



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Investigação de potenciais sítios reservatórios para a infecção  
criptocócica latente e o papel dos macrófagos na dormência de  
*Cryptococcus neoformans***

**RAFFAEL JÚNIO ARAÚJO DE CASTRO**

**Brasília - DF**  
**Fevereiro/2019**

**RAFFAEL JÚNIO ARAÚJO DE CASTRO**

**Investigação de potenciais sítios reservatórios para a infecção  
criptocócica latente e o papel dos macrófagos na dormência de  
*Cryptococcus neoformans***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anamélia Lorenzetti Bocca

**Brasília - DF  
Fevereiro/2019**

**RAFFAEL JÚNIO ARAÚJO DE CASTRO**

**Investigação de potenciais sítios reservatórios para a infecção  
criptocócica latente e o papel dos macrófagos na dormência de  
*Cryptococcus neoformans***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Biologia Molecular do  
Instituto de Biologia da Universidade de  
Brasília, como parte dos requisitos  
necessários para obtenção do título de Doutor  
em Biologia Molecular

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anamélia Lorenzetti Bocca**

**Universidade de Brasília – UNB (Orientadora)**

**Prof. Dr. Marcio Lourenço Rodrigues**

**Universidade de Brasília – UNB (Avaliador)**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola**

**Universidade de Brasília – UNB (Avaliadora)**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ildinete Silva Pereira**

**Universidade de Brasília – UNB (Avaliadora)**

**Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares**

**Universidade de Brasília – UNB (Suplente)**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, à minha família, especialmente minha mãe, pai e irmão, pelo companheirismo, carinho, apoio e compreensão abundantes. O que há de melhor em mim eu atribuo a vocês.

À minha parceira Luana Camargo, a quem devo por ter ingressado no doutorado aos quarenta e cinco minutos do segundo tempo e pelo estímulo para finalizá-lo. Mais que isso: ao seu protagonismo em muitos dos meus momentos mais felizes.

À minha orientadora, prof.<sup>a</sup> Anamélia Bocca, pela convivência, orientação e confiança desde o meu primeiro ano de graduação. Foi de grande importância tê-la me acompanhando no curso da minha vida acadêmica, dando o suporte necessário e me conduzindo para conquistas.

Aos meus chefes no período de sanduíche no exterior, Alexandre Alanio e Françoise Dromer, que me aceitaram de portas abertas, contribuíram intelectualmente e financeiramente no meu projeto, e permitiram expandir meus horizontes em diferentes planos.

Aos meus outros chefes no LIA, prof.<sup>a</sup> Larissa Fernandes, pela grande contribuição com ensinamentos e as linhagens fluorescentes, e ao prof. Aldo Tavares, pelas valorosas discussões científicas e não científicas ao longo desses anos.

Aos bioinformatas Christian Hoffman e Hugo Varet, pela grande contribuição com as análises de RNAseq.

Aos amigos da UnB (e fora dela) e infância, especialmente o Yuri Ferreira, Pedro Bürgel, Fernando de Sá, Lucas Vieira, Luiz Eduardo e Luiz Antônio, por manterem vivos os “bons tempos” de descontração.

Ao companheirismo dos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada da UnB, Isaque Medeiros, Paulo Henrique, Stephan Oliveira, Márcio Jerônimo, Clara Luna,

Fabiana Brandão, Angelina Basso, Ana Camila, Karina Simon, Lucas Las-Casas, Luísa Dan, Samyra Caxito, Helena, Pedro Saavedra, Pedro Henrique, Thais de Castro, Luiza, Teresa, Jonathan, Izabel, Guilherme, Camille, Narla, Viviann, Nadine, Luciano, Pedro Saavedra e Dawanne. Em especial, ao Túlio Medeiros, por ter contribuído com o desenvolvimento das linhagens fluorescentes e os ensaios de fenótipo iniciais deste trabalho.

A todos os membros da Unidade de Micologia Molecular do Instituto Pasteur, pela recepção surpreendentemente calorosa, em especial à Aude Sturny-Leclère, pela amizade e apoio imensurável em várias etapas do meu projeto. À Sara Wong e Vishu Aimanianda, pela ajuda com os animais.

A todos os integrantes e ex-integrantes de outros laboratórios da UnB, Laboratório de Interação Parasita-Hospedeiro, Bioquímica Nutricional, Biofísica, e Laboratório de Biologia Molecular, por me ajudarem prontamente quando preciso: Clênia Azevedo, Patrícia Alves, Marcela, Marco Oliveira, Jhones Dias, Hugo, Patrícia Albuquerque, André Nicola, Fernanda Guilhemelli e, especialmente, ao Fabián Hurtado, pela orientação e ajuda nas análises de RNAseq. Aos integrantes do laboratório de Imunologia e Inflamação (LIMI), em especial Raquel Almeida e Rafael Correa, pela companhia desde a graduação.

À Mariângela do laboratório de Imunologia da FS, pela ajuda com o Fortessa.

Ao Chiquinho, pela ajuda técnica e as conversas com rapadura e café.

Aos professores Marcio Rodrigues, Patrícia Albuquerque, Aldo Tavares e Ildinete Pereira, por aceitarem o meu convite e dedicarem seu tempo para a avaliação deste trabalho.

À CAPES, que me permitiu aprimorar este trabalho em terras estrangeiras, ao me conceder uma bolsa por meio do programa PDSE.

Finalmente, às agências de fomento CNPq, FAP-DF e à Universidade de Brasília, pela viabilização deste trabalho, minha bolsa, e as viagens para congressos.

## RESUMO

Uma característica marcante da criptococose, doença causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans* (Cn), é o estabelecimento de uma infecção latente, normalmente em granulomas pulmonares. Não obstante, acredita-se na existência de outros sítios anatômicos reservatórios de leveduras dormentes (D-Cn). Os macrófagos (MØ) desempenham um papel paradoxal na resposta à infecção, sendo importantes para o seu controle, mas também associados ao abrigo intracelular, persistência e disseminação de Cn no hospedeiro. Objetivamos aqui identificar potenciais sítios reservatórios da infecção criptocócica latente em modelo experimental murino, bem como esclarecer os mecanismos subjacentes à sua manutenção ou reativação com base na interação entre D-Cn e MØ *in vitro*. Primeiramente, caracterizamos e validamos linhagens fluorescentes de Cn quanto à expressão de determinados fenótipos relevantes, incluindo dormência, e aplicabilidade em experimentos de interação Cn-hospedeiro. Isso nos permitiu demonstrar características morfológicas e mecanismos regulatórios pós-transcricionais associados ao fenótipo dormente em Cn. Por meio da infecção experimental de camundongos, observamos que Cn foi capaz de disseminar para uma diversidade de sítios anatômicos, incluindo sítios extrapulmonares previamente associados à infecção latente, como o trato urogenital, e sítios nunca relatados na infecção murina mas associados à infecção latente em outros modelos de patógenos, como a medula óssea. A análise do transcriptoma do MØ incubado com Cn na fase exponencial, estacionária (S-Cn) ou dormente mostrou que D-Cn promoveu uma reduzida e específica modificação transcricional do macrófago, mas semelhante a S-Cn. D-Cn reteve a capacidade de modular no macrófago genes importantes para a resposta imune, como aqueles envolvidos em vias do inflamassoma. Inclusive, D-Cn foi incapaz de promover a secreção de IL-1 $\beta$  dependente do inflamassoma NLRP3 em macrófagos pré-ativados, diferentemente de Cn não dormente. Também avaliamos o papel do MØ, sob diferentes perfis de polarização, na manutenção/saída da dormência do fungo. Observamos um aprofundamento do fenótipo dormente na população de D-Cn intracelular independentemente do perfil fenotípico do MØ. Em adição, leveduras presumivelmente exocitadas que foram encontradas no sobrenadante de cultura reativaram. No entanto, a reativação foi frustrada por MØ classicamente ativados, por meio da produção de óxido nítrico. Em conclusão, nossos resultados suportam a hipótese da existência de sítios reservatórios extrapulmonares na infecção criptocócica. Ademais, indicam que os macrófagos atuam como sítios de indução e persistência de células dormentes na infecção criptocócica latente, sendo o fenótipo de polarização dessas células, reflexo do status da resposta imune do hospedeiro, determinante para a manutenção ou reativação dessa infecção.

**Palavras-chave:** *C. neoformans*, latência, reativação, sítio reservatório, macrófago

## ABSTRACT

A striking feature of cryptococcosis, a disease caused by the fungus *Cryptococcus neoformans* (Cn), is the establishment of a latent infection, usually in pulmonary granulomas. Nevertheless, it is believed that there are other anatomical reservoir sites for dormant yeasts (D-Cn). Macrophages (MØ) play a paradoxical role in the response to infection, being important for its control, but also associated with the intracellular shelter, persistence and dissemination of Cn in the host. Our aim was to identify potential reservoir sites for latent cryptococcal infection in a murine experimental model, as well as to clarify the mechanisms underlying their maintenance or reactivation based on the interaction between D-Cn and MØ *in vitro*. First, we characterized and validated fluorescent Cn strains for the expression of certain relevant phenotypes, including dormancy, and applicability in Cn-host interaction experiments. This allowed us to demonstrate morphological characteristics and post-transcriptional regulatory mechanisms associated to the dormant phenotype in Cn. Through experimental infection in mice, we observed that Cn was able to spread across a variety of anatomical sites, including extrapulmonary sites previously associated with latent infection, such as the urogenital tract, and sites never reported in murine infection but associated with latent infection in others models of pathogens, such as the bone marrow. Transcriptome analysis of the MØ incubated with Cn at the exponential, stationary (S-Cn) or dormant phase showed that D-Cn promoted a reduced and specific transcriptional modification of the macrophage, but close to S-Cn condition. D-Cn retained the ability to modulate on the macrophage genes important to immune response, such as those involved in inflammasome pathways. In fact, unlike non-dormant Cn, D-Cn was unable to trigger a NLRP3-dependent IL-1 $\beta$  secretion by primed macrophages. We also evaluated the role of MØ, under different polarization profiles, on fungal maintenance/exit from dormancy. We observed a deepening of the dormant phenotype in the intracellular D-Cn population regardless of the phenotype of the MØ. Moreover, presumably exocytosed yeasts that were found in the cell supernatant reactivated. However, this phenomenon was thwarted by classically activated MØ, through the production of nitric oxide. In conclusion, our results support the hypothesis of existence of extrapulmonary reservoir sites in cryptococcal infection. Furthermore, we indicate that macrophages behavior as sites of induction and persistence of dormant cells in latent cryptococcal infection, with the polarization phenotype of these cells, which reflects the status of the host's immune response, determining for the maintenance or reactivation of this infection.

