensaio de interação entre macrófagos e os meios condicionados. Para preparar este grupo, as células não receberam nenhum tipo de estímulo até o momento de se adicionar a nigericina. Neste

momento, ao invés de nigericina, estas células receberam DMSO em um volume que representa 20% do meio de cultivo. O DMSO agiu durante o mesmo tempo que a nigericina nos grupos experimentais. Após este tempo, o sobrenadante foi coletado normalmente, e este grupo foi considerado como um controle de 100% de morte celular.

O sobrenadante obtido a partir do ensaio de interação foi utilizado para a dosagem da liberação de lactato desidrogenase (LDH) pelos macrófagos, a partir de técnica enzimática e colorimétrica. O LDH é uma enzima citosólica bastante estável que é liberada em eventos de lise celular, servindo como indicador de morte celular. Para a detecção foi utilizado um kit comercial, denominado CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). Todos os reagentes necessários para o procedimento estavam contidos no kit (diluyente, substrato e solução de parada). Após a parada da reação, as placas foram lidas no espectrofotômetro de placa Spectramax M5 (Molecular Devices), no comprimento de onda de 490 nm. Resumidamente, o princípio do teste se baseia na geração de cor a partir de reações enzimáticas, que envolvem a transformação de um sal em um composto colorido a partir de um substrato gerado pela quebra do LDH. Desta maneira, quanto maior o índice de morte celular no grupo, maior a quantidade de LDH liberada e maior a coloração obtida no final da reação.

Para a obtenção dos dados de porcentagem de morte celular, uma equação foi gerada no programa Excel (Microsoft), onde foi criada uma linha de tendência entre as absorvâncias do ponto 0% (grupo não tratado) e do ponto 100% (grupo tratado com DMSO). As absorvâncias dos grupos experimentais foram então adicionadas nesta equação, sendo obtida assim a porcentagem de morte celular de cada grupo.

Deteção de Caspase-1 Ativa por Citometria de Fluxo

As células presentes no final do ensaio de interação foram utilizadas para a análise da ativação de caspase-1. As placas de cultura foram centrifugadas a 300xg por 5 minutos, logo após o sobrenadante foi retirado e as células foram recobertas com o agente de dissociação Tryple Express. Após 20 minutos em situação de cultivo (37°C sob atmosfera de 5% de CO₂), as células de cada poço foram coletadas em eppendorfs separados, diluídas em PBS e centrifugadas novamente por 5 minutos a 300xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células em cada tubo foram ressuspensas em RPMI-1640 mais 10% de SFB

e contadas. Após a contagem, a concentração celular de cada tubo foi ajustada para 5×10^5 células em 290 μL . Para a marcação, 10 μL de uma solução marcadora contendo um peptídeo denominado FLICA foi utilizada.

Este peptídeo foi obtido no kit FAM-FLICA™ Caspase-1 Assay Kit (Immunochemistry). Este kit traz condições para a realização de ensaios de detecção da ativação de caspase-1 em células inteiras, a partir de fluorescência. Para tal, se utiliza o peptídeo denominado FLICA, que neste kit traz uma sequência de aminoácidos específica para a interação com caspase-1. Esta interação se baseia no fato de que a auto clivagem e posterior ativação da caspase-1 promove a apresentação de um sítio ativo nesta enzima, que é específico para determinados tipos de substratos e responsável pelas reações promovidas por esta enzima. A partir do conhecimento estrutural deste sítio ativo, foi possível a criação do YVAD-FLICA, um peptídeo que apresenta a sequência YVAD (Tirosina, Valina, Alanina e Aspartato), se ligando seletivamente ao sítio ativo da caspase-1 e não sendo processado, o que gera uma ligação covalente e irreversível entre o peptídeo e a enzima. Desta maneira, o YVAD-FLICA é considerado um inibidor da caspase-1 ativa (GARCIA-CALVO et. al., 1998). Para a marcação fluorescente, este peptídeo é ligado a uma molécula de carboxifluoresceína (FAM), que emite luz verde quando excitado. Outra característica do peptídeo FLICA é sua capacidade de permear a membrana celular, podendo facilmente entrar e sair da célula, caso não tenha se ligado à enzima ativa. Unindo estes fatores, o FAM-YVAD-FLICA é um peptídeo fácil de ser utilizado e que apresenta uma marcação rápida, eficaz e seletiva da caspase-1 ativa, podendo ser utilizado em citometria de fluxo.

A marcação das células e subsequente leitura no citômetro de fluxo seguiram as indicações fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, após 45 minutos de marcação a 37°C , as células foram diluídas em tampão fornecido pelo kit, centrifugadas por 5 minutos a $300 \times g$, ressuspendidas em tampão e deixadas em repouso por 10 minutos, promovendo a saída das células dos peptídeos não ligados à caspase-1 ativa. Após este período as células foram novamente centrifugadas, ressuspendidas em tampão e levadas para a leitura. No citômetro de fluxo (FACSVerse – BD Biosciences), foi realizado um “gate” em uma população homogênea, com característica morfológica de macrófagos (excluindo-se os restos celulares provenientes de morte) e a fluorescência foi adquirida no canal FITC (FL-1), na forma de histograma. Para a configuração do experimento, células sem nenhum estímulo e células consideradas como controle positivo (LPS e nigericina) foram levadas ao citômetro sem a marcação do FAM-FLICA, para o ajuste da morfologia (geração do “gate”) e a exclusão de

auto-fluorescência. Os resultados e análises estatísticas foram obtidos a partir de um programa de análise citométrica denominado “FlowJo”.

Ensaio de Fagocitose e Morte

Para a realização dos experimentos do impacto dos componentes de cápsula na internalização e morte do *C. neoformans* por macrófagos, macrófagos peritoneais foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços, respeitando a concentração de 5×10^5 células por mL. O tratamento destas células foi feito usando os mesmos estímulos e períodos de tempo citados anteriormente, com exceção do acréscimo de nigericina ao final do experimento. Ao invés deste estímulo, foram acrescentadas leveduras de *C. neoformans* à cultura.

A cepa H99 foi a cepa de escolha para este ensaio, por apresentar a maior virulência entre as cepas presentes no trabalho (JANBON et. al., 2014). Após preparadas e lavadas, como anteriormente descrito, as leveduras foram contadas e opsonizadas com o anticorpo 18B7 ($5 \mu\text{g/mL}$). As leveduras ficaram em contato com o anticorpo por 15 minutos. Após este período, a suspensão fúngica foi vigorosamente agitada, para remover a agregação de leveduras que a opsonização pelo 18B7 promove. Em seguida as leveduras foram acrescentadas a cultura na concentração de 5×10^5 leveduras por mL, respeitando desta maneira uma taxa de infecção de um macrófago por levedura. Alternativamente, as leveduras também foram opsonizadas com soro murino, em uma proporção de 20% do volume do inóculo, 30 minutos anteriormente à infecção, com a taxa de infecção preservada.

No ato da infecção, as culturas foram divididas em dois grupos: as células que ficaram em infecção por 3 horas (determinação de fagocitose) e as células que ficaram em infecção por 24 horas (determinação de capacidade fungicida). Após três horas de infecção, todas as culturas foram lavadas três vezes com PBS, para a remoção das leveduras que não foram internalizadas e ficam em suspensão ou fracamente aderidas ao fundo da placa. As células de 24 horas de infecção receberam meio de cultivo novo juntamente com os estímulos previamente recebidos (LPS e meios condicionados), dependendo do grupo, e colocados novamente em situação de cultivo por mais 21 horas. As células de 3 horas foram lisadas com $300 \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de dodecil sulfato de sódio (SDS – Bio-Rad) na concentração de 0,05%, sendo deixado em contato com as células entre 3 a 5 minutos. O SDS é um detergente aniônico amplamente utilizado em biologia celular, muito conhecido pela sua capacidade de desnaturação de proteínas e de lise de células mamíferas (APPLICHEM, 2008).

Na concentração utilizada e durante o tempo de exposição utilizado, o SDS é capaz de rapidamente lisar os macrófagos peritoneais murinos, sem apresentar dano às leveduras de *C. neoformans*. Após a lise total dos macrófagos, PBS foi acrescentado no lisado até se chegar ao volume total de 1 mL. Um volume de 100 µL deste lisado foi coletado e diluído em PBS, fazendo uma diluição seriada de 1/100. Então, 100 µL da última etapa desta diluição foi plaqueada em placas de Sabouraud Ágar (Acumedia), que ficaram em estufa de crescimento por 48 horas, sob 30°C. Após este período, as placas foram retiradas da estufa e o crescimento de colônias foi contabilizado (CFU), sendo obtida a capacidade fagocítica dos macrófagos em cada grupo. As células de 24 horas de infecção, que ficaram 21 horas a mais em contato com as leveduras internalizadas, passaram pelo mesmo processo de lavagem com PBS, lise com SDS, diluição seriada, plaqueamento em Sabouraud Ágar, cultivo por 48 horas e contagem do CFU. Considerando a capacidade fagocítica de cada grupo como o ponto zero individual, a capacidade de matar o *C. neoformans* foi calculada a partir da diferença do crescimento entre o CFU de 3 horas e o CFU de 24 horas de cada grupo.

Ensaio de Resistência ao pH

Neste ensaio, as cepas B3501 e CAP67 foram utilizadas, sendo inoculadas em diversos meios de cultivo. Estes meios foram: PBS (controle negativo), Sabouraud Caldo (controle positivo) e meio mínimo em diversas faixas de pH (entre 2 e 5). Estas faixas de pH dos meios mínimos foram obtidas a partir da preparação convencional descrita acima (pH aproximadamente em 4,5) e ajuste do pH com KOH 2N ou com HCl 10%, ambas as soluções sendo preparadas no laboratório. Após o preparo, 40 mL de cada um destes meios foram acondicionados em erlenmeyers de 250 mL. Cada cepa foi inoculada então em cada um destes meios, na concentração de 10^5 por mL.

Nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas cerca de 3 mL foram retirados de todos os grupos e centrifugados a 2000xg para a retirada das leveduras. O sobrenadante foi coletado e o pH deste líquido foi mensurado no pHmetro PHS-3B (pHtek).

Ensaio de Atividade Fungicida com Transwell

Neste ensaio foi utilizado um aparato denominado Transwell[®] (Corning). Neste aparato, o poço de cultura fica separado horizontalmente por uma plataforma, que se localiza no centro do poço. Desta maneira, o poço fica com dois fundos, aonde é possível o cultivo de dois tipos celulares distintos (Figura 6). A grande vantagem deste sistema é que a plataforma, além de aportar uma cultura, também age como um filtro, permitindo a passagem de substâncias com menos de 0,40 μm . Neste esquema, os dois cultivos celulares dividem o mesmo meio de cultivo, não interagindo necessariamente com os mesmos estímulos, mas dividindo necessariamente substâncias menores que 0,40 μm que estejam em solução no meio de cultivo, como por exemplo, citocinas. Desta forma, é possível verificar a resposta de um grupo celular que, mesmo não tendo produzido uma resposta imunológica inicialmente, responde às substâncias geradas por outro grupo celular.

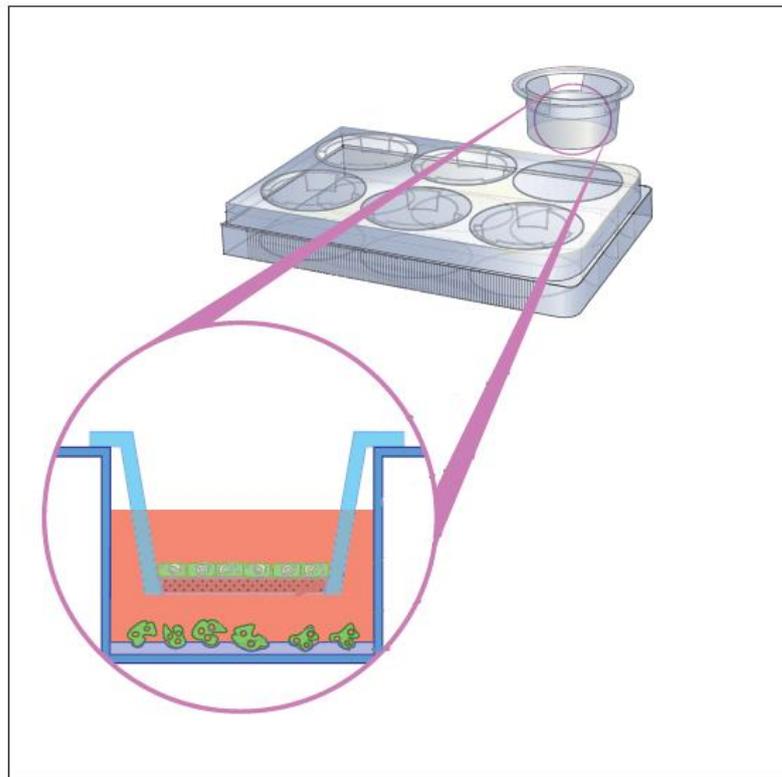


Figura 6: Esquema demonstrativo de poço de cultura portando o aparato “Transwell”, com ênfase na cultura de dois tipos celulares fornecida pela plataforma, com a manutenção do mesmo meio entre ambas (Modificado de WOOD; ROTHENBERG, 2011).

Para este ensaio, macrófagos peritoneais foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços em uma concentração celular de 10^6 células por mL, tanto na parte superior quanto inferior do “Transwell”. Os macrófagos da parte superior ficaram em repouso durante a primeira parte do experimento, enquanto os macrófagos da parte inferior receberam os estímulos. Estas células receberam ou não estímulo com LPS e após 4 horas foram infectadas com duas diferentes cepas de *C. neoformans*: B3501 ou CAP67, na proporção de 2 leveduras para 1 macrófago. Para a fagocitose, as cepas foram opsonizadas com soro murino, em uma proporção de 20% do volume do inóculo, 30 minutos anteriormente à infecção. Após 20 horas de interação, os macrófagos da parte superior do aparato foram infectados pela cepa H99 de *C. neoformans*, na proporção de 1 levedura por macrófago. Esta cepa também foi opsonizada com soro murino previamente à infecção. Após 3 horas de interação as leveduras extracelulares foram retiradas do cultivo, utilizando o mesmo procedimento previamente descrito nos ensaios de fagocitose e morte. Após 21 horas, as leveduras extracelulares foram retiradas do cultivo, os macrófagos lisados e as leveduras intracelulares plaqueadas de acordo com procedimento descrito anteriormente, somente se alterando a etapa de diluição seriada, devido a menor quantidade de leveduras inoculadas.

Análise Estatística

Os resultados apresentados nesse trabalho referem-se a um experimento representativo, com grupos em triplicata, de pelo menos dois ensaios independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software). Dados considerados significativos foram demonstrados com *, quando $P < 0,05$; com **, quando $P < 0,01$; com ***, quando $P < 0,001$; com ****, quando $P < 0,0001$ e com ns, quando $P > 0,05$.

RESULTADOS

Componentes capsulares secretados pelo *C. neoformans* são capazes de inibir a produção de IL-1 β em macrófagos primados, porém não a de TNF- α

Para verificar se os componentes de *C. neoformans* obtidos no meio condicionado eram capazes de inibir exclusivamente o sistema inflamatório de macrófagos *in vitro*, os mesmos foram primados com LPS, receberam os meios condicionados ou meio mínimo e posteriormente foram ativados com nigericina. O sobrenadante resultante desta interação foi utilizado para a dosagem de IL-1 β e TNF- α . Foi possível observar que os macrófagos que entraram em contato com o CM35 apresentavam níveis menores de produção da citocina quando comparados com o controle positivo (LPS e nigericina). Corroborando com a hipótese de que componentes capsulares eram responsáveis por esta ação, macrófagos em contato com o CMCAP ou com meio mínimo apresentaram alteração menos relevante em seus níveis de produção de IL-1 β quando comparados com o controle positivo (Figura 7A), indicando que existe algum componente no meio mínimo capaz de inibir a secreção desta citocina, porém em amplitude menor quando comparado aos componentes presentes no CM35.

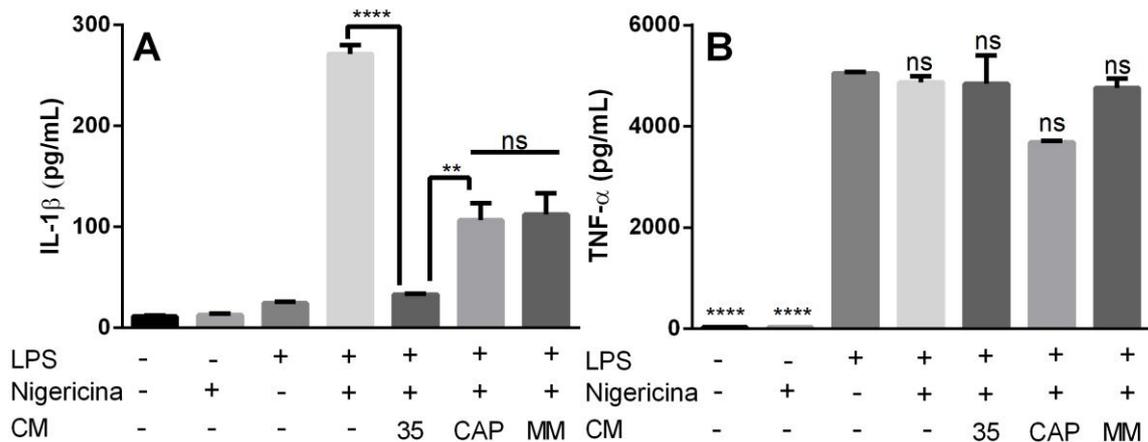


Figura 7 – Componentes capsulares secretados pelo *C. neoformans* são capazes de inibir a produção de IL-1 β em macrófagos primados, porém não a de TNF- α . (A) Níveis de produção de IL-1 β após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS + nigericina e CM35, CMCAP ou meio mínimo. (B) Níveis de produção de TNF- α após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS + nigericina e CM35, CMCAP ou meio mínimo. As estatísticas apresentadas são referentes à comparação com o controle positivo (LPS). 35 = CM35; CAP = CMCAP; MM = Meio mínimo

Em contrapartida, nenhuma das interações foi capaz de alterar significativamente a produção de TNF- α , sendo que as células em contato com CM35, CMCAP ou meio mínimo apresentaram níveis de produção desta citocina próximos ao do controle positivo (Figura 7B). Com este resultado, infere-se que a inibição na produção de IL-1 β provavelmente não envolve a inibição da ativação de NF- κ B, e sim a via de ativação ou a ação efetora do complexo inflamassoma.

Moléculas responsáveis pela inibição da produção de IL-1 β são pequenas e polares

Após a descoberta de que possivelmente eram componentes capsulares os responsáveis pela inibição do inflamassoma, o próximo passo foi caracterizar preliminarmente a molécula ou moléculas que eram responsáveis por esta ação. Novamente o estudo foi realizado em macrófagos *in vitro* e o modelo de estímulo destes macrófagos foi o mesmo apresentado anteriormente. A diferença reside no fato de que foram utilizados meios condicionados com diversos tipos de tratamentos nestes ensaios. Novamente o sobrenadante resultante foi utilizado para a dosagem de IL-1 β .

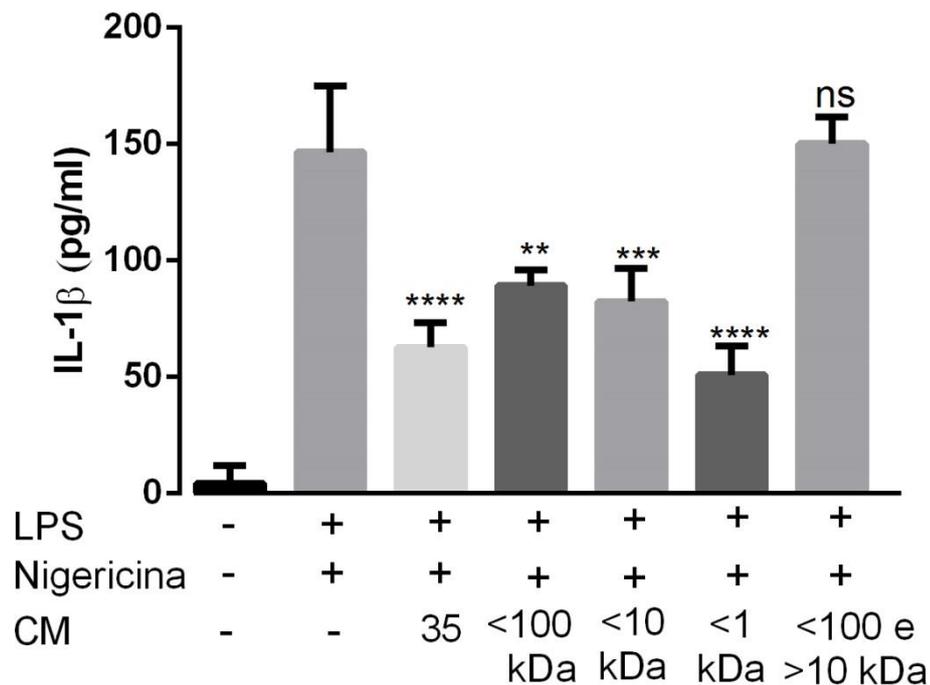


Figura 8 – Moléculas responsáveis pela inibição do inflamassoma são pequenas. Níveis de produção de IL-1 β após ensaio de interação entre BMMs e CM35 bruto e fracionado por tamanho, sendo filtrado em 100kDa (CM35 < 100kDa), em 10kDa (CM35 <10kDa), em 1kDa (CM35 <1kDa) e em 100 kDa e logo após 10kDa, eluido em 100kDa e retido em 10kDa (100kDa> CM35 >10kDa). As estatísticas apresentadas são referentes à comparação com o controle positivo (LPS+Nigericina).

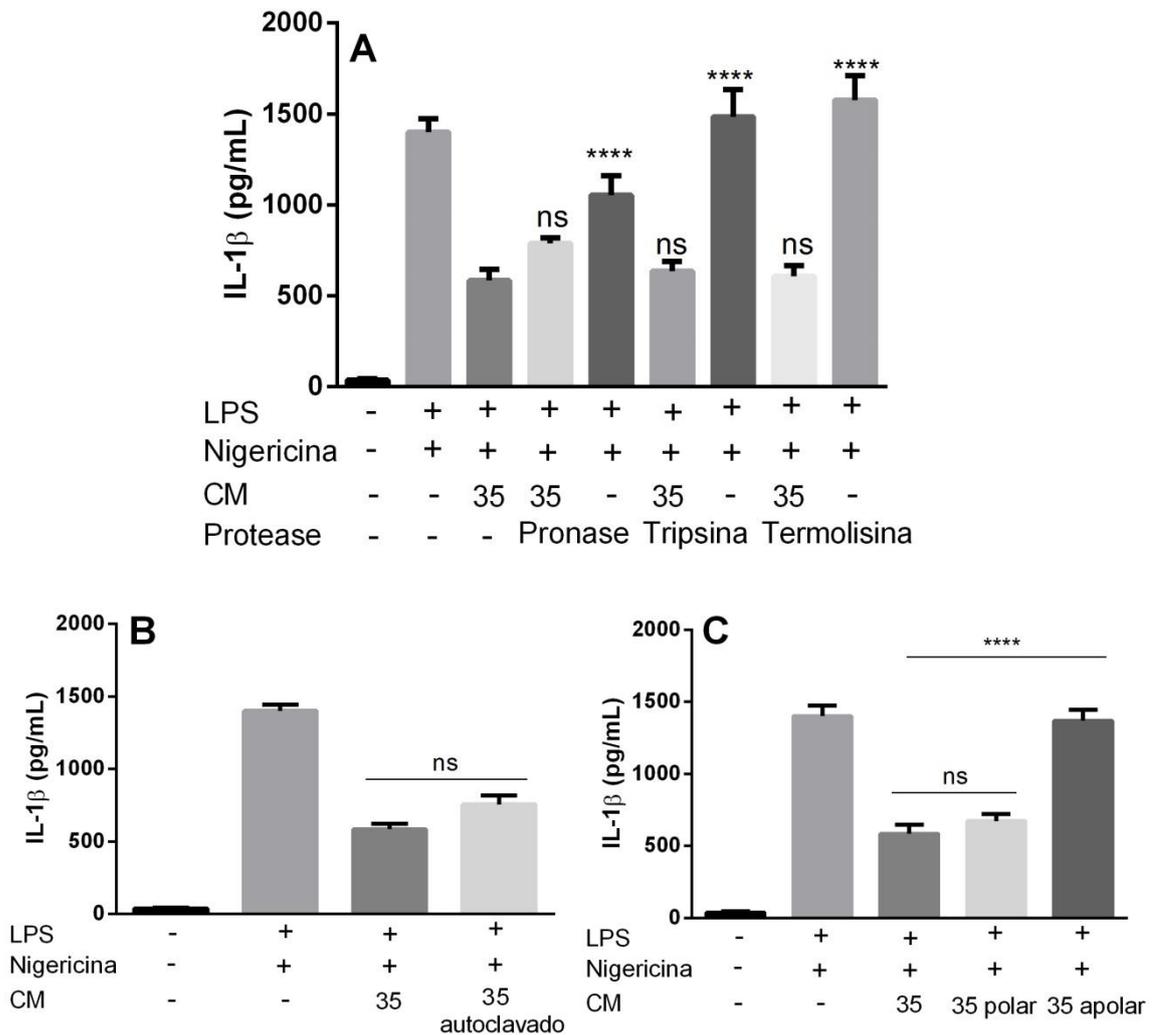


Figura 9 – Moléculas responsáveis pela inibição do inflamassoma são polares. (A) Níveis de produção de IL-1 β após ensaio de interação entre BMMs e CM35 bruto, CM35 tratado com proteases (CM35 + Pronase; CM35 + Tripsina e CM35 + Termolisina) e proteases purificadas (Pronase, Tripsina e Termolisina). (B) Níveis de produção de IL-1 β após ensaio de interação entre BMMs e CM35 bruto e CM35 autoclavado. (C) Níveis de produção de IL-1 β após ensaio de interação entre BMMs e CM35 bruto e CM35 fracionado por polaridade (CM35 – Fração polar e CM35 – Fração apolar). As estatísticas apresentadas são referentes à comparação com o grupo CM35.

O primeiro resultado obtido nestes ensaios é que a molécula ou as moléculas responsáveis pela inibição do inflamassoma são bastante pequenas, estando na fração menor que 1kDa. Esta afirmação foi obtida pelo fato que todas as frações de tamanho do CM35, quando em interação com os macrófagos estimulados, eram capazes de promover uma redução de IL-1 β quando comparadas com o controle positivo, mostrando que a de menor massa (presente em todas as frações) era a responsável pela ação. Corroborando com este

resultado, quando a porção menor que 1kDa era retirada da fração (fração menor que 100kDa e maior que 10kDa), a produção de IL-1 β do macrófago em contato com esta fração era semelhante ao do controle positivo (Figura 8).

Outros ensaios foram feitos com o objetivo de se descobrir as propriedades bioquímicas da molécula ou moléculas, como classe macromolecular e polaridade. Neste aspecto, os resultados demonstraram que a inibição na ativação do inflamassoma não era provocada por proteínas, visto que o tratamento do CM35 com proteases não eliminava a redução na produção de IL-1 β tipicamente apresentada (Figura 9A). Como controle, foi possível observar que somente a adição das proteases durante o ensaio de interação não alterava o padrão positivo de produção de IL-1 β , demonstrando que estas proteases não estavam interferindo com o ensaio. Também foi demonstrado que estas moléculas não apresentam sensibilidade a altas temperaturas, mantendo seu padrão inibitório mesmo após passarem por autoclavagem (121°C) (Figura 9B).

Finalmente, os últimos resultados destes ensaios trouxeram a informação de que eram componentes polares os responsáveis pelo caráter inibitório do CM35, apresentando uma redução na produção de IL-1 β em macrófagos ativados, em contraste com a fase apolar do CM35, que não obteve o mesmo padrão inibitório (Figura 9C). Juntando estes dados, é possível inferir que a molécula ou moléculas procuradas são provavelmente lipídeos anfipáticos ou sacarídeos, devido a seu caráter polar, resistência ao calor e por não serem proteínas. A partir deste momento, todos os ensaios subsequentes foram realizados com a fração menor que 1kDa do CM35 e do CMCAP, a não ser que especificado o contrário.

Isolamento e purificação da molécula responsável pela inibição

Tendo o conhecimento do tamanho aproximado e das características bioquímicas da molécula que estávamos à procura, novos ensaios de interação foram realizados, desta vez utilizando frações do CM35 obtidas por meio de cromatografia líquida. Os resultados mostraram que, em um primeiro momento, foi possível a identificação de uma única fração que apresentasse o caráter inibitório já característico do CM35, neste caso relativa ao único pico obtido na corrida (Figura 10A e 10B). Esta primeira purificação foi realizada em uma coluna (Hypercarb - Thermo Scientific) de exclusão molecular por tamanho, com a capacidade de detectar uma grande faixa de carboidratos, desde extremamente polares até alguns com características anfipáticas. A verificação de que o único pico obtido foi a que

apresentou a atividade inibitória padrão reforça os dados obtidos anteriormente, de que a molécula (ou moléculas) possui características polares e massa pequena.

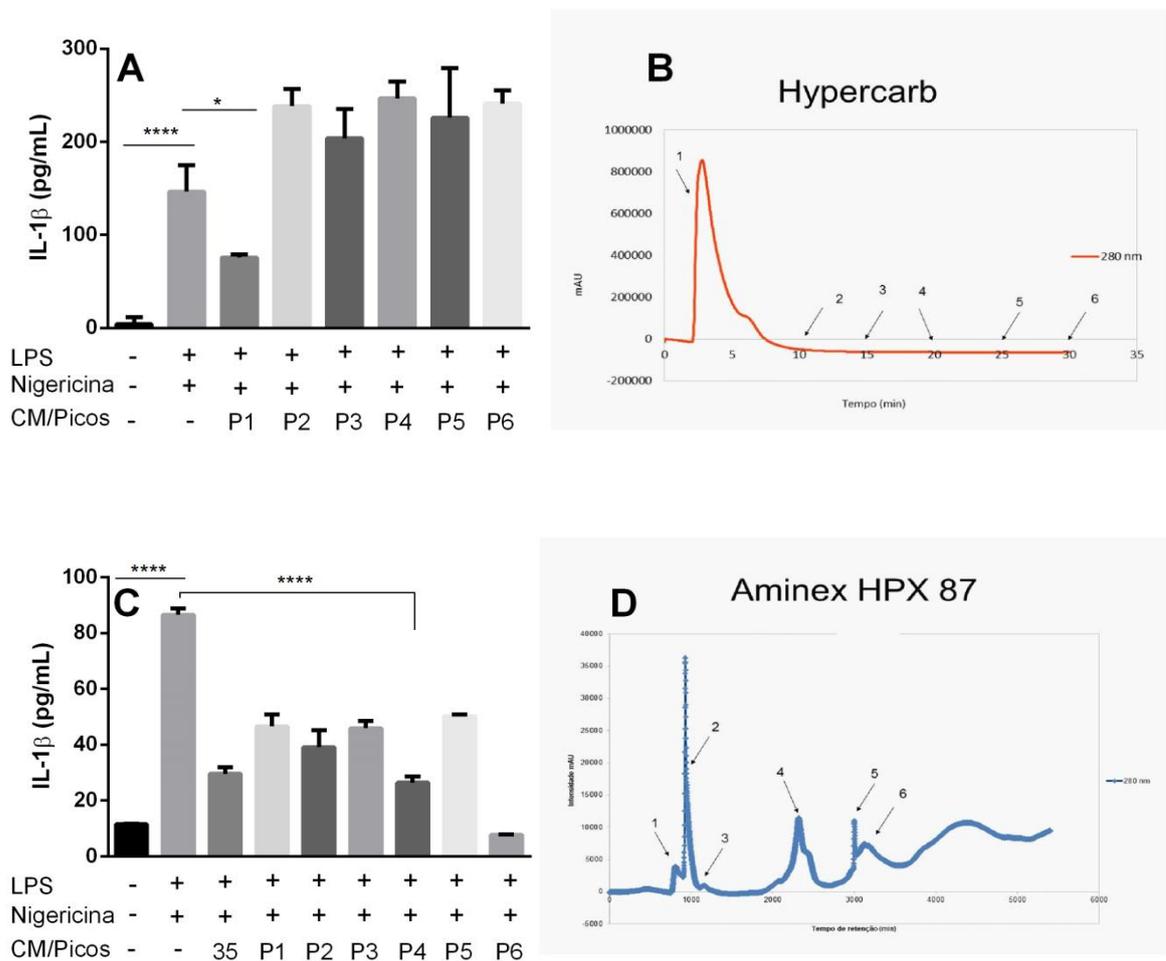


Figura 10 – Isolamento e purificação da molécula responsável pela inibição. (A) Níveis de produção de IL-1 β após ensaio de interação entre BMMs estimulados com LPS + Nigericina e CM35 ou frações obtidas por HPLC na coluna Hypercarb. (2) Cromatograma demonstrativo de corridas realizadas na coluna Hypercarb, com destaque para as frações coletadas e seus respectivos números. (C) Níveis de produção de IL-1 β após ensaio de interação entre BMMs estimulados com LPS + Nigericina e CM35 ou frações obtidas por HPLC na coluna Aminex HPX87. (D) Cromatograma demonstrativo de corridas realizadas na coluna Aminex HPX87, com destaque para as frações coletadas e seus respectivos números.

Porém, ao se tentar melhorar a purificação e se obter frações mais características do que estávamos procurando, encontrou-se certa dificuldade em conseguir uma única fração que apresentasse a ação inibitória esperada. Isto foi verificado pelo fato de que todas as frações obtidas por esta nova corrida de cromatografia apresentavam certa inibição da produção de

IL-1 β , quando comparadas ao meio condicionado de origem (Figura 10C e 10D). Esta segunda purificação foi realizada com uma coluna (Aminex-HPX87 – Bio-Rad) de troca iônica, que apresenta uma alta especificidade para carboidratos polares, excluindo assim moléculas com características mais apolares e separando as moléculas por carga. Esta alta especificidade pode explicar a dificuldade obtida no isolamento de somente uma fração com atividade inibitória, porém novamente reforça a característica polar da molécula (ou moléculas).

Ainda assim, o quarto pico da segunda purificação (P4/Figura 10C) foi o escolhido, por apresentar o caráter inibitório mais próximo quando comparado com o meio condicionado de origem. Esta fração escolhida irá passar por uma análise de espectrometria de massa na Universidade Católica de Brasília, bem como em uma empresa privada no Canadá, que possui um banco de dados específico para carboidratos. Estas análises trarão um aprofundamento maior acerca da caracterização desta fração, desvendando principalmente suas características estruturais.

GXM purificada bruta não apresenta mesmo padrão de inibição da produção de IL-1 β que CM35

Devido as suas já discutidas características imunossupressoras, a GXM foi utilizada em um ensaio de interação a fim de se verificar se possuía o mesmo padrão de inibição já demonstrado pelo CM35. Para tal, GXM total purificada foi obtida e adicionada em meio com BMMs previamente estimulados. O sobrenadante resultante desta cultura foi utilizado para se verificar a produção de IL-1 β .