**Keywords:** *C. neoformans*, latency, reactivation, reservoir site, macrophage

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do ciclo de infecção por <i>C. neoformans</i> . .....	18
Figura 2. Fatores de virulência de <i>C. neoformans</i> . .....	24
Figura 3. Dinâmica de indução e reativação de células persistentes e VBNC. ....	27
Figura 4. Tomografia computadorizada peitoral de paciente. ....	29
Figura 5. Esquema explicativo da reativação e relapso da infecção. ....	30
Figura 6. Resposta Imune na criptococose. ....	35
Figura 7. Plasticidade fenotípica do macrófago na criptococose. ....	36
Figura 8. Metodologia para a obtenção de células dormentes <i>in vitro</i> . ....	53
Figura 9. Intensidade de fluorescência emitida pelas linhagens engenheiradas. ....	56
Figura 10. Distribuição intracelular dos fluoróforos e intensidade de fluorescência dos transformantes engenheirados. ....	58
Figura 11. Análise fenotípica das linhagens transformantes sob condições de estresse. ....	60
Figura 12. Curva de crescimento das linhagens transformadas de <i>C. neoformans</i> . ....	61
Figura 13. Análise da formação de hifas de acasalamento. ....	62
Figura 14. Avaliação dos fatores de virulência das linhagens transformantes. ....	64
Figura 15. Virulência das linhagens transformantes no modelo de infecção de <i>Galleria mellonella</i> . ....	66
Figura 16. As linhagens transformantes não apresentam diferença da cepa parental na susceptibilidade à morte por macrófagos murinos. ....	67
Figura 17. As linhagens transformantes não apresentam diferença da cepa parental na fagocitose por macrófagos murinos. ....	69
Figura 18. Aplicação das linhagens transformantes na análise de fagocitose por citometria de fluxo. ....	70
Figura 19. PAB-GFP <i>C. neoformans</i> cultivado sob privação de nutrientes e hipóxia manifesta o fenótipo de células viáveis mas não cultiváveis e expressão estável de GFP por citometria de fluxo. ....	73
Figura 20. PAB-GFP <i>C. neoformans</i> cultivado sob privação de nutrientes e hipóxia exhibe expressão robusta de GFP e padrão de distribuição celular de PAB-GFP específico por microscopia de fluorescência. ....	74



Figura 21. PAB-GFP <i>C. neoformans</i> cultivado sob privação de nutrientes e hipóxia exhibe acumulação de PAB1 em grânulos de estresse e no núcleo. ....	75
Figura 22. A infecção experimental de <i>C. neoformans</i> dissemina para uma série de tecidos murinos, incluindo a medula óssea. ....	89
Figura 23. Desenho experimental do experimento de reativação de leveduras dormentes de <i>C. neoformans</i> co-cultivadas com macrófagos murinos. ....	97
Figura 24. A infecção com leveduras dormentes de <i>C. neoformans</i> induz, no macrófago murino, um transcriptoma reduzido e específico. ....	102
Figura 25. A infecção por <i>C. neoformans</i> , especialmente na fase exponencial, induz diversos genes relacionados a resposta quimiotática. ....	104
Figura 26. Leveduras dormentes de <i>C. neoformans</i> são incapazes de ativar o inflamassoma NLRP3 em macrófagos. ....	106
Figura 27. D-Cn modula semelhantemente genes e marcadores associados à apresentação antigênica, mas não a expressão de MHC-II na membrana. ....	109
Figura 28. Leveduras dormentes de <i>C. neoformans</i> não induzem a produção de óxido nítrico, mas falham em sua neutralização. ....	111
Figura 29. Análise da expressão de marcadores-assinatura de macrófagos murinos polarizados para M1 ou M2. ....	114
Figura 30. A interação com macrófagos decresce a culturabilidade de <i>C. neoformans</i> dormente intracelular independentemente do estado de polarização celular e sem afetar a viabilidade da levedura. ....	115
Figura 31. A interação com macrófagos resulta na reativação da população de leveduras dormentes recuperadas do sobrenadante, que é frustrada por macrófagos robustamente ativados de forma clássica. ....	117
Figura 32. A reativação das leveduras de <i>C. neoformans</i> na co-cultura com macrófagos é influenciada pela, mas dispensa a presença de soro fetal bovino. ....	119
Figura 33. A inibição de INOS permite a reconstituição da culturabilidade de D-Cn frustrada por macrófagos robustamente ativados. ....	121

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Primers utilizados. ....	45
Tabela 2. Oligonucleotídeos usados nas análises de RT-qPCR. ....	98
Tabela 3. Genes selecionados que foram diferencialmente expressos em macrófagos murinos infectados por <i>C. neoformans</i> . ....	103

## LISTA DE SIGLAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometros
µM	Micromolar
AG	Aminoguanidina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de Variância
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BHE	Barreira Hematoencefálica
BMMs	Macrófagos Derivados da Medula Óssea
CLRs	Receptores de Lectina do tipo C
CMFDA	Clorometil fluoresceína diacetato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Dano
DEX	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Dextrorribonucléico
ELISA	Ensaio de Ligação Imunoenzimático
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GFP	Proteína verde fluorescente
GXM	Glucuronoxilomanana
GXMgal	Glucuronoxilomanogalactana
HIS3	Histona H3
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HK	Morto por calor ( <i>Heat Killed</i> )
IFM	Intensidade de Fluorescência Média
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina-1 beta

iNOS	Óxido Nítrico-Sintase induzida
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LCCM	Meio Condicionado de Células L929
LPS	Lipopolissacarídeos
LVD	Marcação vivo/morto
M1	Macrófagos classicamente ativados
M2	Macrófagos alternativamente ativados
mg	Miligrama
mL	Mililitros
MM	Meio Mínimo
MOI	Multiplicidade de Infecção
NADPH oxidase	Nicotinamida adeninaducleotídeo fosfato oxidases
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de Sódio
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NLRP	Receptor do Tipo NOD que contém Pirina
NLRs	Receptores de Tipo NOD
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NOD	Domínio de Oligomerização de Nucleotídeos
OD	Densidade Ótica
PA	Ácido pantotênico
PAB/PABP	Proteína ligante da cauda poli (A)
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Tampão Fosfato-salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partículas por milhão
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RAPD	DNA polimórfico aleatoriamente amplificado
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotações por Minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SD	Meio Sabouraud Dextrose
SDA	Meio Ágar Sabouraud Dextrose
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SIRI	Síndrome Inflamatória de Reconstituição Imunológica
SNC	Sistema Nervoso Central
SRIPI	Síndrome da Resposta Inflamatória Pós-Infeciosa
Syk	Tirosina-quinase Esplênica
TARV	Terapia Antiretroviral
Th	Resposta/Linfócito T Auxiliar
THP-1	Linhagem Celular de Monócito Humano
TLRs	Receptores do Tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNI	Não infectado/inoculado
UNS	Não estimulado
VBNC	Viável mas não cultivável
x g	Força Centrífuga Relativa
YPD	Meio Extrato de levedura, peptona e dextrose

# SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
1.1. <i>Cryptococcus neoformans</i> e criptococose.....	17
1.2. Os fatores de virulência de <i>C. neoformans</i> .....	21
1.3. A dormência microbiana.....	25
1.4. A infecção criptocócica latente .....	29
1.5. Resposta imune a <i>C. neoformans</i> .....	34
2. Objetivos .....	42
2.1. Objetivo geral: .....	42
2.2. Objetivos específicos: .....	42
3. Capítulo I – Caracterização e uso de linhagens fluorescentes para análise da interação <i>Cryptococcus</i> -hospedeiro .....	43
3.1. Materiais e métodos .....	43
3.1.1. Condições de cultivo de <i>C. neoformans</i> .....	43
3.1.2. Meios de cultivo para testes de fenótipo e fatores de virulência .....	44
3.1.3. Construção dos plasmídeos.....	44
3.1.4. Transformação em <i>C. neoformans</i> por biobalística .....	48
3.1.5. Microscopia de fluorescência .....	48
3.1.6. Uso de animais para experimentação .....	49
3.1.7. Análise de citometria de fluxo .....	49
3.1.8. Geração de macrófagos derivados da medula óssea.....	49
3.1.9. Ensaio de infecção em <i>Galleria mellonella</i> .....	50
3.1.10. Ensaio de fagocitose com macrófagos murinos .....	50
3.1.11. Ensaio de morte fúngica com macrófagos murinos.....	52
3.1.12. Obtenção de células dormentes de <i>C. neoformans</i> .....	52
3.1.13. Teste de culturabilidade por CFU .....	53
3.1.14. Curva de Crescimento.....	53
3.1.15. Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo.....	54
3.1.16. Análise estatística .....	54
3.2. Resultados .....	55
3.2.1. Construção e validação das linhagens repórteres fluorescentes.....	55

3.2.2.	As linhagens transformantes não apresentam alteração nos fenótipos e fatores de virulência em relação a linhagem parental .....	59
3.2.3.	As linhagens transformantes não diferem da linhagem parental na sobrevivência em macrófagos murinos ativados .....	65
3.2.4.	As linhagens transformantes são aplicáveis para a otimização de ensaios de fagocitose de <i>C. neoformans</i> .....	68
3.2.1.	<i>PAB-GFP C. neoformans</i> cultivado sob privação de nutrientes e hipóxia manifesta o fenótipo de células viáveis mas não cultiváveis e expressão estável de GFP .....	71
3.2.2.	<i>PAB-GFP C. neoformans</i> cultivado sob privação de nutrientes e hipóxia exibe padrão específico de distribuição celular de <i>PAB-GFP</i> .....	72
3.3.	Discussão .....	76
4.	Capítulo II – Avaliação da dinâmica de disseminação de <i>C. neoformans</i> em modelo experimental murino .....	84
4.1.	Materiais e Métodos .....	84
4.1.1.	Condições de cultivo de <i>C. neoformans</i> .....	84
4.1.2.	Uso de animais para experimentação .....	84
4.1.3.	Infecção de camundongos e determinação de carga fúngica .....	84
4.1.4.	Análise estatística .....	85
4.2.	Resultados .....	86
4.2.1.	<i>C. neoformans</i> é capaz de se disseminar para a uma variedade de órgãos durante a infecção experimental murina, incluindo a medula óssea .....	86
4.2.2.	A medula óssea é um sítio secundário de infecção criptocócica em diferentes linhagens de camundongos .....	86
4.2.3.	Ambas as variedades de <i>C. neoformans</i> são capazes de colonizar a medula óssea murina	87
4.3.	Discussão .....	90
5.	Capítulo III – O papel dos macrófagos na dormência de <i>C. neoformans</i> .....	94
5.1.	Materiais e métodos .....	94
5.1.1.	Cultivo de <i>C. neoformans</i> .....	94
5.1.2.	Teste de culturabilidade por CFU e método de plaqueamento .....	94
5.1.3.	Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo .....	95
5.1.4.	Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea .....	95

5.1.5.	Ensaio de interação entre macrófagos e leveduras de <i>C. neoformans</i> .....	96
5.1.6.	Ensaio de reativação de células dormentes co-cultivadas com macrófagos.....	96
5.1.7.	RT-qPCR.....	97
5.1.8.	Quantificação indireta de óxido nítrico .....	98
5.1.9.	Dosagem de citocinas .....	98
5.1.10.	Imunofenotipagem celular .....	99
5.1.11.	Sequenciamento de alto desempenho de RNA .....	99
5.1.12.	Análise estatística .....	100
5.2.	Resultados .....	101
5.2.1.	A infecção com leveduras dormentes de <i>C. neoformans</i> induz, no macrófago macrófago, uma resposta transcricional reduzida e específica .....	101
5.2.2.	Leveduras dormentes de <i>C. neoformans</i> são incapazes de ativar o inflamassoma NLRP3 em macrófagos murinos .....	104
5.2.3.	<i>C. neoformans</i> dormente assemelha-se a leveduras não dormentes no perfil de modulação de genes e marcadores associados à apresentação antigênica, embora induza maior expressão de MHC-II .....	107
5.2.4.	Leveduras dormentes de <i>C. neoformans</i> não induzem a produção de óxido nítrico, mas falham em sua neutralização .....	110
5.2.5.	A interação com macrófagos murinos diminui a culturabilidade de leveduras intracelulares dormentes de <i>C. neoformans</i> .....	112
5.2.6.	A interação com macrófagos murinos promove a reativação de leveduras dormentes de <i>C. neoformans</i> presumivelmente excitadas, enquanto essa reativação é frustrada por macrófagos robustamente ativados de forma clássica .....	116
5.2.7.	A reativação das leveduras de <i>C. neoformans</i> na cocultura com macrófagos é influenciada pela presença de soro fetal bovino, apesar deste não ser um requisito necessário neste processo .....	118
5.2.8.	A inibição de INOS permite a reativação de leveduras dormentes frustrada por macrófagos robustamente ativados.....	120
5.3.	Discussão .....	122
6.	Considerações Finais e Perspectivas .....	135
7.	Referências.....	137
8.	Apêndice I – Produção científica durante o período de doutorado .....	170



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Cryptococcus neoformans* e criptococose

*C. neoformans* é o principal agente etiológico da meningite criptocócica, infecção fúngica severa que acomete anualmente cerca de 223 mil pessoas, encontrando-se ranqueada como a quinta infecção mais letal contabilizando mais de 181 mil mortes por ano. A doença apresenta ocorrência mundial e é considerada negligenciada, afetando desproporcionalmente países em desenvolvimento e com baixa renda. Na América Latina, estima-se uma taxa anual de 5.300 casos da doença, dos quais aproximadamente 50% apresentam um desfecho fatal. A África subsaariana desponta com a maioria dos casos de meningite criptocócica (162 mil) e o segundo maior índice de mortalidade (80%). Estes índices africanos são reflexos não só do menor acesso ao e piores condições de tratamento na região, como também refletem e evidenciam o caráter oportunista da doença e sua associação estreita com a AIDS, uma vez que a região abriga quase 70% da população mundial de adultos HIV-positivos (RAJASINGHAM et al., 2017; RODRIGUES, 2018).

A principal população de risco para a criptococose por *C. neoformans* e morte associada constitui-se, além de portadores de HIV/AIDS, indivíduos submetidos ao tratamento quimioterápico antineoplásico ou administração de imunossupressores. Haja vista que todas essas condições debilitam a imunidade mediada por células, percebe-se que a integridade desta é fator determinante para impedir o desenvolvimento dos sintomas clínicos da doença (DROMER et al., 2007; LIN et al., 2015; MAZIARZ & PERFECT, 2016). De fato, relatos de infecções clinicamente ativas por *C. neoformans* em pacientes imunocompetentes são raros, mesmo o fungo apresentando-se ubiquamente no ambiente e a exposição ao fungo descrita como relativamente comum (GOLDMANN, 2001; BARONI et al., 2006). Ademais, outras espécies de *Cryptococcus* tradicionalmente consideradas estritamente saprófitas e inócuas para humanos, como *C. laurentii* e *C. albidus*, são potencialmente infecciosas principalmente no contexto de imunocomprometimento (KHAWCHAROENPORN et al., 2007; SMITH et al., 2017).

O contágio ocorre através da exposição do hospedeiro a propágulos do fungo oriundos de uma diversidade de nichos ambientais – árvores, solo composto por material vegetal em decomposição e excreta de aves, considerada o principal reservatório urbano do fungo (BARONI et al., 2006; MAY, 2017). *C. neoformans* é predominantemente encontrado como

levedura haploide de reprodução por brotamento (assexuada), sendo esta sua forma patogênica, embora seja capaz de formar, no ambiente, hifas de acasalamento (BURT, 2000; BUTKIN, 2002; NILSEN & HEITMAN, 2007). Sem sucesso infeccioso, devido a suas grandes dimensões e capacidade imunoestimulatória, esse morfotipo filamentososo é responsável pela formação de esporos, formas compatíveis com a infecção, especialmente pela alta capacidade de penetração nos pulmões, atribuída ao seu pequeno diâmetro (1-2  $\mu\text{m}$ ). Juntamente com leveduras dessecadas, também de tamanho diminuto ( $\sim 3 \mu\text{m}$ ), são creditadas como as formas infectantes de *Cryptococcus* (NEILSON et al., 1981; VELAGAPUDI et al., 2009; WANG et al., 2012).

Após inaladas pelo hospedeiro, essas partículas ganham acesso aos alvéolos pulmonares, onde encontram fagócitos residentes, como os macrófagos alveolares. A partir deste estágio são possíveis diferentes resultados desta interação. Mais raramente, indivíduos imunossuprimidos podem desenvolver pneumonia e progredir para uma infecção disseminada. Acredita-se, contudo, que a maioria dos casos de criptococose causada por *C. neoformans* decorra de uma primo-infecção em indivíduos imunocompetentes. Uma fração destes seria capaz de montar uma resposta imune eficiente, eliminando o fungo e prevenindo a doença. O consenso é de que a maioria dos indivíduos é capaz apenas de elicitar uma resposta granulomatosa pulmonar de contenção, permitindo o estabelecimento de uma infecção latente assintomática que pode perdurar por vários anos (DROMER et al., 2011; BRUNET et al., 2018). Ocorrendo eventos de imunocomprometimento do hospedeiro, as leveduras então dormentes podem reativar, proliferar e disseminar via hematogênica virtualmente para qualquer órgão, preferencialmente o sistema nervoso central (SNC), e causar a meningite criptocócica (figura 1).

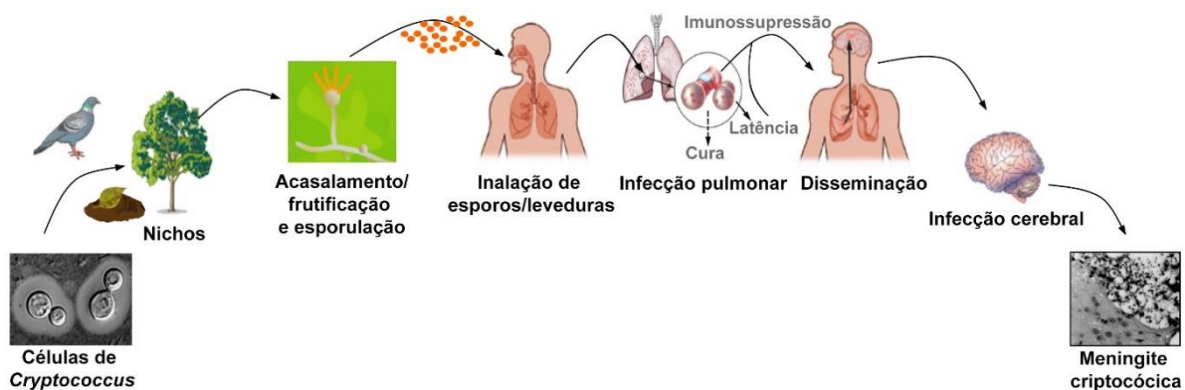


Figura 1. Esquema representativo do ciclo de infecção por *C. neoformans*. Adaptado de Xue et al., 2012.