Como verificado com o CMCAP e o meio mínimo, a GXM total purificada apresentou somente uma inibição parcial na produção de IL-1 β dos BMMs, quando comparada à inibição apresentada pelo CM35 (Figura 11). Desta maneira, é possível inferir com este resultado que a GXM, em sua apresentação bruta e reconstituída, apresenta somente parte da inibição vista no CM35, provavelmente por não apresentar as moléculas inibitórias que são apresentadas no meio condicionado de maneira satisfatória.

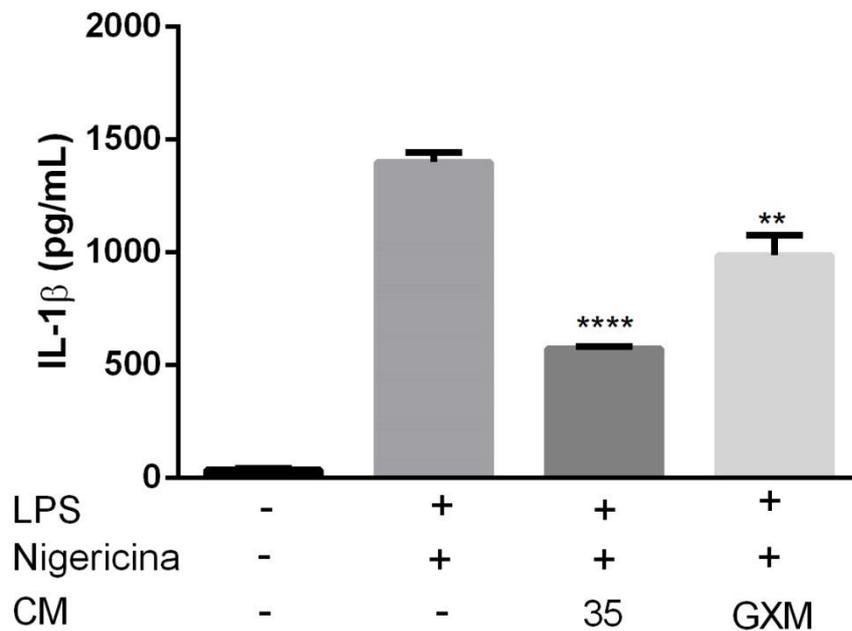


Figura 11 – GXM purificada bruta não apresenta mesmo padrão de inibição da produção de IL-1 β que CM35. Níveis de produção de IL-1 β após ensaio de interação entre BMMs estimulados com LPS + Nigericina e CM35 ou GXM purificada. As estatísticas apresentadas são referentes à comparação com o grupo LPS + Nigericina

Moléculas de GXM presentes no CM35 são internalizadas por macrófagos

Após parcialmente caracterizar a molécula (ou moléculas) responsável pela inibição do sistema inflamassoma, o próximo passo foi o de pesquisar por qual mecanismo de ação esta inibição estava sendo realizada. Neste âmbito, o primeiro ensaio envolveu a verificação da presença de moléculas de GXM no meio condicionado, assim como se estas moléculas eram internalizadas por macrófagos. Para tal, procedeu-se um ensaio de interação entre os meios condicionados e macrófagos por 24 horas, com posterior marcação para GXM e análise em microscopia de fluorescência confocal.

As imagens trouxeram como resultado que o GXM está presente tanto na fração bruta de CM35 quanto no CM35 <1kDa. Além disso, foi possível verificar que as moléculas de GXM, após 24 horas de interação com os macrófagos, eram fagocitadas pelos mesmos, indicado pelos pontos vermelhos internalizados nas imagens (Figuras 12A, 12B, 12C e 12D).

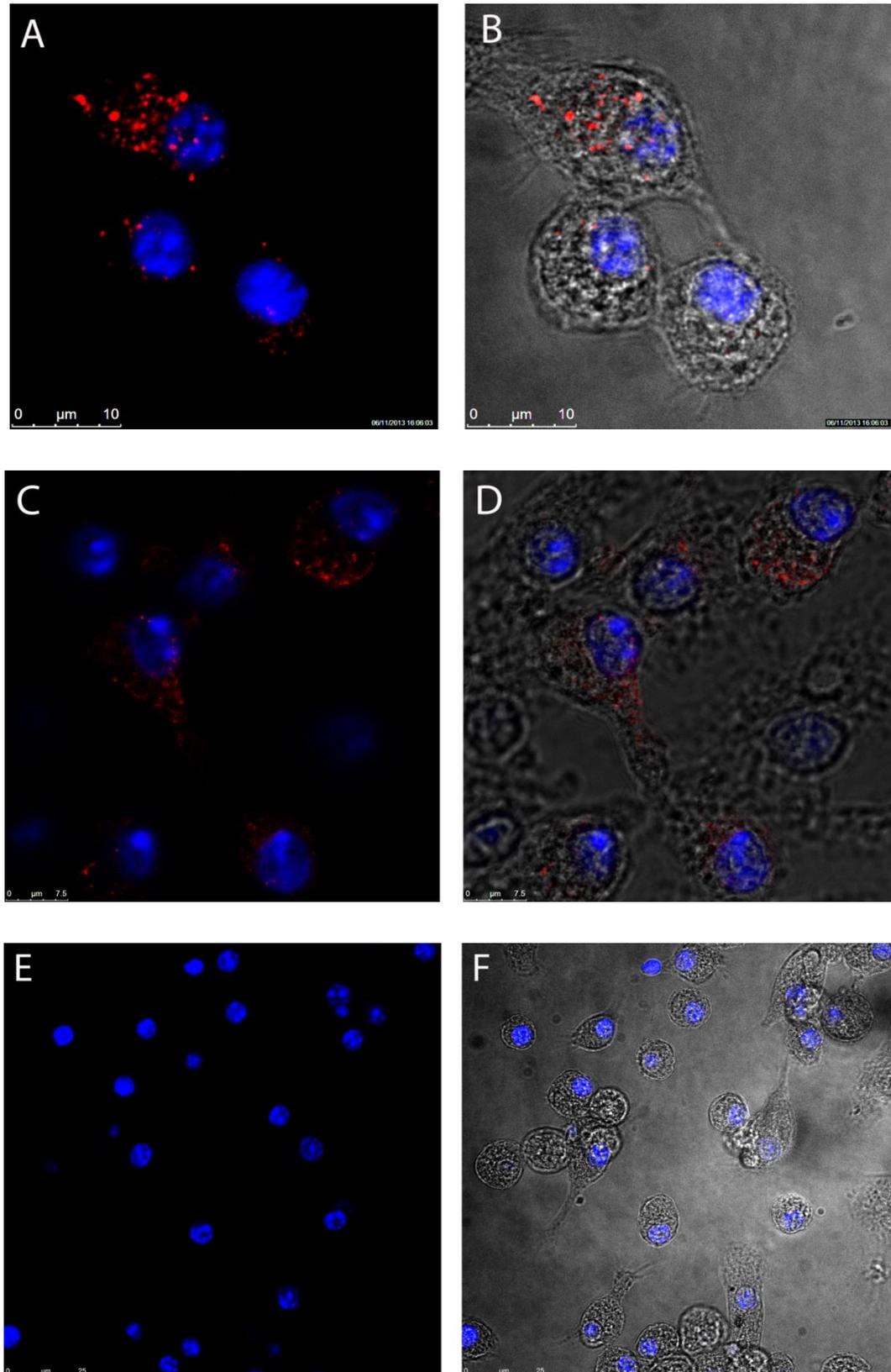


Figura 12 – Moléculas de GXM presentes no CM35 são internalizadas por macrófagos. (A-B) Imagens de microscopia confocal (63X) mostrando interação entre BMMs ativados com LPS e CM35 bruto. (C-D) Imagens de microscopia confocal (63X) mostrando interação entre BMMs ativados com LPS e CM35 <1kDa. (E-F) Imagens de microscopia confocal (63X) mostrando interação entre BMMs ativados com LPS e CMCAP. Imagens apresentadas em campo escuro (A, C e E) ou campo claro (B, D e F), onde a fluorescência azul indica o núcleo dos BMMs e a fluorescência vermelha moléculas de GXM.

Como eram esperadas, as imagens com o CMCAP não apresentaram nenhuma marcação para GXM, indicado pela ausência de cor vermelha (Figuras 12E e 12F). Com este resultado, é possível dizer que, caso a molécula responsável pela inibição do complexo inflamassoma seja o GXM, sua ação poderia ser intracelular, o que é compatível com a hipótese de inibição da via da caspase-1.

Componentes capsulares impedem morte celular de macrófagos ativados por nigericina

É conhecido que a ativação de caspase-1, além de processar e liberar importantes citocinas pró-inflamatórias, também desencadeia uma resposta celular inflamatória intensa, que leva a uma rápida morte programada da célula ativada. Este processo é denominado de piroptose (MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011). Diferentemente de outros tipos de morte celular programada, a piroptose se destaca pela liberação de conteúdo intracelular, entre eles a enzima LDH. Para avaliar se o mecanismo inibitório do CM35 envolve a supressão da atividade da via de ativação de caspase-1, foi realizado um teste de morte celular, aonde foi medida a liberação de LDH após uma ativação intensa de macrófagos por nigericina.

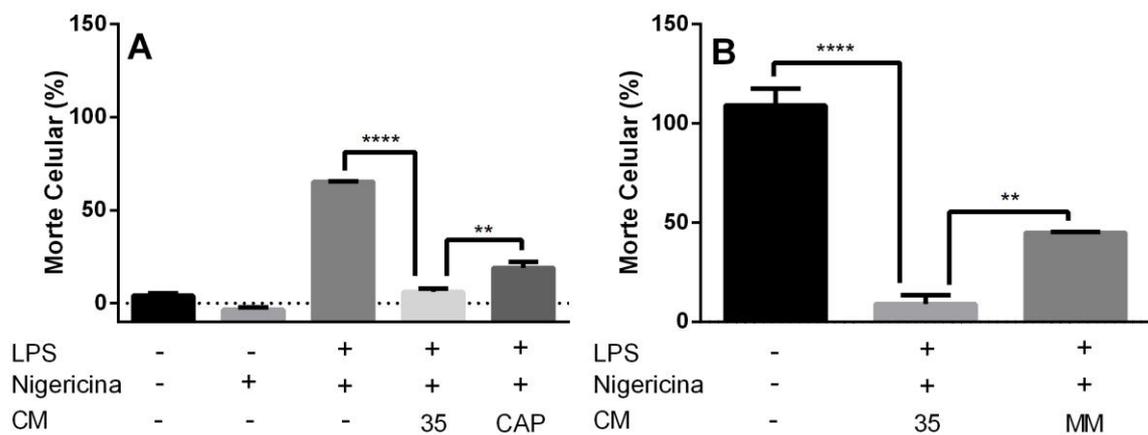


Figura 13 – Componentes capsulares impedem morte celular de macrófagos ativados por nigericina. (A) Porcentagem de morte celular de macrófagos peritoneais ativados com LPS e nigericina (exceto grupo somente com LPS) em interação com CM35 e CMCAP. (B) Porcentagem de morte celular de macrófagos peritoneais ativados com LPS e nigericina em interação com CM35 e meio mínimo. As porcentagens foram obtidas a partir da geração de uma curva padrão de morte celular a partir das absorbâncias medidas no ensaio, com um grupo não tratado representando o valor 0% e um grupo tratado com DMSO representando o valor 100%.

Os resultados demonstraram primeiramente que o protocolo de promoção da morte celular a partir da ativação de macrófagos por nigericina durante 60 minutos funcionou. Com os grupos testados, foi provado que este estímulo, e não o LPS, que era o responsável pela liberação elevada de LDH. Outro resultado obtido foi o de que, na presença de CM35, os macrófagos estimulados com nigericina por 90 minutos apresentavam morte celular significativamente reduzida quando comparados com o controle positivo (Figura 13A e 13B). Novamente este efeito foi atribuído aos componentes capsulares presentes no CM35, visto que a presença de CMCAP (Figura 13A) e de meio mínimo (Figura 13B) no ensaio, apesar de reduzirem a liberação de LDH, não impediam os macrófagos estimulados de morrerem tanto quanto o CM35 impede. Juntamente, estes dados sugerem que componentes capsulares do *C. neoformans* interagem na via da piroptose, agindo em algum momento durante a ativação da caspase-1 e a morte celular.

Componentes capsulares potencializam ativação de caspase-1 por nigericina

Sabendo da interferência dos componentes capsulares durante a piroptose, o próximo passo tomado foi o de analisar a interferência destes componentes diretamente na ativação da enzima caspase-1. Para tal, utilizou-se o peptídeo FLICA, capaz de se ligar irreversivelmente e marcar com fluorescência a porção ativa da caspase-1, ou seja, apenas marca a enzima quando a mesma se encontra ativa. O ensaio foi realizado seguindo os moldes do ensaio de interação, com a utilização de LPS, meios condicionados e nigericina por 40 minutos.

Surpreendentemente, a adição de CM35 provocou um aumento na quantidade de células que apresentavam caspase-1 ativa, ou seja, que apresentavam maior marcação com o FLICA, quando comparado com o controle positivo (Figura 14A, 14B e 14C). Este acréscimo na ativação de caspase-1 não foi observado quando foi adicionado CMCAP (Figura 14B e 14C) ou meio mínimo (Figura 14A e 14C) nos ensaios, novamente creditando a ação observada aos componentes capsulares presentes no CM35. Estes dados sugerem que, apesar da interferência na produção de IL-1 β e na piroptose de macrófagos ativados, esta não se dá pela inibição da ativação de caspase-1.

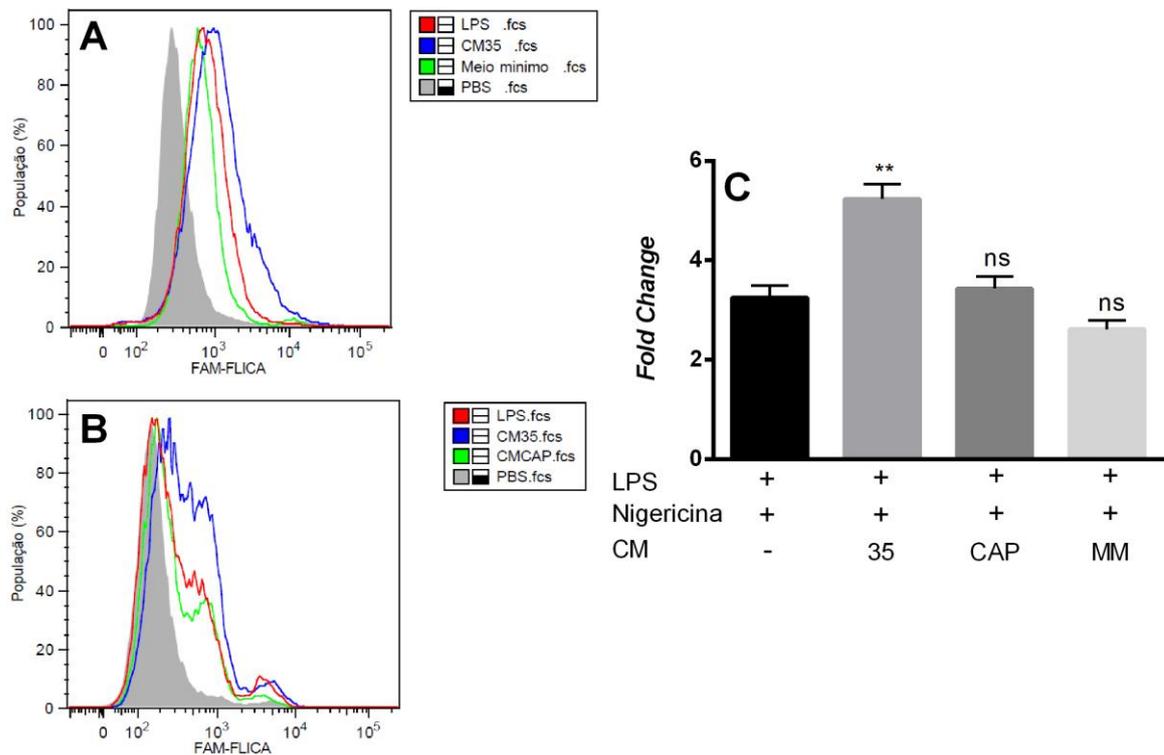


Figura 14 – Componentes capsulares potencializam ativação de caspase-1 por nigericina. (A) Ativação de caspase-1 em BMMs ativados com LPS e nigericina em interação com CM35 e meio mínimo. Histograma de citometria de fluxo de uma leitura representativa de cada grupo, sendo: PBS (cinza sólido), LPS + Nigericina (linha vermelha), CM35 (linha azul) e meio mínimo (linha verde). (B) Ativação de caspase-1 em BMMs ativados com LPS e nigericina em interação com CM35 e CMCAP. Histograma de citometria de fluxo de uma leitura representativa de cada grupo, sendo: PBS (cinza sólido), LPS + Nigericina (linha vermelha), CM35 (linha azul) e CMCAP (linha verde). (C) Ativação de caspase-1 em BMMs ativados com LPS e nigericina em interação com CM35, CMCAP e meio mínimo. Gráfico indica taxa de aumento na ativação da caspase-1 dos grupos quando comparados ao grupo sem tratamento (PBS), calculada a partir da média da porcentagem de células positivas para FAM-FLICA na citometria de fluxo. As estatísticas apresentadas são referentes à comparação com o grupo LPS + Nigericina.

Níveis de Pró- IL-1 β intracelular se encontram aumentados em BMMs em interação com CM35 e CMCAP

Após a verificação que o CM35 promovia a ativação de caspase-1, o próximo passo tomado foi o de avaliar alguma possível interferência na produção ou processamento de pró-IL-1 β . Para tal, o lisado celular obtido após ensaio de interação entre BMMs estimulados ou não e os meios condicionados ou meio mínimo foi utilizado para a dosagem de pró-IL-1 β .

O primeiro resultado obtido e já esperado era o de que somente o estímulo com LPS já é capaz de induzir a produção de pró-IL-1 β , a partir da ativação da via NF- κ B, bem como a adição de nigericina, apesar de reduzir os níveis da citocina, não o faz de maneira significativa

neste ensaio, mantendo níveis consideráveis de pró-IL-1 β no interior da célula. Em relação aos meios condicionados, foi observado que somente a adição de CMCAP em uma cultura de células sem estímulo prévio é capaz de promover o estímulo de pró-IL-1 β , porém não a adição de CM35 (Figura 15). Desta forma, é possível dizer que o CMCAP é capaz de promover a ativação da via NF- κ B, mesmo na ausência de LPS, diferentemente do CM35. A adição de meio mínimo, assim como de CM35, não promoveu nenhum estímulo nas células (Figura 15).

Porém, ao se estimular previamente as células com LPS, os resultados obtidos com a adição dos meios condicionados foram bem modificados, quando comparados ao controle positivo. Os BMMs previamente estimulados que interagiram com o CM35 ou o CMCAP apresentaram um altíssimo nível de pró-IL-1 β no interior de sua célula (Figura 15), indicando uma alta produção desta citocina ou uma inibição em seu processamento. Os BMMs previamente estimulados que interagiram somente com meio mínimo apresentaram níveis comparáveis de pró-IL-1 β ao controle positivo (Figura 15).

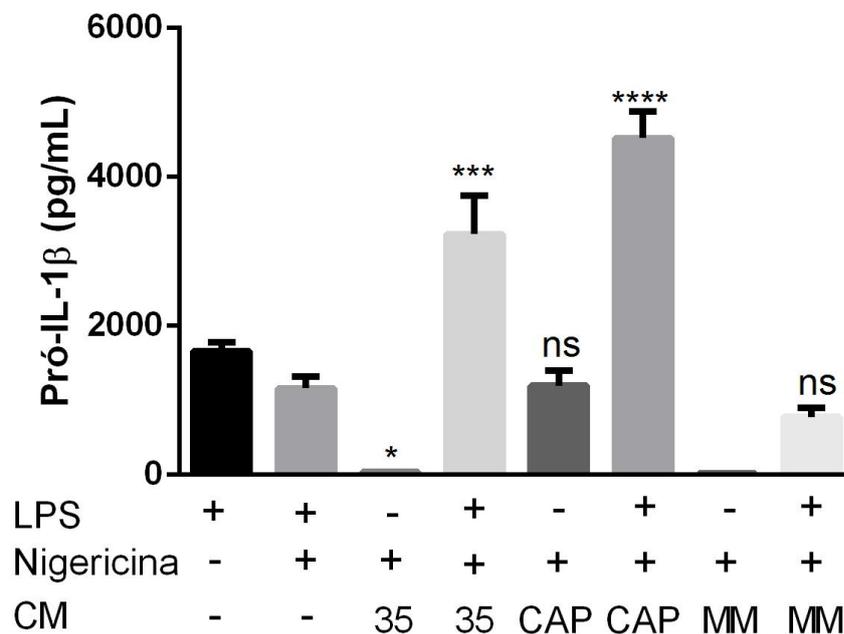


Figura 15 – Níveis de Pró-IL-1 β intracelular se encontram aumentados em BMMs em interação com CM35 e CMCAP. Níveis de produção de pró-IL-1 β após ensaio de interação entre BMMs estimulados ou não com LPS + Nigericina, em interação com CM35, CMCAP ou meio mínimo. As estatísticas apresentadas são referentes à comparação com o grupo LPS + Nigericina

Ação fungicida de macrófagos é prejudicada perante a presença de componentes capsulares

Após as evidências de que os componentes capsulares secretados pelo *C. neoformans* impediam a secreção de uma importante citocina pró-inflamatória e também impediam uma rápida resposta e morte celular, o passo seguinte foi a verificação da influência que estes componentes exerciam durante a interação com macrófagos ativados como nos ensaios anteriores. Para tal, foi verificada a capacidade fungicida destas células, frente à infecção pelo *C. neoformans* e na presença do meio condicionado. Para este ensaio, duas opções de opsonização foram utilizadas: o anticorpo 18B7 e soro murino.

O *C. neoformans* é extensamente conhecido pela sua capacidade de proliferação intracelular em macrófagos e esta capacidade se mostrou exacerbada quando estes macrófagos eram previamente estimulados com LPS, demonstrando uma permissividade maior à proliferação quando comparados com o controle, independente do método de opsonização utilizado (Figura 16A e 16B). Já quando acrescentados os meios condicionados, a via pela qual o fungo é fagocitado passa a ser importante. Utilizando-se o anticorpo 18B7, a adição de CM35 ou CMCAP não alterou a permissividade que já havia sido encontrada em macrófagos previamente ativados com LPS, ou seja, os componentes capsulares não apresentaram nenhuma alteração na resposta do macrófago (Figura 16A). Diferentemente deste primeiro resultado, a utilização de soro murino influenciou na permissividade dos macrófagos frente ao contato com os meios condicionados. Esta permissividade se apresentou ainda mais aumentada quando estes macrófagos previamente estimulados entraram em contato com o CM35, anteriormente à infecção pelo fungo (Figura 16B). Em contraste, a permissividade oferecida pelo tratamento com LPS não foi potencializada com a adição de CMCAP anteriormente à infecção (Figura 16B). O resultado encontrado neste ensaio foi compatível com os achados anteriores, demonstrando que os macrófagos, quando em contato com componentes capsulares, apresentam maior dificuldade na contenção do crescimento intracelular do *C. neoformans*. Porém, estes resultados também demonstram que a via de fagocitose é importante, sendo que o efeito comentado acima só ocorre com a participação do sistema complemento.

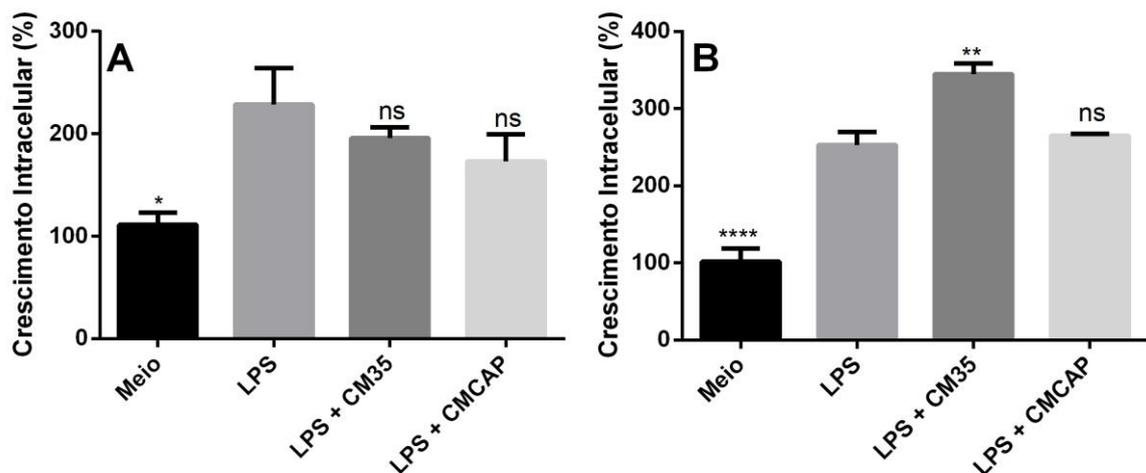


Figura 16 - Ação fungicida de macrófagos é prejudicada perante a presença de componentes capsulares. Taxa de crescimento de *C. neoformans* da cepa H99 no interior de macrófagos peritoneais ativados com LPS e em interação com CM35 e CMCAP. Taxa calculada a partir da diferença do CFU apresentado entre grupo de determinação de capacidade fungicida (24h) e o grupo de determinação de fagocitose (3h) de cada amostra, sendo o valor apresentado em porcentagem de crescimento. As estatísticas apresentadas são referentes à comparação com o grupo LPS.

Secreção de componentes capsulares auxilia o *C. neoformans* a equilibrar pH do meio em que se encontra

Continuando com a pesquisa acerca das vantagens obtidas pelo *C. neoformans* frente às respostas imunes na presença de componentes capsulares, foram realizados ensaios para verificar a resistência da cepa capsular e acapsular do fungo frente à acidificação do meio de cultivo. Para tal, ambas as cepas foram inoculadas em meio mínimo em diferentes faixas de pH.

Os resultados obtidos demonstraram que, quando inserida em um meio com pH baixo (pH 3 e pH 4), a cepa B3501 era capaz de elevar significativamente o pH do meio, em questão de 48 horas após o cultivo, aproximando-os do meio de cultura com pH 5 (Figura 17A). Interessantemente, os meios de cultura com pH 5 e pH 6 não sofreram alterações drásticas, mantendo níveis de pH próximos do inicial até o final do teste. Porém, estes resultados não se repetiram com a cepa CAP67. Ao longo de todo o período do ensaio, os meios de cultivo mantiveram aproximadamente o mesmo pH apresentado no início do teste (Figura 17B). Como controle das mudanças de pH apresentadas, os meios de cultivo com pH 3 e pH 4 foram deixados, sem crescimento fúngico e em situação de cultivo, durante o período de 168 horas, não sendo verificada nenhuma mudança significativa de pH (Figura 17C). Deste modo foi possível alegar a mudança de pH aos componentes fúngicos secretados, e não à

degradação de componentes do meio. Pelo fato dessas mudanças de pH não terem sido observadas nos ensaios com a cepa CAP67, infere-se que elas sejam provocadas por componentes capsulares, creditando-se mais uma ação a esses componentes e possivelmente uma das razões para o resultado apresentado no ensaio de fagocitose e morte do *C. neoformans*.

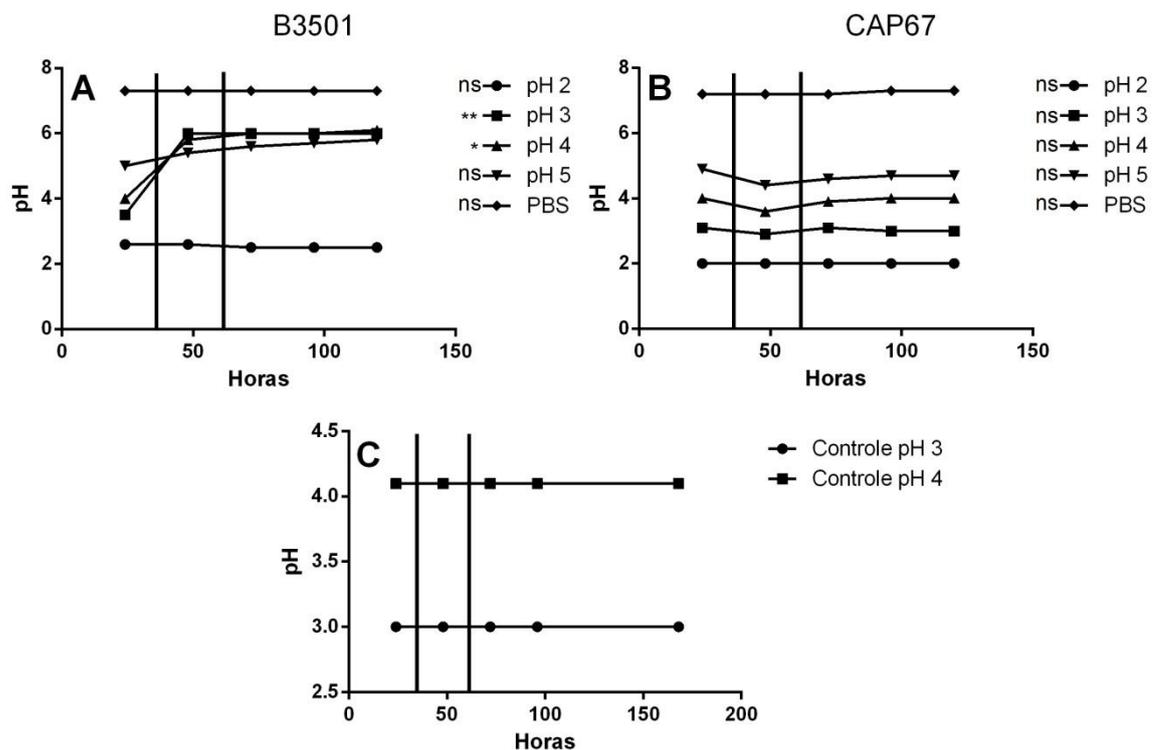


Figura 17 - Secreção de componentes capsulares auxilia o *C. neoformans* a equilibrar pH do meio em que se encontra. (A) pH apresentado por meios mínimos em diferentes faixas iniciais de pH, nos quais foi inoculada a cepa B3501 de *C. neoformans*. (B) pH apresentado por meios mínimos em diferentes faixas iniciais de pH, nos quais foi inoculada a cepa CAP67 de *C. neoformans*. (C) pH apresentado por meios mínimos nas faixas de pH 3 e 4, sem inóculo e em situação de cultivo por 168 horas. As leituras de pH foram realizadas de 24 em 24 horas, utilizando-se somente o sobrenadante dos meios de cultura inoculados, sendo descartadas as leveduras das alíquotas. As estatísticas apresentadas são referentes à comparação entre a primeira e a última medição de pH realizada em cada grupo.

Microambiente derivado de ativação do inflamassoma auxilia macrófagos não estimulados no combate à infecção por *C. neoformans*

Para finalizar os estudos sobre a importância da secreção dos componentes capsulares no combate do *C. neoformans* contra as respostas de macrófagos, foi realizado um ensaio de

interação entre macrófagos previamente ativados pelas cepas fúngicas e macrófagos que receberam os componentes secretados na primeira interação. O intuito deste ensaio foi verificar as consequências causadas pela interferência que os componentes capsulares do fungo promovem na montagem de resposta dos macrófagos. Para tal, macrófagos foram infectados com as cepas capsulares e acapsulares de *C. neoformans*, enquanto o aparato “Transwell” foi responsável por compartilhar o meio de cultura e promover a interação entre macrófagos ativados e não ativados. Os grupos experimentais foram nomeados de acordo com a primeira ativação e interação, ou seja, o estímulo ou não com LPS e a cepa com a qual a primeira cultura de macrófagos foi infectada. A segunda cultura de macrófagos recebeu o mesmo tratamento em todos os grupos experimentais, a infecção com a cepa H99.

Como resultados, observamos que o grupo que compartilhou o meio de cultivo com os macrófagos que somente foram infectados pela cepa CAP67 tiveram a melhor resposta contra a infecção pelo *C. neoformans*. Isto foi evidenciado pelo fato que, após 24 horas de infecção com a cepa H99, os macrófagos que interagiram com o grupo CAP67 apresentaram um número menor de leveduras intracelulares do que os macrófagos que interagiram com o grupo B3501 (Figura 18). Este fato sugere um maior controle do crescimento intracelular de *C. neoformans* nos macrófagos do primeiro grupo, quando comparados ao segundo. Este resultado corrobora com os anteriores, demonstrando que, ao se utilizar uma cepa acapsular de *C. neoformans* que não inibe o inflamassoma e que permite a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófago, há um auxílio no combate ao fungo por macrófagos não estimulados previamente. Em contraste, a ativação (ou falta dela) promovida por uma cepa capsular de *C. neoformans*, na qual há uma inibição do inflamassoma e da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, leva a uma dificuldade do macrófago não estimulado em combater o fungo. Interessantemente, como visto anteriormente no ensaio de fagocitose e morte, o estímulo prévio com LPS não auxiliou os macrófagos no grupo infectado com B3501 e acabou piorando o combate ao fungo no grupo infectado com CAP67. Este fator pode ser explicado parcialmente pelo fato que o LPS, por apresentar um tamanho pequeno, provavelmente ativou o grupo de macrófagos supostamente não estimulados previamente à infecção, trazendo os resultados já observados anteriormente de maior permissividade ao crescimento intracelular do *C. neoformans*.

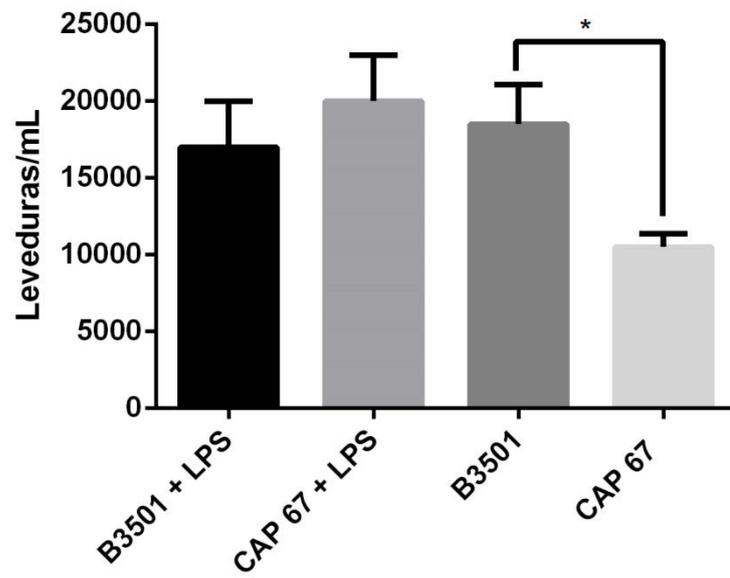


Figura 18 - Microambiente derivado de ativação do inflamassoma auxilia macrófagos não estimulados no combate à infecção por *C. neoformans*. Quantidade de leveduras presentes após 24 horas de infecção no interior de macrófagos peritoneais que compartilhavam o mesmo meio de cultivo com macrófagos peritoneais ativados ou não com LPS, infectados com as cepas B3501 e CAP67 de *C. neoformans*.