Embora a criptococose seja causada majoritariamente pela espécie *C. neoformans*, uma parcela relevante das infecções (2 a 20%) tem sido atribuída ao patógeno primário *C. gattii* (MORGAN et al., 2006; FIRACATIVE et al., 2018). Regiões tropicais e subtropicais foram historicamente consideradas os confinadores desta espécie, estando esta restrição geográfica associada à sua baixa prevalência mundial. Porém, a ocorrência crescente de surtos no Canadá e nos Estados Unidos o ascendeu à categoria de patógeno fúngico emergente (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984; HARRIS et al., 2012). Similarmente a *C. neoformans*, *C. gattii* acomete tanto os pulmões quanto o SNC, e embora detectado de forma crescente em pacientes imunossuprimidos, ocorre essencialmente em hospedeiros imunocompetentes (SPEED & DUNT, 1995; FRANCO-PAREDES et al., 2015). Ainda que divergentes a nível epidemiológico e evolutivo, com um ancestral comum há cerca de 30 a 40 milhões de anos, essas espécies compartilham muitas características genótípicas e fenotípicas cruciais para a patogenicidade do fungo, como a produção de uma cápsula envoltória protetora essencialmente de natureza polissacarídica, exclusividade do gênero *Cryptococcus* dentre os fungos patogênicos conhecidos (XU et al., 2000; DOERING, 2000).

Tal componente fundamental de *Cryptococcus spp.* permitiu a classificação em quatro sorotipos baseada na propriedade imunológica capsular: A, D e o híbrido A/D pertencendo à espécie *C. neoformans*; e B e C à espécie *C. gattii*. Posteriormente, estudos genômicos ampliaram essa divisão: o sorotipo A foi subdividido em tipos moleculares VNI e VNII; o sorotipo AD em VNIII; o sorotipo D em VNIV; e os sorotipo B e C em VGI, VGII, VGIII e VGIV. Em termos de variedade, temos que os sorotipos A e D são designados como *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*, respectivamente (MEYER et al., 2009). Recentemente, Hagen e colaboradores (2015) propuseram a modificação das variedades de *C. neoformans* em duas espécies distintas, e a divisão de *C. gattii* em cinco espécies. Entretanto, tal sistematização baseada no critério de reconhecimento de espécies filogenéticas é considerada prematura e desaconselhada devido à limitação do conhecimento atual acerca da biodiversidade de *Cryptococcus* (KYUNG et al., 2017).

A variedade *grubii* detém a maior relevância clínica, exibindo maior virulência e sendo responsável por até 95% das infecções totais e 99% das associadas a AIDS (CASADEVALL & PERFECT, 1998; DROMER et al., 2007). O híbrido AD tem exibido experimentalmente dados contraditórios, com virulência intermediária ou superior aos

sorotipos haploides A e D, e responde por até 20% das infecções no continente europeu (LENGELER et al., 2001; CHATURVEDI et al., 2002; BARCHIESI et al., 2005; DROMER et al., 2007; HU et al., 2008). A América Latina e o Brasil acompanham a tendência mundial apresentando *C. neoformans var. grubii* como prevalente entre os isolados clínicos e ambientais, seguido de *C. gattii* (FIRACATIVE et al., 2018).

Outra aplicação da cápsula se dá no diagnóstico da criptococose. A principal técnica diagnóstica consiste na detecção de antígenos polissacarídicos da capsula no soro ou fluidos cerebrospinais pelo teste imunocromatográfico CrAg-LFA. O exame direto do fungo em fluidos corpóreos com tinta nanquim (evidenciador da cápsula) também é muito comum, além de cultura microbiológica ou análise histopatológica. Considerando a rápida progressão da meningite, a popularização desses exames e a crescente implementação da antigenemia criptocócica no monitoramento de pacientes considerados de risco, bem como, principalmente, a expansão de terapias antirretrovirais, colaboraram fortemente para a grande redução de óbitos ao longo da última década (MEYA et al., 2010; PERFECT & BICANIC et al., 2015; RAJASINGHAM et al., 2017).

O tratamento preconizado consiste na convencional administração, sozinha ou combinada, de um arsenal limitado a três antifúngicos: anfotericina B, 5-fluorocitosina e fluconazol. O primeiro é a base da terapia e a droga mais eficiente disponível, encontrando desvantagem em seu elevado custo e citotoxicidade, principalmente renal. Esta nefrotoxicidade é amenizada com o uso da sua forma lipossomal, e tem apresentado igual eficácia farmacológica à forma tradicional aliada a uma redução da frequência e quantidade das doses (HAMILL et al., 2010; PERFECT & BICANIC et al., 2015; MOLEFI et al., 2015; SANTOS-GANDELMAN & MACHADO-SILVA, 2019). Não obstante, estima-se que mais de 30% dos pacientes submetidos a um tratamento adequado falecem após apresentarem meningite criptocócica (RAJASINGHAM et al., 2017).

## 1.2. Os fatores de virulência de *C. neoformans*

A capacidade de *C. neoformans* causar doença (*i.e.* patogenicidade) depende primariamente das condições do hospedeiro, bem como também da expressão de determinados fenótipos facilitadores da colonização, proliferação e da patogenicidade, conhecidos como fatores de virulência (CROSS, 2008). De fato, fatores de virulência microbianos podem ser definidos como características expressas unicamente em hospedeiros susceptíveis, embora o conceito seja alvo de contínuo debate (CASADEVALL & PIROFSKI, 2001).

A expressão desses fatores de virulência é resultado da pressão seletiva da evolução, e paradoxalmente no caso de muitos patógenos ambientais, como *C. neoformans*, parece ter origem não no seu hospedeiro mamífero – no qual a infecção é acidental e dispensável ao seu ciclo de vida–, mas no próprio meio ambiente (CASADEVALL et al., 2003; CASADEVALL & PIROFSKI, 2007). Neste, *C. neoformans* encontra uma diversidade de condições adversas, não só abióticas como também bióticas, representadas por predadores de vida livre unicelulares como amebas (*Acanthamoeba sp.*) (CASADEVALL et al., 2019b) e paramécios (FRAGER et al., 2010), ou multicelulares como nematódeos (MYLONAKIS et al., 2002). Acredita-se que a exposição prolongada a esses estresses de seu ambiente natural levou à seleção de características vantajosas para a sua sobrevivência neste meio, aproveitáveis também no contexto da infecção humana (CASADEVALL et al., 2003).

No ambiente, a capsula protege as leveduras contra a dessecação, bem como da fagocitose e morte intracelular por *Acanthamoeba castellanii* (STEENBERG et al., 2001). Consistentemente, os mesmos benefícios são encontrados no desafio com macrófagos do hospedeiro e seus mecanismos microbicidas (*e.g.* produção de radicais livres), o que reforça a hipótese que seu modo de vida intracelular facultativo e expressão de fatores de virulência possa ter sido selecionada em decorrência da pressão seletiva exercida mediante a interação fungo-protozoário (VECCHIARELLI et al., 1994; ZARAGOZA et al., 2008; DERENGOWSKI et al., 2013; BOJARCZUK et al., 2016; CASADEVALL et al., 2019b). Além disso, a produção de polissacarídeos capsulares confere resistência a peptídeos antimicrobianos e ao antifúngico anfotericina B (ZARAGOZA et al., 2008). Por essas e outras características, a cápsula é considerada o principal fator de virulência de *C. neoformans*, conferindo ao gênero *Cryptococcus* um atributo exclusivo dentre os fungos patogênicos humanos (CASADEVALL et al., 2019a). A sua composição é basicamente de

natureza polissacarídica, atribuída à presença de glucuronoxilomanana (GXM), responsável por cerca de 92% da massa total da cápsula, que é complementada pela glucuronoxilomanogalactana (GXMgal) (CASADEVALL et al., 2019a). Manoproteínas constituem menos de 1% da massa capsular, e apresentam alta capacidade de estimular o sistema imune e promover respostas protetoras frente ao *C. neoformans* (LEVITZ et al., 2006). Entretanto, seus efeitos são antagonizados e suprimidos pelo predomínio da fração polissacarídica, que exerce além dos mecanismos defensivos mencionados anteriormente, outros ofensivos incluindo a alteração da expressão de moléculas coestimulatórias, desregulação da secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias e indução de apoptose em células apresentadoras de antígenos (APCs), bem como inibição da função e estímulo de morte de linfócitos T de forma dependente e independente de APCs (MONARI et al., 2005; VILLENA et al., 2008; PERICOLINI et al., 2009). Embora GXM e GXMgal apresentem efeitos sobrepostos, o estudo crescente da última vem apontando para a existência de uma atividade imunomodulatória mais potente e por vezes distinta, como a indução de uma resposta protetora Th17 (LAROCQUE-DE-FREITAS et al., 2018; DECOTE-RICARDO et al., 2019).

Embora a formação da cápsula seja crítica para a virulência de *C. neoformans* (CASADEVALL et al., 2019a), não garante sozinha o estabelecimento da infecção. Sabe-se que a espécie *Cryptococcus liquefaciens* apresenta uma cápsula de propriedades ultraestruturais e funcionais semelhantes à de *C. neoformans*. Contudo, é responsável por uma parcela irrisória dos casos de criptococose e considerada inócua ao ser humano, o que é ao menos parcialmente explicado por exibir um significativo atraso de crescimento à 37°C, característica inclusive que se estende a outras espécies não patogênicas de mesmo gênero (ARAUJO et al., 2012; ARAUJO et al., 2017). Este exemplo ilustra a importância da coexpressão de outros fatores de virulência, especialmente a capacidade de crescimento à temperatura humana, característica crucial compartilhada por fungos patogênicos a humanos. Estes somam menos de 0,01% das mais de 1.5 milhões de espécies estimadas de fungos, o que é atribuído essencialmente à essa termotolerância (ROBERT & CASADEVALL, 2009). Inclusive, a aquisição de termotolerância é motivo de grande preocupação atualmente devido à intensificação da pressão seletiva do aquecimento global, que pode ser associada à ascensão do patógeno fúngico emergente *Candida auris* (CASADEVALL et al., 2019c).

A capacidade de produzir o polímero de pigmentação escura denominado melanina é outro clássico fator de virulência compartilhado por muitos patógenos, e confere a *C. neoformans* proteção a uma ampla diversidade de condições: radiação ultravioleta, extremos de temperatura, drogas antifúngicas, peptídeos antimicrobianos, fagocitose e a importantes mecanismos microbicidas de fagócitos, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (WANG & CASADEVALL, 1994; WANG et al., 1995; ROSAS & CASADEVALL, 1997; DOERING et al., 1999; VAN et al., 2002; CASADEVALL et al., 2003). A melanização é um processo que ocorre na parede do fungo, depende da disponibilidade de substratos fenólicos no ambiente e no hospedeiro, como a L-DOPA, e é catalisada pela atividade da lacase (CASADEVALL et al., 2000). Estudos mostram que a deficiência de melanina, seja por deleção dessa enzima ou outros meios, como inibição química, repercute na sobrevivência de animais infectados com *C. neoformans* (KWON-CHUNG et al., 1982; SALAS et al., 1996; NOSANCHUCK et al., 2001).

A expressão de muitos destes fatores de virulência em *C. neoformans*, como a cápsula, depende essencialmente da atividade enzimática e sua fina regulação. Além disso, muitas dessas enzimas são secretadas, o que pode ser associado ao papel ambiental dos fungos na decomposição de macromoléculas, processo que por sua vez os garante nutrientes e a sobrevivência (figura 2) (ALMEIDA et al., 2015). A mesma recompensa ocorre por meio da degradação de moléculas do hospedeiro, e como resultado promovem danos celulares (CASADEVALL et al., 2018). Dentro desse arsenal enzimático, destacam-se proteases, que atuam na degradação de importantes componentes da resposta imune, como anticorpos e fatores do complemento, e da barreira hematoencefálica (BHE), promovendo a invasão cerebral (CHEN et al., 1996; VU et al., 2014); e fosfolipases, que danificam a membrana fosfolipídica do fagolisossomo, favorecendo a replicação no e o escape do macrófago por um mecanismo denominado exocitose não-lítica (COX et al., 2001; CHAYAKULKEEREE et al., 2011). Também observa-se a contribuição da atividade enzimática da urease na promoção desse importante mecanismo, presumivelmente por meio da indução da alcalinização do pH via catalização da hidrólise da ureia em amônia, reação que também permite ao fungo danificar células endoteliais da BHE facilitando a infecção do SNC (OLSZEWSKI et al., 2004; FU et al., 2018). A deficiência de quaisquer dessas enzimas se traduz na hipovirulência de *C. neoformans* na infecção de hospedeiros mamíferos (CHEN et al., 1996; COX et al.,

2001; OLSZEWSKI et al., 2004; CHAYAKULKEEREE et al., 2011; VU et al., 2014; FU et al., 2018).

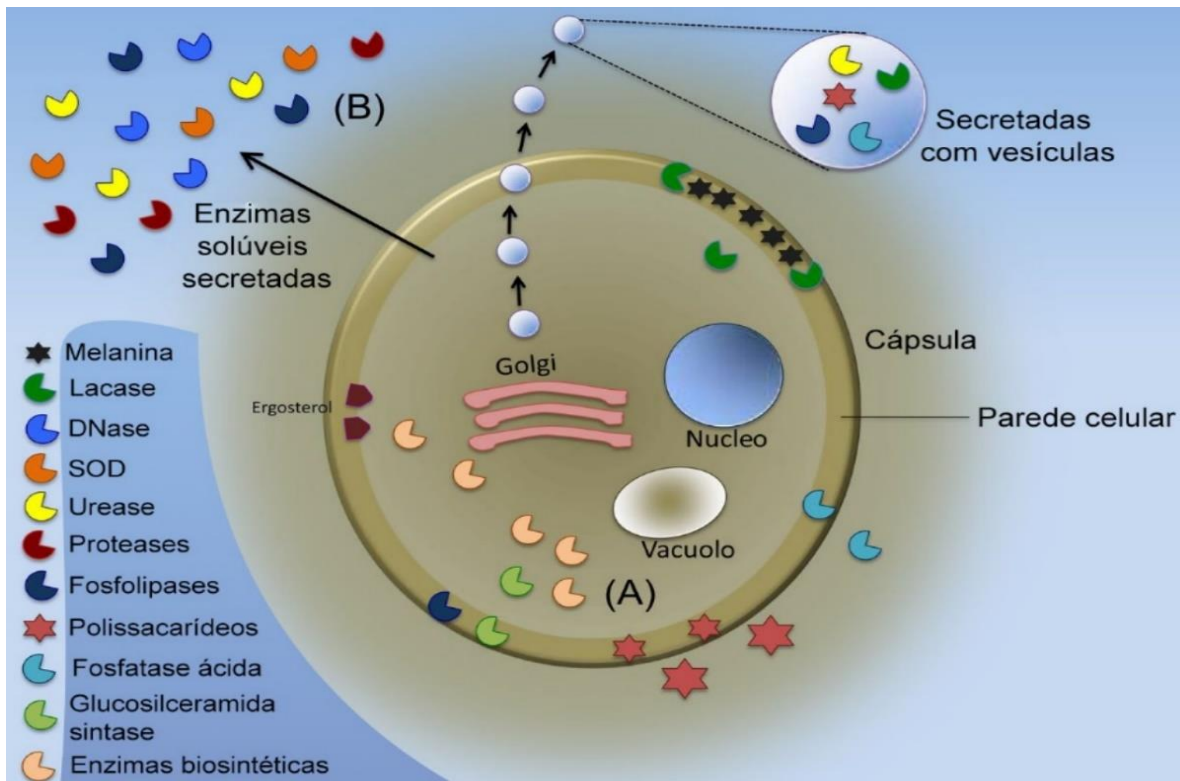


Figura 2. Fatores de virulência de *C. neoformans*. Adaptado de Almeida e colaboradores (2015).

Essas e outras enzimas, incluindo a lacase, são passíveis de secreção por meio de vesículas extracelulares (figura 2) (RODRIGUES et al., 2008; ALMEIDA et al., 2015). Estudos mostram um importante papel dessas vesículas desde a sobrevivência de *C. neoformans* na interação com *A. castellanii*, bem como no hospedeiro humano, modulando macrófagos, permeabilizando a barreira hematoencefálica para o acesso do fungo ao SNC, e comunicando um estado cooperativo entre leveduras de *C. gattii* de forma a promover a sobrevivência intracelular (OLIVEIRA et al., 2010; HUANG et al., 2012; RIZZO et al., 2017; BIELSKA et al., 2018).

*C. neoformans* apresenta no ambiente a formação de hifas engajadas na reprodução sexuada. Mediante o acasalamento pode ocorrer a produção de esporos de dois tipos, “a” ou “α”. Interessantemente, o tipo da célula formada afeta a virulência, uma vez que aqueles do tipo “α” predominam entre os isolados clínicos e apresentam maior tropismo para o SNC (KWON-CHUNG et al., 1978; NIELSEN et al., 2005; IDNURM et al., 2005).



### 1.3. A dormência microbiana

Seres de todos os domínios da vida, de procariotos a vertebrados, evoluíram convergentemente no desenvolvimento de mecanismos que os conferissem a habilidade de entrar em um estado não-proliferativo de reduzida taxa metabólica, por sua vez contribuindo para a sobrevivência sob certas condições ambientais desfavoráveis até a reativação do ser em condições mais adequadas (LENNON & JONES, 2011). Esse estado metabólico descrito define a dormência (ou latência) celular, um fenômeno extensamente relatado em microrganismos – muitos deles patogênicos – como bactérias (*e.g. Bacillus spp., Chlamydia spp., Legionella spp., Vibrio spp., Pseudomonas spp. e Mycobacterium tuberculosis*), modelo no qual é mais vastamente estudado, e protozoários (*Plasmodium spp. e Trypanosoma cruzi*) (LI et al., 2014; RICHTER et al., 2016; SÁNCHEZ-VALDÉZ et al., 2018).

No reino Fungi, tanto fungos leveduriformes (*e.g. Saccharomyces cerevisiae, Shizosaccharomyces pombe, Candida stellata*, e mais recentemente *C. neoformans*) quanto esporos de fungos filamentosos (*Aspergillus fumigatus e Neurospora crassa*) já foram demonstrados adentrarem o estado dormente, que por sua vez está intimamente relacionado à infecção latente, *i.e.*, quando o indivíduo está infectado mas não apresenta a doença ativa e sintomática. Considerando o extenso período entre a primo-infecção e o surgimento das manifestações clínicas de infecções fúngicas, juntamente à estreita associação entre esses sintomas e o imunocomprometimento do hospedeiro, é presumido que não somente as 10 espécies relatadas até hoje, como também muitas outras, integrem o rol de patógenos fúngicos passíveis de apresentarem o fenótipo dormente (AJELLO & POLONELLI, 1985; DIVOL et al., 2005; KASUGA et al., 2005; LAMARRE et al., 2008; SERPAGI et al., 2012; SALMA et al., 2013; BRUNET et al., 2018, HOMMEL et al., 2019).