DISCUSSÃO

Já é conhecido há bastante tempo o papel primordial que a secreção de vesículas extracelulares apresenta na biologia de microrganismos unicelulares, principalmente no âmbito de crescimento celular, metabolismo e excreções. Quanto aos fungos, existiam hipóteses de décadas atrás de que, como em outros microrganismos, as vesículas poderiam fazer parte de mecanismos essenciais para a biologia da célula. Porém, devido à característica peculiar de possuírem uma robusta e complexa parede celular, acreditava-se que as vesículas eram incapazes de serem secretadas. Devido a este pensamento, a importância ou até mesmo existência destas vesículas em células fúngicas nunca havia sido relatada, até alguns anos atrás (WOLF; CASADEVALL, 2014).

O primeiro passo para o estudo destas vesículas foi dado em 2007, quando Rodrigues e colaboradores demonstraram que o *C. neoformans* produz vesículas extracelulares durante o seu crescimento *in vitro* e também durante infecção animal, graças a observações realizadas por microscopia eletrônica. Este trabalho também foi essencial para dar início as discussões sobre as prováveis funções destas vesículas neste fungo, elucidando fatores como a necessidade da viabilidade celular para a produção de vesículas e apontando componentes presentes nestas vesículas, como lipídeos importantes como a glucosilceramida e principalmente moléculas de GXM (RODRIGUES et al., 2007). No ano seguinte, o mesmo grupo realizou novos estudos sobre a composição destas vesículas extracelulares, relatando a presença de diversas proteínas associadas à virulência, algumas inclusive com a presença de atividade, como lacase e urease (RODRIGUES et al., 2008). Desde então, pelo fato de não carregarem somente moléculas estruturais como também típicos fatores de virulência, as vesículas extracelulares secretadas pelos fungos são consideradas “bolsões de virulência”, não somente em *C. neoformans* como também em *C. albicans*, *H. capsulatum*, entre outros (DEATHERAGEA; COOKSONA, 2012).

Tendo em vista estes estudos iniciais recentes, a secreção de vesículas extracelulares e o impacto das mesmas durante a infecção animal é um tema ao mesmo tempo muito estudado e com várias lacunas em suas hipóteses. Outro importante fator a ser considerado é o fato de que ainda existem poucos estudos referentes ao papel das vesículas em si e somente dos componentes que são carregados pelas mesmas. Neste trabalho, demonstramos ações de extrema importância que componentes capsulares de *C. neoformans* exercem sobre

macrófagos, que são considerados uma linha de defesa essencial em diversas infecções fúngicas. A interferência na resposta imune ótima de macrófagos por estes componentes adiciona mais um fator a ser considerado na interação entre estas células e o *C. neoformans*.

A inibição de produtos do inflamassoma por componentes capsulares do *C. neoformans* foi recentemente demonstrada em estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo que o trabalho em questão atribuiu a responsabilidade deste efeito à GXM presente no fungo (GUO et al., 2014). Desta maneira, apesar de trazer o mesmo efeito observado pelo trabalho aqui apresentado, o primeiro trouxe importância para a presença de GXM na cápsula e não trouxe a distinção da ativação de primeiro ou segundo sinal no inflamassoma, desta maneira não demonstrando se a inibição do inflamassoma ocorreu na via do Nf- κ B ou no próprio complexo multiprotéico. Devido ao já citado papel da cápsula e mais especificamente da GXM de inibir processos associados à via do Nf- κ B, incluindo maturação e fagocitose, é plausível associar ao menos parte da inibição da produção de IL-1 β observada no primeiro estudo à inibição de primeiro sinal. Em contraste, nosso trabalho utilizou somente os componentes secretados pelo fungo, não levando em consideração as moléculas presentes na cápsula. Também foi diferente a avaliação referente à inibição da produção de IL-1 β , sendo que foi fornecido o primeiro e o segundo sinal para a ativação do inflamassoma pelos macrófagos, eliminando assim a possibilidade da célula fúngica ter de fornecer estes sinais e não o fazer por conta de interferências da sua cápsula. Finalmente, o modelo de ensaio de interação proposto neste trabalho enfatiza a provável interação dos componentes capsulares diretamente no complexo inflamassoma, visto pelo fato de que estes componentes entram em contato com macrófagos previamente ativados, ou seja, com a via Nf- κ B plenamente ativa. Corroborando com esta hipótese, os primeiros resultados obtidos demonstraram que o modelo de ensaio proposto não interferia na produção de TNF- α , citocina dependente da ativação de Nf- κ B, porém não do inflamassoma.

Tendo em vista a já relatada complexidade que os componentes secretados apresentam, a caracterização das moléculas se mostrou um excelente passo a ser dado, com o intuito de se excluir uma grande parcela de moléculas que não participavam da inibição observada. A exclusão de proteínas, lipídeos caracteristicamente apolares, componentes sensíveis ao calor e moléculas de alta massa molecular nos deixou com uma molécula pequena (< 1kDa) e polar, com grandes possibilidades de ser um carboidrato e menor possibilidade de ser um lipídeo anfipático ou até mesmo uma molécula combinada. Experimentos futuros envolvendo técnicas otimizadas de purificação e leituras em

espectrometria de massa com comparações dos resultados em bancos de dados privados provavelmente nos trarão a caracterização total desta molécula, facilitando assim os estudos subsequentes.

A escolha de pesquisar a GXM como possível molécula inibitória presente no meio condicionado capsular foi suportada por diversos fatores como: (1) a molécula estar presente em vesículas extracelulares e secreções (RODRIGUES et al., 2007); (2) a molécula já ter sido descrita em trabalho anterior com função semelhante (GUO et al., 2014); (3) a molécula apresentar diversas modulações em células imunes, grande parte imunossupressoras (VECCHIARELLI et al., 2013); (4) a molécula ser um polissacarídeo com vários resíduos polares e que, apesar de possuir usualmente uma massa de até 1700 kDa (ZARAGOZA et al., 2009), pode ser encontrada com as mesmas características estruturais em massas bem menores, de até 1kDa (ALBUQUERQUE et al., 2014); (5) a molécula ter a característica de ser internalizada pelos macrófagos, podendo interagir com vias intracelulares, como o inflamassoma (CHANG et al., 2006).

Um dos fatores mais interessantes observados durante os ensaios de caracterização da molécula inibitória foi a capacidade de somente moléculas menores que 1kDa apresentarem um padrão inibitório, principalmente se levarmos em consideração o fato que a GXM é encontrada com sua estrutura praticamente inalterada em diversas massas moleculares, sendo considerada uma molécula heterodispersa. A resposta para esta disparidade pode ser encontrada em um trabalho publicado no ano passado, que traz em foco as diferentes funções da GXM, de acordo com a faixa de massa molecular em que se encontra (ALBUQUERQUE et al., 2014). Entre as diferenças apresentadas estão peculiaridades na deposição de GXM sobre a parede celular e na formação da cápsula, porém a mais interessante diz respeito à modulação diferencial de macrófagos *in vitro* e de camundongos *in vivo*, afetando a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Este resultado está de acordo com o resultado encontrado no ensaio com diferentes frações de massa molecular de meio condicionado, demonstrando que é possível somente uma fração ter apresentado a inibição do inflamassoma, caso a molécula responsável seja a GXM.

O ensaio de interação com GXM purificada era um passo óbvio a ser tomado, já que a hipótese dominante no momento era a de que esta molécula era a responsável pelas ações verificadas. Apesar do resultado inesperado obtido neste ensaio, a hipótese da GXM ainda assim ser a molécula inibitória não foi descartada. Como dito anteriormente, GXM de

diferentes massas moleculares trazem diferentes funções, e apesar desta GXM purificada ter sido obtida através de uma fração bruta, sua origem é da cápsula do fungo. Além disso, vários processos químicos são realizados para a obtenção e purificação desta GXM (HOUPY et al., 1994). Logo, não é possível avaliar se existe GXM menor que um 1kDa em quantidades significativas nesta purificação. Para uma análise mais precisa das ações da GXM menor que 1kDa, entraremos em contato com o laboratório do professor doutor Márcio Rodrigues (UFRJ), que é especializado em isolamento de vesículas e GXM, a fim de tentarmos uma purificação de GXM a partir do CM35 menor que 1kDa.

A característica polar e diminuta desta molécula inicialmente trouxe dúvidas em relação à sua capacidade de penetrar a membrana celular de macrófagos e interagir com o complexo inflamassoma, sendo mais provável a sua internalização por estas células, por meio de fagocitose. Como dito anteriormente, macrófagos apresentam a capacidade de fagocitar moléculas de GXM que se encontram aderidas a sua membrana (CHANG et al., 2006), sendo que esta ação é verificada após aproximadamente uma hora de interação. Outro dado importante abordado foi o de que o estímulo prévio destes macrófagos com LPS não alterava a fagocitose da GXM, dado importante para nosso ensaio. Já era de nosso conhecimento que existiam moléculas de GXM em frações menores que 1kDa de meio condicionado da cepa B3501, graças à metodologia de ELISA de captura para GXM (dados não mostrados), porém não existiam informações acerca de concentração e da internalização desta GXM em um ensaio de interação com macrófagos. Neste âmbito, os resultados da microscopia confocal mostrados no trabalho trouxeram duas informações importantes: (1) a presença de uma concentração considerável de GXM na fração menor que 1kDa; (2) a ligação à membrana celular após 1 hora (dados não mostrados) e a internalização da GXM presente nesta fração por macrófagos após 24 horas. Estes resultados, além de apresentarem o mesmo padrão de interação já descrito entre GXM e macrófagos, dão base para a hipótese de a GXM menor que 1kDa ser internalizada.

Durante este trabalho, o resultado mais surpreendente obtido foi o proveniente do ensaio de ativação de caspase-1. Após ser verificada a inibição na produção de IL-1 β e também uma prevenção na indução de piroptose (a partir do ensaio de liberação de LDH), que são produtos dependentes da ativação do inflamassoma, a hipótese mais provável era de que houvesse alguma interferência na ativação ou sinalização do segundo estímulo, promovido pela nigericina. Para comprovar esta hipótese, a análise da ativação de caspase-1 era a melhor opção, por ser a última enzima a ser ativada no complexo inflamassoma, sendo assim possível

a avaliação deste passo da via, bem como dos passos anteriores. Desta maneira, a verificação de atividade na caspase-1 com a presença de CM35, inclusive com um aumento no número de células que expressavam esta enzima ativa, veio de encontro com os achados anteriores, pois indica que a ativação do complexo inflamassoma como um todo não está sendo afetada pelo CM35.

Diante disso, foi procedida a análise da dosagem de pró-IL-1 β no interior das células, para verificar se a produção desta pré-proteína não estava sendo inibida, com consequente inibição da secreção de IL-1 β madura. Esta inibição não era esperada, pois já havia sido definido que a via do NF- κ B não era alterada pelo CM35 (como visto na dosagem de TNF- α). Surpreendentemente encontramos como resultado um aumento considerável desta citocina intracelular, tanto quando os BMMs estimulados entravam em contato com o CM35 quanto com o CMCAP. Como visto neste resultado, somente o CMCAP é capaz de estimular a produção de pró-IL-1 β , agindo como um estímulo da via do NF- κ B por si só. É conhecido que vesículas secretadas pela cepa CAP67 são capazes de modular macrófagos, inclusive com o aumento na produção de TNF- α (OLIVEIRA et. al., 2010), logo não é surpresa encontrar modulação semelhante nos componentes secretados por esta cepa. Desta forma, visto que em todos os resultados anteriores os grupos tratados com CMCAP não se comportaram do mesmo modo que os grupos tratados com CM35, atribuímos o excesso de pró-IL-1 β intracelular verificado neste grupo a uma ativação sinérgica do NF- κ B pelo CMCAP e pelo LPS, ao invés de alguma interferência no processamento desta citocina. Existem vários relatos de uma produção aumentada de citocinas frente a dois estímulos ao NF- κ B, dando base para a afirmação supracitada (GAO et. al., 2001; MIN et. al., 2012). Enquanto isso, o CM35 isoladamente não atua como estímulo para a produção de citocinas por BMMs, logo o acréscimo na concentração de pró-IL-1 β intracelular provavelmente é dependente de alguma interferência em seu processamento.

Está bem elucidada na literatura que a secreção de IL-1 β a partir da ativação do NLRP3 e a piroptose são eventos totalmente dependentes da ativação da enzima caspase-1. Logo, a ativação desta enzima e a ausência dos eventos supracitados levam à necessidade de se pensar em mecanismos posteriores a ativação da caspase-1 e responsáveis pela efetivação dos mesmos. Neste contexto, discutir sobre a secreção não convencional das citocinas processadas pela caspase-1 se torna necessário, na busca por possíveis mecanismos de ação. Diferentemente de citocinas que possuem um mecanismo convencional de secreção celular, como o TNF- α (STANLEY; LACY, 2010), até hoje não se tem definido qual o mecanismo de

secreção utilizado para as citocinas processadas pelo inflamassoma, em especial IL-1 β e IL-18, sendo esta secreção denominada de secreção não convencional de citocinas (KELLER et al., 2008; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011).

Existem várias hipóteses propostas como mecanismos desta secreção não convencional de citocinas, estando entre elas: (1) a secreção destas citocinas por poros de membrana formados pela ativação da caspase-1; (2) a secreção destas citocinas a partir da formação de microvesículas com conteúdo de membrana celular, abrigando estas citocinas; (3) a secreção destas citocinas a partir da formação de lisossomos contendo as citocinas, com a exocitose e liberação das mesmas no meio extracelular (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011). A formação de poros de membrana a partir da ativação de caspase-1 também já foi descrita como sendo essencial para o processo de piroptose (FINK; COOKSON, 2006; REISETTER et. al., 2011). Alguns pontos entre estas teorias estão em acordo, como o fato de a lise celular e a liberação destas citocinas serem eventos independentes (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009; LE FEUVRE et. al., 2002). Em contraste, outros estudos vêm surgindo e apontando não compatibilidade com as hipóteses apresentadas, como um realizado por Bergsbaken e colaboradores, que demonstrou a partir de ensaios de influxo de cálcio que o impedimento da exocitose de lisossomos não impactava na secreção de IL-18 e IL-1 β (BERGSBAKEN et al., 2011). De qualquer modo, devido ao conhecimento ainda deficiente no que se diz respeito aos requerimentos necessários e aos mecanismos envolvidos na secreção não convencional de citocinas e na piroptose, não é raro encontrar até hoje autores que defendem hipóteses em que estes eventos são interdependentes (TAIT; ICHIM; GREEN, 2014).

Tendo em vista esta inter-relação entre piroptose e a secreção de IL-1 β e também os resultados extremamente parecidos nos ensaios apresentados neste trabalho, a hipótese sugerida para a inibição destes eventos envolve a interferência de um mecanismo que é compartilhado por ambos: a formação de poros dependentes da ativação de caspase-1. Já é bem difundida na literatura a existência de substâncias que, mesmo com a ativação da caspase-1, são capazes de inibir a formação de poros, conhecidamente impedindo o intumescimento, lise e morte celular que ocorrem durante a piroptose. Uma destas substâncias é a glicina, molécula considerada citoprotetora que é utilizada em ensaios aonde se busca a inibição da formação de poros e a inibição não específica do influxo de íons, com consequente inibição da piroptose (FINK; COOKSON, 2006; REISETTER et. al., 2011). A glicina é um dos componentes utilizados para o preparo do meio mínimo utilizado no

trabalho. Mesmo não estando presente nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios de inibição de piroptose (usualmente se utiliza 5mM nestes ensaios, enquanto nossos ensaios diluíam a glicina para uma concentração de 1,3mM), a presença da glicina pode explicar a inibição parcial na produção de IL-1 β e na piroptose que foram verificadas com a adição de meio mínimo ou de CMCAP nas culturas. Por conta de a glicina ser um aminoácido com massa molecular extremamente diminuta e resistente a processos como a liofilização (MEYER; NAYAR; MANNING, 2009), acredita-se na possibilidade desta molécula também estar presente no CMCAP e no CM35, em concentrações possivelmente parecidas à encontrada no meio mínimo original, o que explicaria as inibições parciais em igual amplitude verificadas nos grupos em interação com CMCAP e com o meio mínimo.

A interação com CM35 resultou em inibições mais acentuadas tanto na produção de IL-1 β quanto na piroptose, quando comparadas aos grupos supracitados. Assim como a inibição que provavelmente foi desempenhada pela glicina, é possível que componentes capsulares presentes no CM35 sejam capazes de, diretamente ou indiretamente, promover uma inibição na formação destes poros ou na sua funcionalidade, evitando o influxo de íons (essencial para a piroptose) e a possível secreção de citocinas por estes poros. Um dado importantíssimo para a elaboração desta hipótese foi a documentação de que, quando fagocitado por macrófagos, o *C. neoformans* é capaz de escapar destes fagócitos a partir de um fenômeno denominado extrusão. A extrusão, apesar de ser totalmente dependente do *C. neoformans*, ocorre a partir de uma série de fatores determinados tanto pelo fungo quanto pelo hospedeiro, sendo que existem fortes indícios que um destes fatores é a inibição funcional do citoesqueleto do hospedeiro, a partir da inibição da polimerização de actina (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006). Também já foi relatado que a permeabilização fagossomal, que leva a extrusão, é acompanhada pela secreção de vesículas do fungo, gerando um acúmulo de GXM detectável no citoplasma do macrófago infectado (TUCKER; CASADEVALL, 2002). Embora não existam relatos que a inibição da actina durante a extrusão seja promovida pelo acúmulo de GXM na célula, é extremamente tentador acreditar que esta inibição é promovida pela GXM, devido à proximidade dos eventos. Estas informações são relevantes se levarmos em conta que os poros de membrana dependentes de caspase-1 necessitam da polimerização de actina para serem gerados (FINK; COOKSON, 2006). Desta maneira, a presença da GXM do CM35 no interior destes macrófagos poderia interagir com a polimerização de actina, impedindo a formação de poros, da mesma maneira que esta molécula pode estar interagindo com a actina durante a infecção, favorecendo o fenômeno de extrusão.