O fenótipo dormente mais comum e de fácil identificação é o esporo, célula de morfologia característica, e que pode ser encontrada em uma diversidade de organismos, geralmente com função reprodutiva. Esporos são considerados as formas de vida mais resistentes do planeta, detentores de um metabolismo extremamente baixo, por vezes considerado nulo, e capazes de reversão para a forma vegetativa após a reintrodução de condições favoráveis ao crescimento, mesmo que precedida por até dezenas de milhões de anos de dormência (CANO et al., 1995; NICHOLSON et al., 2000; DWORKIN & SHAH, 2010; HUANG & HULL, 2017). Outros fenótipos são menos óbvios e mais complicados de

serem demonstrados. Na década de 40, durante experimentos com penicilina, foi observado que uma subpopulação de células de *Staphylococcus*, bactérias não esporuladas, manifestaram tolerância ao antibiótico ao retomarem o crescimento após a remoção deste, e foram, portanto, denominadas células persistentes (HOBBY et al., 1942; BIGGER, 1944). Essa tolerância é atribuída ao engajamento na dormência, e se deve à diminuída atividade metabólica e síntese de parede celular, que torna antibióticos com mecanismos de ação dependentes do metabolismo da célula-alvo ineficazes na lise das mesmas. Sem resistência genética ao antibiótico, a suspensão do tratamento era necessária para as células retornarem a um estado cultivável sem o comprometimento da viabilidade (BALABAN et al., 2004; AYRAPETYAN et al., 2018).

Posteriormente, em 1982, outra estratégia de sobrevivência baseada em dormência, de similar fisiologia celular e mecanismos moleculares compartilhados foi inicialmente descrita em células de *V. cholerae* e *Escherichia coli*, sendo as células que empregam essa estratégia denominadas células viáveis mas não cultiváveis (do inglês, *Viable but not culturable*, ou VBNC) (XU et al., 1982). Por definição, VBNC são células viáveis que perderam reversivelmente a habilidade de formar colônias em meios de cultura laboratoriais normalmente permissíveis ao seu crescimento (XU et al., 1982; LI et al., 2014). Segundo a hipótese da dormência contínua, a gênese dessas células estaria relacionada à de células persistentes, com VBNC representando um estado mais profundo de dormência – sem necessariamente serem derivadas de células persistentes. Esse maior engajamento de VBNC no processo de dormência poderia explicar a maior complexidade e exigência de um estímulo ambiental e/ou químico para o seu processo de reversão, ou o maior atraso deste comparado ao de células persistentes, características que distinguem um fenótipo do outro. Ademais, a população de células VBNC coexiste com células persistentes, costumando a primeira predominar durante o estresse promotor da dormência e até monopolizar culturas sob o estresse prolongado (figura 3) (LI et al., 2014; AYRAPETYAN et al., 2015; 2018).

Os estresses indutores da dormência são diversos, podendo variar dependendo da espécie ou serem comuns a muitas, como é o caso da escassez de nutrientes. Outros estresses conhecidos são: extremos de temperatura, reduzida oxigenação, níveis subótimos de pH e salinidade, e exposição a metais pesados, luz branca ou ultravioleta (LI et al., 2014). Além disso, os fenótipos de dormência podem ser induzidos por agentes antimicrobianos e, mais

importante, apresentarem-se tolerantes aos mesmos, incluindo antibióticos, como já mencionado (BIGGER, 1944; PASQUAROLI et al., 2013; AYRAPETYAN et al., 2015; 2018). Inclusive, acredita-se que esses fenótipos são potencialmente responsáveis por falhas de tratamentos e/ou recidivas, o que coloca mais ainda em evidência a necessidade do estudo dos mecanismos de indução e quebra da dormência (LAFLEUR et al., 2010; HU & COATES, 2012; LI et al., 2014; AYRAPETYAN et al., 2015; 2018).

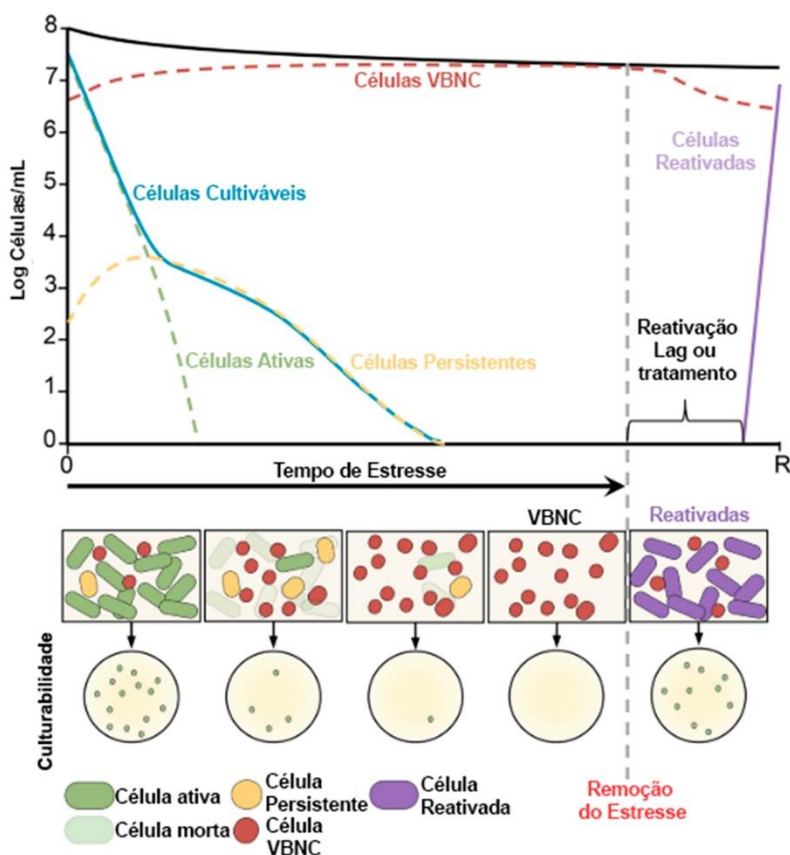


Figura 3. Dinâmica de indução e reativação de células persistentes e VBNC. Adaptado de Ayrapetyan e colaboradores (2018).

Durante a exposição a diferentes tipos de estresse, são observadas algumas reações celulares de adaptações típicas, e que são comuns a células VBNC. Inicialmente, as células cessam a proliferação concomitantemente à forte diminuição global dos processos de transcrição e tradução, que são processos celulares energeticamente dispendiosos (TRAXLER et al., 2008; AYRAPETYAN et al., 2018). Contudo, os processos de transcrição e tradução ainda persistem, mas sob uma nova reprogramação funcional, para otimizar a sua sobrevivência (HEIM et al., 2002; LAI et al., 2009; DE VERGILIO, 2012). Embora costumem apresentar severa redução da taxa respiratória e metabólica, o potencial de

membrana permanece alto e exibem incorporação de aminoácidos (RAHMAN et al., 1994; OLIVER, 2010). Observa-se também o acúmulo de glicogênio e triglicerídeos, reservas energéticas importantes para a manutenção da viabilidade (DE VIRGILIO, 2012). A nível estrutural, ocorre normalmente o encolhimento da célula e uma série de rearranjos das organelas e maquinaria celular (OLIVER, 2010; SAGOT & LAPORTE, 2019). O citoplasma transforma-se de uma fase mais fluida para uma mais rígida, com a formação neste de diferentes grânulos ribonucleoproteicos associados à repressão e degradação de transcritos de mRNA ou, alternativamente, à armazenagem e estabilização dos mesmos de forma a preparar a célula para um potencial retorno à normalidade metabólica (BUCHAN & PARKER, 2009; ANDERSON & KEDERSHA, 2009; KROSCHWALD et al., 2018).

Em alguns casos, a simples remoção do estresse promotor da dormência é o suficiente para levar à sua quebra (reativação ou ressuscitação). É o exemplo da reativação de células VBNC de *S. cerevisiae* induzidas por SO<sub>2</sub>, cuja concentração é dependente do equilíbrio do pH do meio. Mediante a alcalinização artificial deste, o conteúdo de SO<sub>2</sub> é depletado e as células então reativadas (SALMA et al., 2013). Efeitos análogos foram observados em modelo de indução com íons de cobre ou temperatura subótima (NILSSON et al., 1991; DWIDJOSISWOJO et al., 2011). Muitos estudos mostram a reativação de VBNC em meios ricamente nutritivos favoráveis ao crescimento (LI et al., 2014). Entretanto, a súbita re-exposição das células VBNC a meios ricos também pode ser deletéria, possivelmente devido à sensibilidade dessas células a radicais livres presentes no meio ou mesmo induzidos por este (CALCOTT & POSTGATE, 1972; MUKAMOLOCA et al., 2003).

Ainda, a reativação pode exigir estímulos específicos, sejam eles endógenos ou exógenos, cuja identificação a torna mais desafiadora, de forma que é estimado que metade dos patógenos humanos que entram no estado VBNC não foram provados ressuscitarem (LI et al., 2014). Não obstante, já foi demonstrado que, assim como na germinação de esporos dormentes, a reativação de células VBNC pode ocorrer via o reconhecimento de aminoácidos específicos (ATLURI et al., 2006; PINTO et al., 2011). Ademais, sabe-se que bactérias como *M. tuberculosis* secretam proteínas denominadas fatores promotores de ressuscitação (do inglês, *resuscitation-promoting factors*, ou Rpfs), que como o nome sugere promovem a reativação celular de um estado VBNC, exibindo atividade intra e interespecífica (SHLEEVA et al., 2004; GUPTA et al., 2010).

#### 1.4. A infecção criptocócica latente

A demonstração do fenótipo dormente VBNC em *C. neoformans* e de fatores envolvendo sua reativação só se deu bem recentemente, em 2019, por Hommel e colaboradores. Contudo, sugestões do vínculo entre latência (clínica) e a imunopatologia da criptococose, bem como do sítio de latência, remontam os estudos de autópsias iniciados por Baker e Haugen há cerca de 70 anos (BAKER, 1952; 1976; HAUGEN & BAKER, 1954; BAKER & HAUGEN, 1955). Ao analisarem cadáveres e por vezes excisões cirúrgicas, eles descreveram uma associação entre nódulos subpleurais e seus linfonodos drenantes com a infecção por *C. neoformans*. Muitos estudos de caso que se sucederam, incluindo tomográficos, confirmaram essa correlação (figura 4) (PATERSON et al., 1998; SWEENEY et al., 2003; ASAKURA et al., 2017).

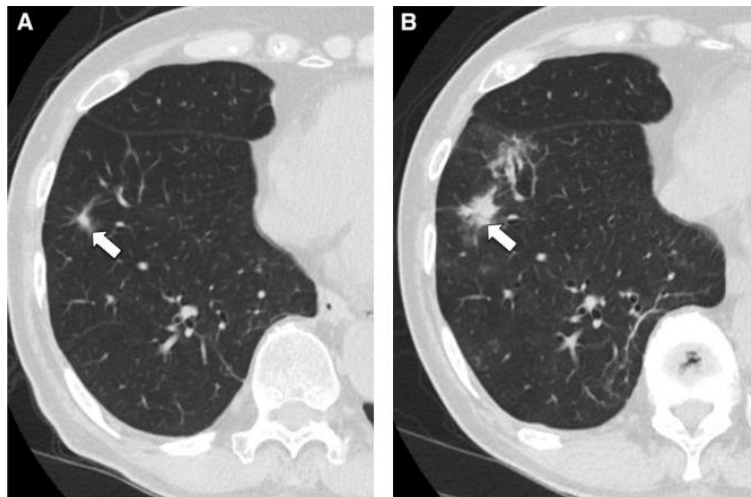


Figura 4. Tomografia computadorizada peitoral de paciente antes (A) e após (B) terapia imunossupressora exibindo, conforme apontado, um nódulo pulmonar solitário (A) que progrediu para múltiplas consolidações irregulares (B) positivas para a presença de *Cryptococcus*. Adaptado de Asakura e colaboradores (2017).

Baseados nessas evidências anatômicas, Baker e colaboradores propuseram a patologia da criptococose analogamente à da tuberculose. Nesse sentido, propágulos infectantes inalados iniciariam uma infecção pulmonar, frente a qual o hospedeiro montaria uma resposta imune granulomatosa contendo as leveduras em nódulos e linfonodos drenantes podendo eliminar o patógeno (cura) ou não. Neste último caso, a infecção persistiria em uma forma latente e sem elicitar sintomas clínicos até o comprometimento do sistema imune, como pela infecção com o HIV ou tratamento imunossupressor, levando à reativação da infecção e ao estado ativo e sintomático da doença (figura 5) (DROMER et al., 2011).

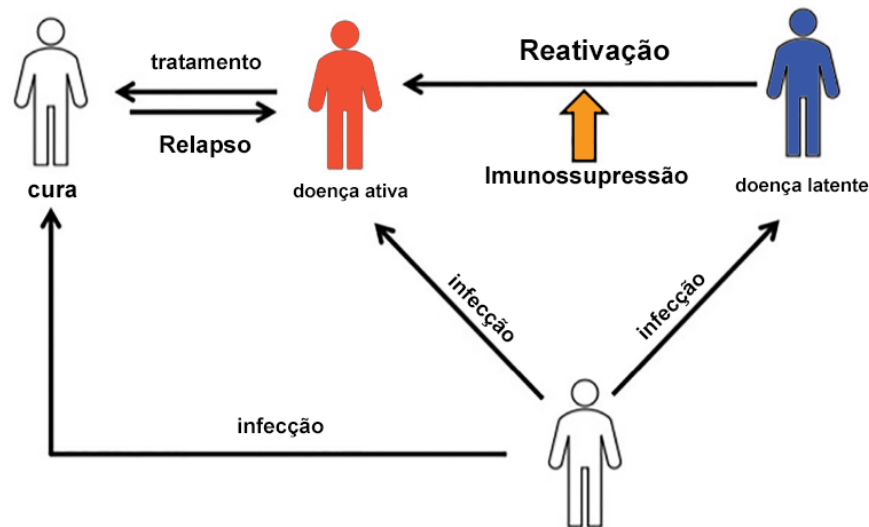


Figura 5. Esquema explicativo da reativação e relapso da infecção. Adaptado de Brunet e colaboradores (2018).

Não obstante, é admitido que outros sítios anatômicos para a infecção latente possam existir, como a próstata em homens (STAIB et al., 1990; DROMER et al., 2011). De fato, há um substancial acúmulo de relatos de casos descrevendo o envolvimento de componentes do trato urogenital, especialmente a próstata, durante a infecção criptocócica (STAIB et al., 1990; SHAH et al., 2017). Muitos deles mostram a persistência do fungo em tais sítios mesmo após a configuração de cura clínica obtida por meio do tratamento com antifúngicos de rotina (LARSEN et al., 1989; STAIB et al., 1990). Um dos relatos apontou que aproximadamente 30% dos pacientes que apresentaram relapso na meningite criptocócica, apesar de terapia antifúngica, exibiram culturas de fluidos urogenitais positivas (LUZZATI et al., 1998). Notavelmente, os dados da literatura tendem a apontar a associação da próstata mais como reservatório para casos de relapso da doença (e portanto não necessariamente sítio de infecção latente) do que casos de reativação, estando indefinida sua importância relativa nessas duas situações (LARSEN et al., 1989; BAILLY et al., 1991).

Cabe aqui uma diferenciação conceitual de reativação e relapso da infecção (figura 5). A reativação é marcada pela ocorrência de sintomas dentro de semanas a anos após uma infecção primária, podendo esta ser sintomática ou assintomática, e tratada ou não tratada. Já o relapso costuma surgir mais rapidamente após a infecção, e prescindir da alteração do estado imune do paciente. Mais importante, o relapso frequentemente resulta de falhas do tratamento, devido a razões como duração insuficiente deste ou baixa penetrabilidade da

droga no tecido infectado (BRUNET et al., 2018). Interessantemente, ainda mediante o tratamento prolongado e com altas doses de fluconazol, conhecidamente capaz de penetrar no tecido (interstício e estroma) e fluido prostático e alcançar a concentração terapêutica, verifica-se a persistência do fungo na próstata desses pacientes. Isso reforça, independentemente da natureza (relapso ou reativação) do sítio reservatório, a importância destes sítios alternativos ao pulmão na patologia da criptococose (LARSEN et al., 1989; BAILLY et al., 1991; LUZZATI et al., 1998).

Estudos sorológicos também têm se mostrado importantes para o entendimento da latência da infecção criptocócica, bem como da abrangência desse fenômeno na população e sua dinâmica temporal. Goldman e colaboradores (2001) mostraram que mais de 70% das crianças imunocompetentes acima de 5 anos – faixa etária com rara incidência de criptococose – apresentaram reatividade sorológica à antígenos de *C. neoformans*, sugerindo uma primo-infecção durante a infância (DROMER et al., 2011). Consistentemente, é comum a presença de anticorpos anti-*C. neoformans* em adultos, independentemente de sua condição imunológica (DESHAW & PIROFSKI, 1995; DROMER et al., 1998). Além disso, foi observado que metade dos pacientes submetidos ao transplante de órgãos e que posteriormente desenvolveram criptococose apresentaram reatividade de anticorpos para *C. neoformans* previamente ao procedimento cirúrgico, como também o desenvolvimento da doença significativamente mais cedo que aqueles pacientes com sorologia negativa ou baixa reatividade (SAHA et al., 2007).

Além de pistas clínicas para a infecção criptocócica latente, há também evidências, ainda mais persuasivas, de caráter epidemiológico, fornecidas por Garcia-Hermoso e colaboradores (1999) ao analisarem isolados clínicos de pacientes diagnosticados na França e oriundos de continentes distintos entre si. Dentre esses pacientes, 17 eram europeus e 9 expatriados africanos residentes na França há uma média de 110 meses e sem contato com o continente de origem por até 13 anos. Com base na similaridade entre os isolados por meio da análise por amplificação aleatória de sequências polimórficas de DNA (do inglês, RAPD), ou pela fragmentação deste por enzimas de restrição (do inglês, RFLP), os pesquisadores demonstraram que os isolados de indivíduos africanos eram semelhantes entre si, enquanto diferentes daqueles de pacientes europeus. O estudo indica que os pacientes desenvolveram

a doença como resultado de uma primo-infecção ocorrida anos antes. Outro estudo mais recente e com maior tamanho amostral chegou à mesma conclusão (BEALE et al., 2015).

Curiosamente, estudos epidemiológicos também têm apontado para a existência de infecção latente causada por alguns isolados de *C. gattii*, apesar deste estar tipicamente mais associado a infecções agudas primárias (DROMER et al., 1992; HAGEN et al., 2012; DROMER et al., 2011). Hagen e colaboradores (2012) levantaram uma possível ligação entre os genótipos desses isolados (VGIII e VGIV) e uma condição imune comprometida do hospedeiro, embora seja sabido ocorrer uma diversidade de patogenicidade mesmo entre esses genótipos (RODRIGUES et al., 2015).

Diferentes modelos animais de infecção criptocócica são fonte de evidências biológicas/experimentais que corroboram as demais evidências mencionadas acima acerca da infecção latente por *C. neoformans*. Goldman e colaboradores (2000) observaram que ratos infectados via intratraqueal apresentavam uma infecção pulmonar aguda seguida da drástica redução da carga fúngica, dando lugar a uma infecção sem sintomas aparentes, típica de hospedeiros resistentes à infecção criptocócica. Por meio da imunossupressão química induzida meses após a infecção primária, a infecção então contida – mas não eliminada – no sítio pulmonar foi capaz de disseminar sistemicamente. Esses resultados são semelhantes aos obtidos décadas antes por Gadebusch e Gikas (1964) com ratos e porquinhos-da-índia também por meio do uso de modelo de infecção pulmonar e tratamento com corticosteroides.