Para a confirmação desta hipótese, novos ensaios devem ser realizados para a verificação deste evento. A padronização de ensaios de microscopia com o intuito de visualizar a formação destes poros, a detecção de caspase-1 ativa secretada por “western blot” e a marcação de IL-1 β intracelular e leitura em citometria de fluxo ou microscopia confocal são ensaios interessantes, que seriam capazes de nos fornecer evidências para sustentar a hipótese proposta. Uma medida a ser tomada que tornará todo o trabalho futuro mais eficaz é a substituição do meio mínimo por algum outro meio quimicamente definido, capaz de promover a liberação de vesículas pelo *C. neoformans* e que não contenha glicina em sua formulação. Existem trabalhos publicados que utilizam meios para o crescimento do *C. neoformans* sem a presença de glicina (CHERNIAK et. al., 1980; MONARI et. al., 2005b), porém são estudos voltados para a análise somente de GXM presente na cápsula, logo é necessário verificar se a obtenção dos meios condicionados a partir tais meios de cultura atende ao objetivo do nosso estudo, que é a análise das moléculas secretadas. De qualquer modo, a presença de glicina não invalida os resultados encontrados neste trabalho e, na falta de algum meio de cultura alternativo que sirva aos nossos propósitos, a futura purificação destas moléculas, como comentado anteriormente, trará uma maior exatidão para estes ensaios.

Apesar da hipótese da interação da GXM com a formação de poros dependentes da ativação de caspase-1 ser uma possível explicação para os eventos de inibição verificados nos ensaios, ela não é suficiente para explicar o acúmulo de pró-IL-1 β verificado no interior dos macrófagos que interagem com o CM35. Isso se deve ao fato de que a inibição na formação de poros não explica por qual motivo não está havendo o processamento da pró-IL-1 β , mesmo na presença de caspase-1 ativas. Tendo em vista que não há nenhuma inibição aparente na produção desta citocina, a hipótese formulada envolve o bloqueio do processamento da pró-IL-1 β , independentemente da ativação da caspase-1. Relatos sobre o bloqueio deste processamento, sem alterações na produção de pró-IL-1 β e na ativação de caspase-1 existem na literatura, em estudos sobre a febre familiar do mediterrâneo. Esta patologia ocorre devido a mutações em uma proteína denominada pirina e envolve surtos repentinos e recorrentes de febre e inflamações focais, principalmente nas articulações. A pirina contém um domínio de homologia com o domínio PYD, que é também apresentado em proteínas do complexo inflamassoma, como o NLRP3, o ASC e a própria caspase-1, sendo que a pirina é capaz de interagir com todas estas proteínas (PAPIN et. al., 2007). A pirina é expressa em diversos tipos celulares desde monócitos e macrófagos até fibroblastos, sendo que todos os tipos

celulares que foram utilizados em estudos para esta proteína expressam o complexo inflamassoma. Apesar dos diversos estudos, aonde se desvendaram questões como requerimentos para a indução na produção de pirina e a sua localização no interior das células (principalmente citoplasmática e nuclear) (DIAZ et. al., 2004; CENTOLA et. al., 2000), ainda não se tem descrito qual a função fisiológica exata desta proteína nestas células (XU et. al., 2014). Sendo assim, não se sabe se as mutações apresentadas na febre familiar do mediterrâneo são de perda ou de ganho de função, existindo estudos contraditórios que suportam as duas teorias, ou seja, alguns estudos demonstram que a pirina aumenta processos inflamatórios mediados pelo inflamassoma (SESHADRI et. al., 2007) enquanto outros estudos demonstram que a pirina inibe estes mesmos processos (CHAE et. al., 2006; HESKER et. al., 2012). Diferenças nos tipos de célula utilizados e na origem das mesmas podem explicar os diferentes resultados encontrados.

Dentro destes estudos, um se destaca por trazer informações relevantes para este trabalho. Papin e colaboradores, 2007, assim como outros grupos, demonstraram que a pirina possuía um papel de inibição ao se ligar ao complexo inflamassoma. Mais do que isso, este estudo demonstrou que dependendo do domínio de interação, a pirina era capaz de interagir com as principais moléculas do inflamassoma, assim como também era capaz de interagir com a molécula de pró-IL-1 β . Entre as diversas interações demonstradas, uma delas envolve a ligação da pirina com a pró-IL-1 β e a caspase-1, através de interação inicial com a citocina, formando um complexo tri molecular sem a inibição do sítio ativo da caspase-1. Nesta interação, a caspase-1 ativa é capaz de ser detectada, assim como um depósito acentuado de pró-IL-1 β e uma redução na secreção de IL-1 β , sendo estes dados muito próximos dos encontrados neste trabalho. É pouco provável se imaginar que um carboidrato (GXM) tenha a mesma capacidade de ligação às proteínas do inflamassoma e inibição que uma proteína (pirina), porém sabe-se que a pirina é regulada mediante sinais inflamatórios, entre eles os promovidos por LPS (DIAZ et. al., 2004; CENTOLA et. al., 2000), o que nos permite a hipótese de alguma interação entre a GXM e a expressão de pirina em células previamente estimuladas. Tal tipo de interação seria extremamente peculiar e difícil de ser encontrada, principalmente devido ao pouco conhecimento da biologia desta proteína, porém um ensaio de imunoprecipitação entre a pró-IL-1 β e a caspase-1 já poderia trazer indícios de uma ligação atípica entre essas moléculas, juntamente com os dados de ativação de caspase-1 e inibição na produção de IL-1 β .

Outro fator que apoia estas hipóteses apresentadas acima é a presença de dados na literatura referentes à ativação da caspase-1 e à interação com a GXM em macrófagos, no que tange as enzimas das vias glicolíticas. É conhecido que a enzima caspase-1 é capaz de clivar uma série de substratos, aproximadamente 121 (DENES; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2012). Dentre estes inúmeros substratos, destacam-se várias enzimas associadas à via glicolítica (SHAO et. al., 2007). Interessantemente, existem relatos na literatura de que a GXM é capaz de inibir o fluxo de glicose em macrófagos, a partir da inibição de uma enzima da via glicolítica, inclusive promovendo sua morte (GRECHI et. al., 2011). Apesar de ter sido associado um efeito direto da GXM nesta enzima, este não foi totalmente elucidado, abrindo espaço para outras interpretações. O fato de a interação com a GXM reduzir o fluxo de glicose ao mesmo tempo em que se é conhecido que a enzima caspase-1 quando ativa é capaz de clivar enzimas que também são responsáveis por este fluxo nos traz a hipótese de que dificilmente a GXM interagiria na inibição da ativação desta caspase-1, como foi observado neste trabalho.

Apesar de parecer improvável que a GXM atue em dois pontos de uma mesma via, fornecendo modulações com mecanismos diferentes, é preciso lembrar que essa é uma das principais características desta molécula. Como já foi discutido aqui, a GXM tem a capacidade de modular diversas células da resposta imune, agindo em funções das mais variadas como adesão, produção de citocinas, migração, entre outras. Outro fato que nos motiva a pensar em mecanismos independentes do sistema inflamassoma para a inibição da produção de IL-1 β é de que vários fármacos como: bromoenol lactona (inibidor da fosfolipase A2), ácido ocadáico (inibidor de fosfatases), Tenidap (inibidor de transporte de ânions), difenileno iodônio (inibidor da NADPH oxidase), Vorinostat (inibidor da histona deacetilase) e Imipramina (inibidor da ácido esfingomielinase) apresentam como efeito direto ou indireto a inibição da secreção de IL-1 β , a partir de mecanismo ainda não totalmente elucidados (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011).

O próximo passo deste trabalho foi a verificação das vantagens obtidas pelo fungo frente a estas inibições observadas. É bem relatada e discutida a correlação entre a montagem de uma resposta inflamatória competente e a resistência contra a criptococose. Quanto menor a replicação do fungo no interior destes macrófagos, menor a virulência do patógeno, com melhor prognóstico para o hospedeiro infectado (MANSOUR; VYAS; LEVITZ, 2011). Uma das maneiras de se impedir a replicação intracelular descontrolada do *C. neoformans* é a montagem de uma resposta inflamatória celular polarizada para Th1 (HUFFNAGLE et. al.,

2000; WÜTHRICH; DEEPE; KLEIN, 2012), com a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β e IL-18. Neste ponto, a ativação adequada das células da imunidade inata, principalmente macrófagos e células dendríticas, é essencial para um desfecho favorável da patologia para o hospedeiro.

Neste âmbito, a inibição da secreção de citocinas dependentes do inflamassoma nos macrófagos a partir de interferências geradas pelo *C. neoformans* é um mecanismo para que esta célula não seja capaz de montar uma resposta adequada. Existem dados conflitantes na literatura a respeito do papel da citocina IL-1 β na proteção contra a criptococose, sendo que alguns estudos defendem uma importância chave desta citocina na resistência do hospedeiro (GUILLOT et. al., 2008) enquanto outros não enxergam uma correlação tão direta entre a secreção da citocina e a proteção do hospedeiro (WANG et. al., 2011). Pendendo para os estudos que demonstraram tal proteção, temos o relato de um caso clínico sobre uma paciente supostamente imunocompetente, que apresentava defeitos em células da imunidade inata como neutrófilos e monócitos, sendo um destes defeitos a produção suprimida de IL-1 β . Esta paciente apresentava criptococose pulmonar e suas células eram incapazes de conter o crescimento intracelular do *C. neoformans*, quando comparadas com células de outros pacientes (MARRONI et. al., 2007). Por outro lado, não se há dúvidas quanto à importância da citocina IL-18 na proteção contra a criptococose. Estudos demonstraram que esta citocina, juntamente com a IL-12, é extremamente eficaz na proteção contra a criptococose pulmonar (KAWAKAMI et. al., 1997; KAWAKAMI et. al., 2000), sendo inclusive o receptor desta citocina (IL-18R) importante na sobrevivência de hospedeiros infectados com o *C. neoformans* (WANG et. al., 2011).

Outro fenômeno destacado por este trabalho e que traz vantagens para o *C. neoformans* é a prevenção da piroptose. Como descrito anteriormente, a piroptose é uma morte celular programada extremamente rápida, com caráter inflamatório e com a liberação de conteúdo citoplasmático, possivelmente citocinas inflamatórias entre outras moléculas, exacerbando a resposta inflamatória local. Outro papel importante da piroptose é a rápida destruição do ambiente intracelular, que funciona como um reservatório de crescimento para patógenos intracelulares. Desta forma, a ativação da piroptose expulsa o microrganismo de um ambiente favorável ao seu crescimento para um ambiente extracelular sobre forte processo inflamatório, que favorece a piroptose de outras células presentes no mesmo ambiente (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009). Desta forma, é possível dizer que a piroptose é uma estratégia adequada ao combate do *C. neoformans*, por fornecer uma ampliação na

resposta pró-inflamatória e também por eliminar os reservatórios intracelulares de macrófagos, que são ideais para a replicação do fungo. Dentre os patógenos intracelulares que impedem o processo de piroptose, os principais são bactérias que alteram a morte celular promovida pelos macrófagos, ativando caspases apoptóticas como a caspase-8 ao invés da caspase-1 (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009). Em infecções fúngicas, um estudo recente demonstrou que *C. albicans*, que não é um patógeno intracelular, é capaz de ativar o inflamassoma, promovendo a piroptose e assim evadindo do interior dos macrófagos, escapando do ambiente intracelular que é hostil para este fungo (UWAMAHORO et. al., 2014). Este exemplo demonstra que existem patógenos, inclusive fungos, capazes de modular a ativação da piroptose tanto de maneira negativa quanto positiva, sendo um campo recente de pesquisa entre as interações patógeno-hospedeiro. As vantagens obtidas a partir da inibição deste ambiente pró-inflamatório exacerbado pelo *C. neoformans* ficaram claras nos ensaios realizados no sistema “Transwell”, aonde o fungo capsular obteve uma maior taxa de replicação quando comparado ao fungo acapsular.

Resultados adicionais trouxeram uma vantagem extra que a cápsula apresenta ao fungo: o aumento de pH do meio de crescimento. Há vários anos se discute se o *C. neoformans* é capaz de sobreviver ao pH ácido apresentado pelo fagolisossomo, com estudos suportando ambos os lados (VOELZ; MAY, 2010; SMITH; DIXON; MAY, 2014). O resultado encontrado nos ensaios de resistência ao pH neste trabalho pende para a hipótese de que o fungo não seja capaz de sobreviver tão bem neste ambiente ácido, pois mostra uma modulação significativa do pH pela cepa capsular, que é a mais virulenta e com maior taxa de replicação intracelular.

A diferença de resposta mediante a via de fagocitose observada quando usados opsonizantes diferentes no ensaio de fagocitose e morte também merece ser discutida. Já é descrito o fato de que a fagocitose mediada pelo sistema complemento ou mediado por anticorpos opsonizantes são redundantes, sendo que hospedeiros que não apresentam sistema complemento ganham parte da proteção contra o *C. neoformans* de volta quando recebem anticorpos opsonizantes (SHAPIRO et. al., 2002). Apesar disso, sabe-se que cada tipo de opsonização leva a uma via de ativação diferente do fagócito, sendo que pouco se sabe sobre essas vias em relação à promoção da atividade fungicida (PIROFSKI, 2006). Outro fator importante é que, além da ação opsonizante, os anticorpos protetores contra o *C. neoformans* são capazes de realizar diversas outras ações contra o fungo como, por exemplo, dificultar a replicação do mesmo ao se ligar diretamente à cápsula (CORDERO et. al., 2013). Levando

em consideração todos estes fatores, é possível levantar a hipótese de que a fagocitose do fungo promovida por anticorpos seja capaz de fornecer uma ativação mais adequada para o macrófago do que a fagocitose promovida pelo sistema complemento, provavelmente ajudada pelas ações extras exercidas pelo anticorpo. Isto explicaria o fato de os componentes capsulares promoverem a replicação intracelular fúngica somente nos ensaios com a fagocitose mediante sistema complemento, devido ao fato de haver uma ativação inadequada do macrófago no momento da fagocitose, quando este já se apresenta modulado negativamente perante a interação com o CM35. Para finalizar, a ativação do primeiro sinal pelo LPS também não é a mais adequada para a ativação do macrófago, sendo necessária a adição de IFN- γ para uma inibição adequada da replicação intracelular do fungo (ZEBEDEE et. al., 1994). Este fato explica a permissividade aumentada destes macrófagos estimulados durante os ensaios.

Este trabalho trouxe resultados inéditos acerca da interação entre componentes secretados pelo *C. neoformans* e a montagem de resposta por macrófagos. Apesar de já existirem relatos acerca da capacidade de cepas capsulares do fungo promoverem a redução da produção de IL-1 β (VECCHIARELLI et. al., 1995; GUO et. al., 2014), pela primeira vez foi demonstrado que esta redução ocorre por interferências possivelmente no processamento ou na secreção desta citocina, e não por uma falha na ativação inicial do macrófago. Estes resultados, apesar de preliminares, trarão base para trabalhos futuros, aonde será buscada a molécula responsável pelos fenômenos visualizados (ou a confirmação de que esta molécula é a GXM) e o mecanismo de ação que ela utiliza para promover tais fenômenos. A purificação das amostras obtidas já está em etapa final, estando previstas as análises aqui no Brasil e também em uma empresa privada no Canadá. A capacidade de purificar GXM menor que 1kDa também nos traz uma nova amostra com grande potencial para ser testada. Estas purificações, associadas aos ensaios já descritos ao longo desta discussão servirão para buscarmos novas respostas e validarmos as hipóteses trazidas neste trabalho. Por último, este trabalho também servirá de base para um novo projeto deste laboratório, aonde serão verificadas as capacidades imunomodulatórias de vesículas extracelulares de *C. neoformans* em células da imunidade inata no âmbito do inflamassoma, assim como o impacto desta modulação *in vivo*.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abbas, Abul K; Lichtman, Andrew H; Pillai, Shiv. (2012) Innate Immunity. In: *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. Philadelphia: Saunders/elsevier. p. 55-87.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Albuquerque, P. C., Fonseca, F. L., Dutra, F. F., Bozza, M. T., Frases, S., Casadevall, A., & Rodrigues, M. L. (2014). Cryptococcus neoformans glucuronoxylomannan fractions of different molecular masses are functionally distinct. *Future Microbiology*, 9(2), 147–161.
- Allen, R. C., Popat, R., Diggle, S. P., & Brown, S. P. (2014). Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nature Reviews. Microbiology*, 12(4), 300–8. doi:10.1038/nrmicro3232
- Alvarez, M., & Casadevall, A. (2006). Phagosome extrusion and host-cell survival after Cryptococcus neoformans phagocytosis by macrophages. *Current Biology : CB*, 16(21), 2161–5. doi:10.1016/j.cub.2006.09.061
- AppliChem. (2008). Detergents. Darmstadt: AppliChem.
- Armstrong-James, D., Meintjes, G., & Brown, G. D. (2014). A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends in Microbiology*, 22(3), 120–7. doi:10.1016/j.tim.2014.01.001
- Badiee, P., & Hashemizadeh, Z. (2014). Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *The Indian Journal of Medical Research*, (February), 195–204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4001330/>
- Bauernfeind, F., & Hornung, V. (2013). Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO Molecular Medicine*, 5(6), 814–26. doi:10.1002/emmm.201201771
- Bauernfeind, F., Bartok, E., Rieger, A., Franchi, L., Núñez, G., & Hornung, V. (2011). Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(2), 613–7. doi:10.4049/jimmunol.1100613
- Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 185–230. doi:10.1128/CMR.00059-12
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews. Microbiology*. doi:10.1038/nrmicro2070

- Bergsbaken, T., Fink, S. L., den Hartigh, A. B., Loomis, W. P., & Cookson, B. T. (2011). Coordinated Host Responses during Pyroptosis: Caspase-1-Dependent Lysosome Exocytosis and Inflammatory Cytokine Maturation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *187*, 2748–2754. doi:10.4049/jimmunol.1100477.Coordinated
- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, *81*(1), 1–5. doi:10.1189/jlb.0306164
- Biondo, C., Midiri, A., Messina, L., Tomasello, F., Garufi, G., Catania, M. R., ... Mancuso, G. (2005). MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *European Journal of Immunology*, *35*(3), 870–8. doi:10.1002/eji.200425799
- Blackstock, R., & Murphy, J. W. (2004). Age-related resistance of C57BL/6 mice to *Cryptococcus neoformans* is dependent on maturation of NKT cells. *Infection and Immunity*, *72*(9), 5175–80. doi:10.1128/IAI.72.9.5175-5180.2004
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911–917.
- Bonardi, V., Cherkis, K., Nishimura, M. T., & Dangl, J. L. (2012). A new eye on NLR proteins: focused on clarity or diffused by complexity? *Current Opinion in Immunology*, *24*(1), 41–50. doi:10.1016/j.coi.2011.12.006
- Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*, *25*(6), 280–8. doi:10.1016/j.it.2004.03.008
- Bowie, A., & O'neill, L. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*, *67*(April), 508–514. Retrieved from <http://www.jleukbio.org/content/67/4/508.short>
- Boyden, E. D., & Dietrich, W. F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nature Genetics*, *38*(2), 240–4. doi:10.1038/ng1724
- Brissaud, O., Guichoux, J., Harambat, J., Tandonnet, O., & Zaoutis, T. (2012). Invasive fungal disease in PICU: epidemiology and risk factors. *Annals of Intensive Care*, *2*(1), 6. doi:10.1186/2110-5820-2-6
- Brown, G. D. (2011). Innate Antifungal Immunity : The Key Role of Phagocytes. *Annual Review of Immunology*, *29*, 1–21. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101229.INNATE
- Brown, G. D., Meintjes, G., Kolls, J. K., Gray, C., Horsnell, W., Achan, B., ... Yang, Y. (2014). AIDS-related mycoses: the way forward. *Trends in Microbiology*, *22*(3), 107–9. doi:10.1016/j.tim.2013.12.008
- Casadevall, A. (2010). *Cryptococci at the brain gate: Break and enter or use a Trojan horse?* *Journal of Clinical Investigation*, *120*(5), 1389–1392. doi:10.1172/JCI42949

- Casadevall, A., & Pirofski, L.-A. (2009). Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *Journal of Water and Health*, 7 Suppl 1, S2–S18. doi:10.2166/wh.2009.036
- Casadevall, A., Cleare, W., Feldmesser, M., Glatman-Freedman, A., Goldman, D. L., Kozel, T. R., ... Zhong, Z. (1998). Characterization of a Murine Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide That Is a Candidate for Human Therapeutic Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(6), 1437–1446. Retrieved from <http://aac.asm.org/content/42/6/1437.short>
- CDC. Cryptococcal meningitis: a deadly fungal disease among people living with HIV/AIDS. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Retrieved de: <http://www.cdc.gov/fungal/pdf/at-a-glance-508c.pdf>
- Centola, M., Wood, G., Frucht, D. M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C., ... Kastner, D. L. (2000). The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood*, 95(10), 3223–3231.
- Chae, J. J., Wood, G., Masters, S. L., Richard, K., Park, G., Smith, B. J., & Kastner, D. L. (2006). The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 9982–9987. doi:10.1073/pnas.0602081103
- Chang, Y., & Kwon-Chung, K. (1994). Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Molecular and Cellular Biology*, 14(7), 4912–4919. Retrieved from <http://mcb.asm.org/content/14/7/4912.short>
- Chang, Z. L., Netski, D., Thorkildson, P., & Kozel, T. R. (2006). Binding and Internalization of Glucuronoxylomannan, the Major Capsular Polysaccharide of *C. neoformans*, by murine peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*, 74(1), 144–151. doi:10.1128/IAI.74.1.144
- Charlier, C., Nielsen, K., Daou, S., Brigitte, M., Chretien, F., & Dromer, F. (2009). Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 77(1), 120–7. doi:10.1128/IAI.01065-08
- Chen, G., McNamara, D. a, Hernandez, Y., Huffnagle, G. B., Toews, G. B., & Olszewski, M. a. (2008). Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model. *Infection and Immunity*, 76(6), 2379–91. doi:10.1128/IAI.01143-07
- Cherniak, R., Reiss, E., Slodki, M. E., Plattner, R. D., & Blumer, S. O. (1980). Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Molecular Immunology*, 17, 1025–1032. doi:10.1016/0161-5890(80)90096-6

- Cordero, R. J. B., Pontes, B., Frases, S., Nakouzi, A. S., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., ... Casadevall, A. (2013). Antibody binding to *Cryptococcus neoformans* impairs budding by altering capsular mechanical properties. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*, 317–23. doi:10.4049/jimmunol.1202324
- Cross, A. S. (2008). What is a virulence factor? *Critical Care (London, England)*, *12*(6), 196. doi:10.1186/cc7127
- Cunha, C., Romani, L., & Carvalho, A. (2010). Cracking the Toll-like receptor code in fungal infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *8*(10), 1121–37. doi:10.1586/eri.10.93
- Dan, J. M., Kelly, R. M., Lee, C. K., & Levitz, S. M. (2008). Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infection and Immunity*, *76*(6), 2362–7. doi:10.1128/IAI.00095-08
- Deatherage, B. L., & Cookson, B. T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: A conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and Immunity*, *80*(6), 1948–1957. doi:10.1128/IAI.06014-11
- Denes, A., Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2012). Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death and Disease*, *3*, e338. doi:10.1038/cddis.2012.86
- Diaz, A., Hu, C., Kastner, D. L., Schaner, P., Reginato, A. M., Richards, N., & Gumucio, D. L. (2004). Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: A prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever. *Arthritis and Rheumatism*, *50*(11), 3679–3689. doi:10.1002/art.20600
- Dostert, C., Guarda, G., Romero, J. F., Menu, P., Gross, O., Tardivel, A., ... Tschopp, J. (2009). Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One*, *4*(8), e510. doi:10.1371/journal.pone.0006510
- Ellerbroek, P. M., Hoepelman, A. I. M., Wolbers, F., Zwaginga, J. J., & Coenjaerts, F. E. J. (2002). Cryptococcal Glucuronoxylomannan Inhibits Adhesion of Neutrophils to Stimulated Endothelium In Vitro by Affecting Both Neutrophils and Endothelial Cells. *Infection and Immunity*, *70*(9), 4762–4771. doi:10.1128/IAI.70.9.4762-4771.2002
- Ellerbroek, P. M., Ulfman, L. H., Hoepelman, A. I., & Coenjaerts, F. E. J. (2004). Cryptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium. *Cellular Microbiology*, *6*(6), 581–92. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00384.x
- Englen, M., Valdez, Y., Lehnert, N., & Lehnert, B. (1995). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. *Journal of Immunological Methods*, *184*, 281–283. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Granulocyte+/+macrophage+colony-stimulating+factor+is+expressed+and+secreted+in+cultures+of+murine+L929+cells#0>

- Feldmesser, M., Kress, Y., & Casadevall, A. (2001). Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology*, *147*, 2355–2365. Retrieved from <http://mic.sgmjournals.org/content/147/8/2355.short>
- Feldmesser, M., Tucker, S., & Casadevall, A. (2001). Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*, *9*(6), 273–278. doi:10.1016/S0966-842X(01)02035-2
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular Microbiology*, *8*(July), 1812–1825. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00751.x
- Frases, S., Pontes, B., Nimrichter, L., Viana, N. B., Rodrigues, M. L., & Casadevall, A. (2009). Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(4), 1228–33. doi:10.1073/pnas.0808995106
- Fromtling, R., Shadomy, H., & Jacobson, E. (1982). Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, *79*, 23 – 29. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Cryptococcus+neofor mans#0>
- Ganesan, S., Rathinam, V. a K., Bossaller, L., Army, K., Kaiser, W. J., Mocarski, E. S., ... Fitzgerald, K. a. (2014). Caspase-8 modulates dectin-1 and complement receptor 3-driven IL-1 β production in response to β -glucans and the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *193*(5), 2519–30. doi:10.4049/jimmunol.1400276
- Gao, J. J., Xue, Q., Papasian, C. J., & Morrison, D. C. (2001). Bacterial DNA and lipopolysaccharide induce synergistic production of TNF-alpha through a post-transcriptional mechanism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *166*, 6855–6860. doi:10.4049/jimmunol.166.11.6855
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1998). Inhibition of Human Caspases by Peptide-based and Macromolecular Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(49), 32608–32613. doi:10.1074/jbc.273.49.32608
- Garcia-Solache, M., & Casadevall, A. (2010). Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *MBio*, *1*(1), 1–3. doi:10.1038/nature02716.14.
- Garlanda, C., Dinarello, C. a, & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, *39*(6), 1003–18. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010
- Geijtenbeek, T. B. H., & Gringhuis, S. I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews. Immunology*, *9*(7), 465–79. doi:10.1038/nri2569

- Grechi, J., Marinho-Carvalho, M., Zancan, P., Cinelli, L. P., Gomes, A. M. O., Rodrigues, M. L., ... Sola-Penna, M. (2011). Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 14820–9. doi:10.1074/jbc.M110.177030
- Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschläger, N., Endres, S., ... Ruland, J. (2009). Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*, 459(7245), 433–436. doi:10.1038/nature07965
- Guillot, L., Carroll, S. F., Homer, R., & Qureshi, S. T. (2008). Enhanced innate immune responsiveness to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with resistance to progressive infection. *Infection and Immunity*, 76(10), 4745–4756. doi:10.1128/IAI.00341-08
- Guo, C., Chen, M., Fa, Z., Lu, A., Fang, W., Sun, B., ... Meng, G. (2014). Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 16(10), 845–54. doi:10.1016/j.micinf.2014.08.013
- Hentze, H., Lin, X. Y., Choi, M. S. K., & Porter, a G. (2003). Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death and Differentiation*, 10(9), 956–68. doi:10.1038/sj.cdd.4401264
- Hesker, P. R., Nguyen, M., Kovarova, M., Ting, J. P. Y., & Koller, B. H. (2012). Genetic Loss of Murine Pyrin, the Familial Mediterranean Fever Protein, Increases Interleukin-1 β Levels. *PLoS ONE*, 7(11). doi:10.1371/journal.pone.0051105
- Hise, A. G., Tomalka, J., Ganesan, S., Patel, K., Hall, B. a, Brown, G. D., & Fitzgerald, K. a. (2009). An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host & Microbe*, 5(5), 487–97. doi:10.1016/j.chom.2009.05.002
- Haupt, D. C., Pfrommer, G. S. T., Young, B. J., Larson, T. a., & Kozel, T. R. (1994). Occurrences, immunoglobulin classes, and biological activities of antibodies in normal human serum that are reactive with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Infection and Immunity*, 62(7), 2857–2864.
- Huffnagle, G. B., Traynor, T. R., McDonald, R. a., Olszewski, M. a., Lindell, D. M., Herring, A. C., & Toews, G. B. (2000). Leukocyte recruitment during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Immunopharmacology*, 48, 231–236. doi:10.1016/S0162-3109(00)00222-8
- Idnurm, A., Bahn, Y.-S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J. a, & Heitman, J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(10), 753–64. doi:10.1038/nrmicro1245
- Janbon, G., Ormerod, K. L., Paulet, D., Byrnes, E. J., Yadav, V., Chatterjee, G., ... Dietrich, F. S. (2014). Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reveals complex RNA expression and microevolution leading to virulence attenuation. *PLoS Genetics*, 10(4), e1004261. doi:10.1371/journal.pgen.1004261

- Jarvis, J., & Harrison, T. (2007). HIV-associated cryptococcal meningitis. *Aids*, *21*(April), 2119–2129. Retrieved from http://journals.lww.com/aidsonline/Abstract/2007/10180/HIV_associated_cryptococcal_meningitis.1.aspx
- Joly, S., Ma, N., Sadler, J. J., Soll, D. R., Cassel, S. L., & Sutterwala, F. S. (2009). Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(6), 3578–81. doi:10.4049/jimmunol.0901323
- Kaparakis, M., Philpott, D. J., & Ferrero, R. L. (2007). Mammalian NLR proteins; discriminating foe from friend. *Immunology and Cell Biology*, *85*(6), 495–502. doi:10.1038/sj.icb.7100105
- Kawakami, K., Koguchi, Y., Qureshi, M. H., Miyazato, a, Yara, S., Kinjo, Y., ... Saito, A. (2000). IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN-gamma production by NK cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *165*, 941–947. doi:ji_v165n2p941 [pii]
- Kawakami, K., Qureshi, M. H., Zhang, T., Okamura, H., Kurimoto, M., & Saito, A. (1997). IL-18 Protects Mice Against Pulmonary and Disseminated Infection with *Cryptococcus neoformans* by Inducing IFN- γ Production. *The Journal of Immunology*, *97*, 5528 – 5534.
- Kechichian, T. B., Shea, J., & Del Poeta, M. (2007). Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infection and Immunity*, *75*(10), 4792–8. doi:10.1128/IAI.00587-07
- Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., & Beer, H. D. (2008). Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion. *Cell*, *132*, 818–831. doi:10.1016/j.cell.2007.12.040
- Kistowska, M., Fenini, G., Jankovic, D., Feldmeyer, L., Kerl, K., Bosshard, P., ... French, L. E. (2014). *Malassezia* yeasts activate the NLRP3 inflammasome in antigen-presenting cells via Syk-kinase signalling. *Experimental Dermatology*, *23*(12), 884–9. doi:10.1111/exd.12552
- Kozel, T., & Gotschlich, E. (1982). The capsule of *cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *The Journal of Immunology*, *129*(4), 1675–1680. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/129/4/1675.short>
- Kozubowski, L., Lee, S. C., & Heitman, J. (2009). Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cellular Microbiology*, *11*(3), 370–80. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01273.x
- Kronstad, J. W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., D'Souza, C. a, Griffiths, E. J., ... Wang, J. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews. Microbiology*, *9*(3), 193–203. doi:10.1038/nrmicro2522

- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34. doi:10.3109/08830185.2010.529976
- Kwon-Chung, K. J., & Varma, A. (2006). Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*, 6(4), 574–87. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00088.x
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2009). Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunological Reviews*, 227(1), 95–105. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00730.x
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2012). Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(May), 137–61. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155745
- Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews. Immunology*, 13(6), 397–411. doi:10.1038/nri3452
- Le Feuvre, R. a., Brough, D., Iwakura, Y., Takeda, K., & Rothwell, N. J. (2002). Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), 3210–3218. doi:10.1074/jbc.M104388200
- Lei, G., Chen, M., Li, H., Niu, J.-L., Wu, S., Mao, L., ... Meng, G. (2013). Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Cell Research*, 23(7), 965–8. doi:10.1038/cr.2013.49
- Li, H., Wu, S., Mao, L., Lei, G., Zhang, L., Lu, A., ... Meng, G. (2013). Human pathogenic fungus *Trichophyton schoenleinii* activates the NLRP3 inflammasome. *Protein & Cell*, 4(7), 529–538. doi:10.1007/s13238-013-2127-9
- Lin, S., Schranz, J., & Teutsch, S. (2001). Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 60612(February), 358–366. Retrieved from <http://cid.oxfordjournals.org/content/32/3/358.short>
- Lin, X. (2009). *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(4), 401–16. doi:10.1016/j.meegid.2009.01.013
- Lin, X., & Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, 60, 69–105. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142102
- Lipovsky, M. M., Gekker, G., Hu, S., Ehrlich, L. C., Hoepelman, A. I. M., & Peterson, P. K. (1998). Cryptococcal Glucuronoxylomannan Induces Interleukin (IL) -8 Production by Human Microglia but Inhibits Neutrophil Migration toward IL-8. *The Journal of Infectious Diseases*, 177, 260–263.

- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001
- Maekawa, T., Kufer, T. a., & Schulze-Lefert, P. (2011). NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunology*, 12(9), 817–26. doi:10.1038/ni.2083
- Mansour, M. K., Latz, E., & Levitz, S. M. (2006). Cryptococcus neoformans Glycoantigens Are Captured by Multiple Lectin Receptors and Presented by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 176(5), 3053–3061. doi:10.4049/jimmunol.176.5.3053
- Mansour, M. K., Schlesinger, L. S., & Levitz, S. M. (2002). Optimal T Cell Responses to Cryptococcus neoformans Mannoprotein Are Dependent on Recognition of Conjugated Carbohydrates by Mannose Receptors. *The Journal of Immunology*, 168(6), 2872–2879. doi:10.4049/jimmunol.168.6.2872
- Mansour, M. K., Vyas, J. M., & Levitz, S. M. (2011). Dynamic virulence: Real-time assessment of intracellular pathogenesis links cryptococcus neoformans phenotype with clinical outcome. *mBio*, 2(5), 3–5. doi:10.1128/mBio.00217-11
- Mao, L., Zhang, L., Li, H., Chen, W., Wang, H., Wu, S., ... Meng, G. (2014). Pathogenic Fungus *Microsporium canis* Activates the NLRP3 Inflammasome. *Infection and Immunity*, 82(2), 882–892. doi:10.1128/IAI.01097-13
- Mariano Andrade, R., Monteiro Almeida, G., Alexandre DosReis, G., & Alves Melo Bento, C. (2003). Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* exacerbates in vitro yeast cell growth by interleukin 10-dependent inhibition of CD4+ T lymphocyte responses. *Cellular Immunology*, 222(2), 116–125. doi:10.1016/S0008-8749(03)00116-3
- Marim, F. M., Silveira, T. N., Lima, D. S., & Zamboni, D. S. (2010). A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PloS One*, 5(12), e15263. doi:10.1371/journal.pone.0015263
- Marrack, P., McKee, A. S., & Munks, M. W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews. Immunology*, 9(April), 287–293. doi:10.1038/nri2510
- Marroni, M., Pericolini, E., Cenci, E., Bistoni, F., & Vecchiarelli, A. (2007). Functional defect of natural immune system in an apparent immunocompetent patient with pulmonary cryptococcosis. *Journal of Infection*, 54, 8–11. doi:10.1016/j.jinf.2006.03.018
- Martinez, L. R., Garcia-Rivera, J., & Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3365–3367.
- Martinon, F., Mayor, A., & Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annual Review of Immunology*, 27, 229–65. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132715

- McClelland, E. E., Bernhardt, P., & Casadevall, A. (2006). Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infection and Immunity*, 74(3), 1500–4. doi:10.1128/IAI.74.3.1500-1504.2006
- McFadden, D. C., De Jesus, M., & Casadevall, A. (2006). The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 1868–75. doi:10.1074/jbc.M509465200
- Meyer, J. D., Nayar, R., & Manning, M. C. (2009). Impact of bulking agents on the stability of a lyophilized monoclonal antibody. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38, 29–38. doi:10.1016/j.ejps.2009.05.008
- Miao, E. a, Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., & Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nature Immunology*, 7(6), 569–75. doi:10.1038/ni1344
- Miao, E. a, Mao, D. P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C. G., Warren, S. E., ... Aderem, A. (2010). Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), 3076–80. doi:10.1073/pnas.0913087107
- Miao, E. a., Rajan, J. V., & Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological Reviews*, 243, 206–214. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x
- Min, L., Isa, S. A. B. M., Fam, W. N., Sze, S. K., Beretta, O., Mortellaro, A., & Ruedl, C. (2012). Synergism between curdlan and GM-CSF confers a strong inflammatory signature to dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188, 1789–98. doi:10.4049/jimmunol.1101755
- Mitchell, T., & Perfect, J. (1995). Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 515–548. Retrieved from <http://cmr.asm.org/content/8/4/515.short>
- Monari, C., Bistoni, F., & Vecchiarelli, A. (2006). Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. *FEMS Yeast Research*, 6(4), 537–42. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00072.x
- Monari, C., Bistoni, F., Casadevall, A., Pericolini, E., Pietrella, D., Kozel, T. R., & Vecchiarelli, A. (2005a). Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(1), 127–37. doi:10.1086/426511
- Monari, C., Kozel, T. R., Bistoni, F., & Vecchiarelli, a. (2002). Modulation of C5aR Expression on Human Neutrophils by Encapsulated and Acapsular *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 70(7), 3363–3370. doi:10.1128/IAI.70.7.3363-3370.2002
- Monari, C., Pericolini, E., Bistoni, G., Casadevall, a., Kozel, T. R., & Vecchiarelli, a. (2005b). *Cryptococcus neoformans* Capsular Glucuronoxylomannan Induces Expression of Fas

- Ligand in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 174(6), 3461–3468.
doi:10.4049/jimmunol.174.6.3461
- Moreira, T. D. A., Ferreira, M. S., Marques, R., & Sebastião, A. (2006). Criptococose : estudo clínico-epidemiológico , laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes
Cryptococcosis : clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(3), 255–258.
- Nakamura, K., Kinjo, T., Saijo, S., Miyazato, A., Adachi, Y., Ohno, N., ... Kawakami, K. (2007). Dectin-1 is not required for the host defense to *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology and Immunology*, 51(11), 1115–1119. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1348-0421.2007.tb04007.x/full>
- Nakamura, K., Miyagi, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., ... Kawakami, K. (2006). Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 47(1), 148–54. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00078.x
- Nakamura, K., Miyazato, A., Xiao, G., Hatta, M., Inden, K., Aoyagi, T., ... Kawakami, K. (2008). Deoxynucleic Acids from *Cryptococcus neoformans* Activate Myeloid Dendritic Cells via a TLR9-Dependent Pathway. *The Journal of Immunology*, 180, 4067 – 4074.
- Nakamura, Y., Kano, R., S, W., & Hasegawa, A. (2000). Molecular analysis of CAP59 gene sequences from five serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 992–995. Retrieved from <http://jcm.asm.org/content/38/3/992.short>
- Nakamura, Y., Sato, K., Yamamoto, H., Matsumura, K., Matsumoto, I., Nomura, T., ... Kawakami, K. (2014). Dectin-2 deficiency promotes Th2 response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, (November). doi:10.1128/IAI.02835-14
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., & Gow, N. a R. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(1), 67–78. doi:10.1038/nrmicro1815
- O'Meara, T., & Alspaugh, J. (2012). The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 387–408. doi:10.1128/CMR.00001-12
- Oliveira, D. L., Freire-de-Lima, C. G., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Rodrigues, M. L., & Nimrichter, L. (2010). Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infection and Immunity*, 78(4), 1601–1609. doi:10.1128/IAI.01171-09
- Papin, S., Cuenin, S., Agostini, L., Martinon, F., Werner, S., Beer, H.-D., ... Tschopp, J. (2007). The SPRY domain of Pypin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1 β processing. *Cell Death and Differentiation*, 14, 1457–1466. doi:10.1038/sj.cdd.4402142
- Pappalardo, M. C., & Melhem, M. S. (2003). <![CDATA[Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease]]>. *Revista Do Instituto de*

Medicina Tropical de São Paulo, 45(6), 299–305. doi:10.1590/S0036-46652003000600001

- Pappas, P. (2013). Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. *Transactions of the American Clinical and ...*, 124, 61–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3715903/>
- Park, B. J., Wannemuehler, K. a, Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., & Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS (London, England)*, 23(4), 525–30. doi:10.1097/QAD.0b013e328322ffac
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, a, Martinon, F., & Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation*, 14(9), 1583–9. doi:10.1038/sj.cdd.4402195
- Pfaller, M. a, & Diekema, D. J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(1), 1–53. doi:10.3109/10408410903241444
- Pietrella, D., Corbucci, C., Perito, S., Bistoni, G., & Vecchiarelli, A. (2005). Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infection and Immunity*, 73(2), 820–7. doi:10.1128/IAI.73.2.820-827.2005
- Pirofski, L. A. (2006). Of mice and men, revisited: New insights into an ancient molecule from studies of complement activation by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 74(6), 3079–3084. doi:10.1128/IAI.00431-06
- Pyrgos, V., Seitz, A. E., Steiner, C. a, Prevots, D. R., & Williamson, P. R. (2013). Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997-2009. *PloS One*, 8(2), e56269. doi:10.1371/journal.pone.0056269
- Queiroz, J., Sousa, F., Lage, R., Izael, M., & Santos, A. (2008). Criptococose-uma revisão bibliográfica. *Acta Veterinaria Brasilica*, 2(2), 32–38. Retrieved from <http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/acta/article/view/699>
- Ramirez-Ortiz, Z. G., & Means, T. K. (2012). The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*). *Virulence*, 3(7), 635–46. doi:10.4161/viru.22295
- Rappleye, C. A., Eissenberg, L. G., & Goldman, W. E. (2007). Histoplasma capsulatum α -(1, 3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), 1366–1370. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/104/4/1366.short>
- Reisetter, A. C., Stebounova, L. V., Baltrusaitis, J., Powers, L., Gupta, A., Grassian, V. H., & Monick, M. M. (2011). Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 21844–21852. doi:10.1074/jbc.M111.238519

- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C., & Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 58–67. doi:10.1128/EC.00370-07
- Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., ... Casadevall, A. (2007). Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell*, 6(1), 48–59. doi:10.1128/EC.00318-06
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews. Immunology*, 11(4), 275–88. doi:10.1038/nri2939
- Sabiiti, W., & May, R. C. (2012). Mechanisms of infection by the human fungal pathogen. *Future Microbiology*, 7(11), 1297–1313.
- Saïd-Sadier, N., Padilla, E., Langsley, G., & Ojcius, D. M. (2010). *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One*, 5(4), e10008. doi:10.1371/journal.pone.0010008
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821–32. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
- Seshadri, S., Duncan, M. D., Hart, J. M., Gavrilin, M. a., & Wewers, M. D. (2007). PIRIN levels in human monocytes and monocyte-derived macrophages regulate IL-1 β processing and release. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179, 1274–1281. doi:10.1093/infdis/jim244 [pii]
- Shao, W., Yeretssian, G., Doiron, K., Hussain, S. N., & Saleh, M. (2007). The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36321–9. doi:10.1074/jbc.M708182200
- Shao, X., Mednick, a., Alvarez, M., van Rooijen, N., Casadevall, a., & Goldman, D. L. (2005). An Innate Immune System Cell Is a Major Determinant of Species-Related Susceptibility Differences to Fungal Pneumonia. *The Journal of Immunology*, 175(5), 3244–3251. doi:10.4049/jimmunol.175.5.3244
- Shapiro, S., Beenhouwer, D. O., Feldmesser, M., Taborda, C., Carroll, M. C., Casadevall, A., & Scharff, M. D. (2002). Immunoglobulin G Monoclonal Antibodies to *Cryptococcus neoformans* Protect Mice Deficient in Complement Component C3. *Infection and Immunity*, 70(5), 2598–2604. doi:10.1128/IAI.70.5.2598
- Shoham, S., Huang, C., Chen, J.-M., Golenbock, D. T., & Levitz, S. M. (2001). Toll-Like Receptor 4 Mediates Intracellular Signaling Without TNF- Release in Response to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide Capsule. *The Journal of Immunology*, 166(7), 4620–4626. doi:10.4049/jimmunol.166.7.4620
- Silva, J. O., Costa, P. P., & Reche, S. H. C. (2008). Yeasts maintenance for freezing at – 20 °C. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 40(1), 73–74.

- Smith, L. M., Dixon, E. F., & May, R. C. (2014). The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. *Cellular Microbiology*, 1 – 12. doi:10.1111/cmi.12394
- Sorrell, T., & Ellis, D. (1997). Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 14, 42–43. Retrieved from <http://www.reviberoammicol.com/1997-14/042043.pdf>
- Stanley, A. C., & Lacy, P. (2010). Pathways for cytokine secretion. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25, 218–229. doi:10.1152/physiol.00017.2010
- Tait, S. W. G., Ichim, G., & Green, D. R. (2014). Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science*, 127, 2135–44. doi:10.1242/jcs.093575
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805–20. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*, 249(1), 158–75. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x
- Tavares, A. H., Magalhães, K. G., Almeida, R. D. N., Correa, R., Burgel, P. H., & Bocca, A. L. (2013). NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(12), e2595. doi:10.1371/journal.pntd.0002595
- Taylor, P. R., Reid, D. M., Heinsbroek, S. E. M., Brown, G. D., Gordon, S., & Wong, S. Y. C. (2005). Dectin-2 is predominantly myeloid restricted and exhibits unique activation-dependent expression on maturing inflammatory monocytes elicited in vivo. *European Journal of Immunology*, 35(7), 2163–74. doi:10.1002/eji.200425785
- Tomalka, J., Ganesan, S., Azodi, E., Patel, K., Majmudar, P., Hall, B. a., ... Hise, A. G. (2011). A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 7(12), e1002379. doi:10.1371/journal.ppat.1002379
- Tucker, S. C., & Casadevall, A. (2002). Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3165–70. doi:10.1073/pnas.052702799
- Uwamahoro, N., Verma-Gaur, J., Shen, H. H., Qu, Y., Lewis, R., Lu, J., ... Traven, A. (2014). The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages. *mBio*, 5(2), 1–11. doi:10.1128/mBio.00003-14
- Van de Veerdonk, F. L., Joosten, L. a B., Shaw, P. J., Smeekens, S. P., Malireddi, R. K. S., van der Meer, J. W. M., ... Kanneganti, T.-D. (2011). The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. *European Journal of Immunology*, 41(8), 2260–8. doi:10.1002/eji.201041226

- Vecchiarelli, a, Retini, C., Pietrella, D., Monari, C., Tascini, C., Beccari, T., & Kozel, T. R. (1995). Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. *Infection and Immunity*, *63*(8), 2919–2923.
- Vecchiarelli, A., Pericolini, E., Gabrielli, E., Kenno, S., Perito, S., Cenci, E., & Monari, C. (2013). Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Future Microbiology*, *8*(9), 1107–1116.
- Vecchiarelli, A., Pietrella, D., Lupo, P., Bistoni, F., Mcfadden, D. C., & Casadevall, A. (2003). The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation solar strains of *Cryptococcus neoformans* to acti-differentiation , as documented by the enhance- maturation , indicating a new pathway by. *Journal of Leukocyte Biology*, *74*, 370 – 378. doi:10.1189/jlb.1002476.1
- Vecchiarelli, A., Retini, C., Monari, C., Tascini, C., Bistoni, F., & Kozel, T. R. (1996). Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. *Infection and Immunity*, *64*(7), 2846–2849. Retrieved from <http://iai.asm.org/content/64/7/2846.short>
- Vilchez, R. a., Fung, J., & Kusne, S. (2002). Cryptococcosis in Organ Transplant Recipients: An Overview. *American Journal of Transplantation*, *2*(7), 575–580. doi:10.1034/j.1600-6143.2002.20701.x
- Voelz, K., & May, R. C. (2010). Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryotic Cell*, *9*(6), 835–46. doi:10.1128/EC.00039-10
- Wang, J. P., Lee, C. K., Akalin, A., Finberg, R. W., & Levitz, S. M. (2011). Contributions of the MyD88-dependent receptors IL-18R, IL-1R, and TLR9 to host defenses following pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, *6*(10), e26232. doi:10.1371/journal.pone.0026232
- Wlodarska, M., Thaïss, C. a, Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.-P., Brown, E. M., ... Flavell, R. a. (2014). NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell*, *156*(5), 1045–59. doi:10.1016/j.cell.2014.01.026
- Wolf, J. M., & Casadevall, A. (2014). Challenges posed by extracellular vesicles from eukaryotic microbes. *Current Opinion in Microbiology*, *22*, 73–78. doi:10.1016/j.mib.2014.09.012
- Wood, R., & Rothenberg, M. (2011). *Corning® Osteo Assay Surface 24Well Plates with Transwell® Permeable Supports—A Useful Tool for Co-Culture Studies* (p. 4). New York, USA.
- Wozniak, K., Vyas, J., & Levitz, S. (2006). In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. *Infection and Immunity*, *74*(7), 3817–3824. doi:10.1128/IAI.00317-06

- Wüthrich, M., Deepe, G. S., & Klein, B. (2012). Adaptive Immunity to Fungi. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 115–148. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074958
- Xu, H., Yang, J., Gao, W., Li, L., Li, P., Zhang, L., ... Shao, F. (2014). Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature*, 0(0), 1–5. doi:10.1038/nature13449
- Yauch, L. E., Lam, J. S., & Levitz, S. M. (2006). Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *PLoS Pathogens*, 2(11), e120. doi:10.1371/journal.ppat.0020120
- Yauch, L. E., Mansour, M. K., Shoham, S., Rottman, J. B., & Levitz, S. M. (2004). Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. *Infection and Immunity*, 72(9), 5373–82. doi:10.1128/IAI.72.9.5373-5382.2004
- Zamboni, D. S., & Rabinovitch, M. (2003). Nitric Oxide Partially Controls *Coxiella burnetii* Phase II Infection in Mouse Primary Macrophages. *Infection and Immunity*, 71(3), 1225–1233. doi:10.1128/IAI.71.3.1225-1233.2003
- Zaragoza, O., Alvarez, M., Telzak, A., Rivera, J., & Casadevall, A. (2007). The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. *Infection and Immunity*, 75(6), 2729–39. doi:10.1128/IAI.00094-07
- Zaragoza, O., Chrisman, C. J., Castelli, M. V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. L., & Casadevall, A. (2008). Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cellular Microbiology*, 10(10), 2043–57. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01186.x
- Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., & Casadevall, A. (2009). *The capsule of the fungal pathogen Cryptococcus neoformans*. *Advances in applied microbiology* (1st ed., Vol. 68, pp. 133–216). Elsevier Inc. doi:10.1016/S0065-2164(09)01204-0
- Zaragoza, O., Taborda, C. P., & Casadevall, A. (2003). The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *European Journal of Immunology*, 33(7), 1957–67. doi:10.1002/eji.200323848
- Zebedee, S. L., Koduri, R. K., Mukherjee, J., Mukherjee, S., Lee, S., Sauer, D. F., ... Casadevall, A. (1994). Mouse-human immunoglobulin G1 chimeric antibodies with activities against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(7), 1507–1514. doi:10.1128/AAC.38.7.1507
- Zhang, X., Gonçalves, R., & Mosser, D. M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology*, 14(1), 1–18. doi:10.1002/0471142735.im1401s83.The

- Zhang, Y., Wang, F., Bhan, U., Huffnagle, G. B., Toews, G. B., Standiford, T. J., & Olszewski, M. a. (2010). TLR9 signaling is required for generation of the adaptive immune protection in *Cryptococcus neoformans*-infected lungs. *The American Journal of Pathology*, *177*(2), 754–65. doi:10.2353/ajpath.2010.091104
- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, *469*(7329), 221–5. doi:10.1038/nature09663