Os experimentos com animais também contribuíram em muito com pistas do sítio de residência intracelular de *C. neoformans*. Na infecção de camundongos, a maioria das leveduras inoculadas pode ser encontrada no ambiente intracelular ainda nas primeiras horas da infecção, sucedidas por um período de alternância entre o ambiente intra e extracelular (FELDMESSER et al., 2000). No curso prolongado, observa-se novamente o predomínio do parasitismo intracelular, acompanhado da formação de granulomas, mesmo padrão apresentado por ratos (FELDMESSER et al., 2000; GOLDMAN et al., 2000). Assim como na infecção humana, macrófagos e células gigantes multinucleadas são os principais componentes do granuloma formado, como também os fagócitos responsáveis por abrigar as leveduras e supostamente permitir o estabelecimento da infecção latente (CASADEVALL & PERFECT, 1998; FELDMESSER et al., 2000; GOLDMAN et al., 2000; SHIBUYA et al., 2005; DROMER et al., 2011; BRUNET et al., 2018).



Mais recentemente, Alanio e colaboradores (2015) conseguiram isolar a partir da infecção experimental de camundongos e uma linhagem imortalizada de macrófagos *in vitro* uma subpopulação de *C. neoformans* (H99, var. *grubii*) com características compatíveis à de células dormentes. As células isoladas dos pulmões e macrófagos apresentavam características metabólicas específicas (incluindo atividade mitocondrial aumentada e neoglicogênese diminuída) por meio de análise gênica e baixa resposta ao estresse de acordo com a fraca marcação com CMFDA, um marcador do antioxidante glutatona. Ademais, exibiram latência de crescimento, por sua vez passível de resgate por meio da adição de soro fetal. Interessantemente, não encontraram a correlação desses parâmetros com células de tamanho aumentado, compatível com o de células titãs, leveduras de *C. neoformans* de grande diâmetro e já propostas como de papel na dormência (ZARAGOZA & NIELSEN, 2013).

Recentemente, esse mesmo grupo de pesquisa, motivado a produzir grandes quantidades de células detentoras desse fenótipo dormente, conseguiu padronizar um protocolo para sua obtenção *in vitro* baseado na aplicação consecutiva dos estresses limitação de nutrientes e hipóxia (HOMMEL et al., 2019). Por meio da combinação de técnicas de avaliação de viabilidade por sondas usando citometria e microscopia, bem como metodologias para a análise de culturabilidade (*i.e.* capacidade da célula fúngica formar uma colônia), descreveram pela primeira vez o fenótipo de células VBNC em *C. neoformans*. Ademais, através de abordagens ômicas (proteômica, secretômica, metabolômica e transcriptômica) mostraram que essas células apresentavam um perfil específico, que ao lado de outras características observadas, se assemelhava ao perfil de células dormentes previamente isoladas de camundongos. Ainda, mostraram a possibilidade de reativação das células por meio do uso do ácido pantotênico (PA), molécula envolvida no *quorum sensing* e precursor de acetil-CoA (ALBUQUERQUE et al., 2013). Em suma, esse estudo abriu portas para a investigação da biologia de células dormentes ou mesmo da infecção criptocócica latente.

### 1.5. Resposta imune a *C. neoformans*

A evolução clínica da criptococose, especialmente a causada por *C. neoformans*, é dependente da higidez do hospedeiro e por conseguinte sua competência imunológica. De fato, a reativação da infecção latente e manifestação da doença ocorre tipicamente quando há o comprometimento da imunidade mediada por células. Paradoxalmente, a recuperação da imunidade também pode ser associada a piores prognósticos, como nos quadros de síndrome inflamatória de reconstituição imunológica (SIRI), o que exemplifica a complexidade da resposta imune na criptococose. Não obstante, a imunidade inata coloca-se na interface com os fungos e a imunidade adaptativa, representando a primeira linha de defesa e exercendo papel determinante no controle da infecção criptocócica. Sua versatilidade é reflexo de seus componentes celulares, engajados em funções de reconhecimento, quimiotaxia, ativação da resposta imune adaptativa e combate direto ao fungo. Essas funções são desempenhadas em maior ou menor grau por células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, entre outras, por sua vez também diferindo em papel e importância na criptococose (CAMPUZANO et al., 2018).

As células dendríticas são consideradas excepcionais células apresentadoras de antígenos (APCs), habilmente capazes de processar componentes do fungo, incluindo GXMgal e manoproteínas, apresentando-os a e ativando linfócitos T via complexo principal de histocompatibilidade II (MHC-II) e expressão de moléculas coestimulatórias como CD80/86 e a secreção de IL-12. Como resultado, orquestram respostas adaptativas protetoras frente à infecção criptocócica (figura 6) (PIETRELLA et al., 2005; LAROCQUE-DE-FREITAS et al., 2018; WOZNIAK, 2018). Além disso, são capazes de eliminar leveduras internalizadas por meio de componentes lisossomais, como a catepsina B, e mecanismos oxidativos (WOZNIAK et al., 2008; HOLE et al., 2012; CAMPUZANO et al., 2018).

Neutrófilos têm sido mais explorados quanto à sua capacidade antifúngica frente a *C. neoformans*, seja por mecanismos oxidativos ou não-oxidativos - que incluem calprotectina e defensinas (CHATURVEDI et al., 1996; MAMBULA et al., 2000) -, sendo ambos mecanismos encontrados em suas armadilhas extracelulares (NET) (ROCHA et al., 2015). Contudo, a presença dessas células não só é dispensável em respostas protetoras (WOZNIAK et al., 2012) como respostas neutrofílicas têm sido associadas ao aumento da carga fúngica e mortalidade em pacientes e camundongos (MEDNICK et al., 2003; OSTERHOLZER et al., 2009; MUSUBIRE et al., 2018).

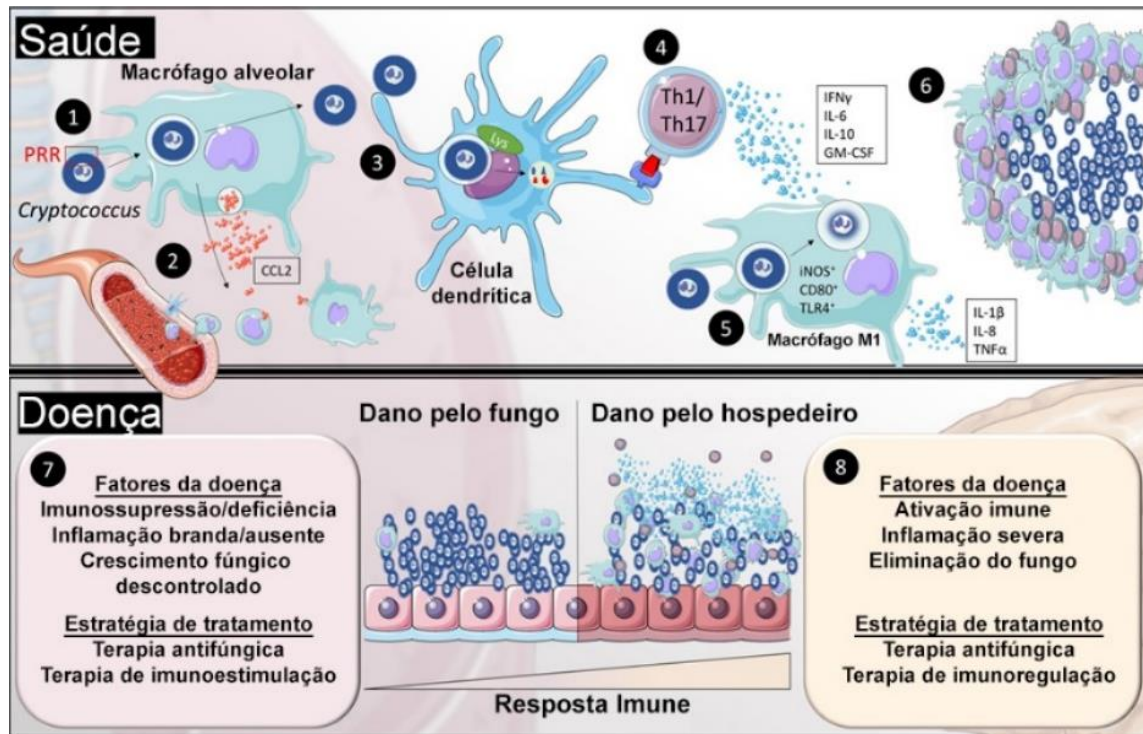


Figura 6. Resposta Imune na criptococose. Adaptado de Elsegeiny e colaboradores (2018).

Dentre os fagócitos, são os macrófagos as células mais relevantes e estudadas no contexto da criptococose. A dinâmica de interação com *C. neoformans* inicia desde a primo-infecção, quando macrófagos residentes, população leucocitária predominante nos alvéolos, reconhecem seus propágulos infectantes e os fagocitam, levando ao recrutamento de outros leucócitos por meio da produção de quimiocinas como CCL2, e à formação de uma resposta granulomatosa de contenção (figura 6) (LOHMANN-MATTHES, 1994; CAMPUZANO & WORMLEY, 2018).

Assim como para outros fagócitos, essa internalização é dependente de componentes do sistema complemento ou mediada pela ligação de anticorpos, praticamente inexistindo a fagocitose na ausência de opsonização (BOLANÕS & MITCHELL, 1989) devido a propriedades antifagocíticas de *C. neoformans* (JOHNSTON & MAY, 2013; BOJARCZUK et al., 2016). A fagocitose é sucedida pela compartimentalização do fungo nos fagossomos, que passam por um processo de maturação concomitantemente à sua fusão com lisossomos, acidificação e alteração de componentes internos e de sua membrana (figura 7). Neste ambiente, o fungo é exposto a mecanismos antifúngicos não oxidativos, como enzimas

hidrolíticas, e oxidativos, representados por espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (principalmente o óxido nítrico ou NO) (GARCÍA-RODAS & ZARAGOZA, 2012).

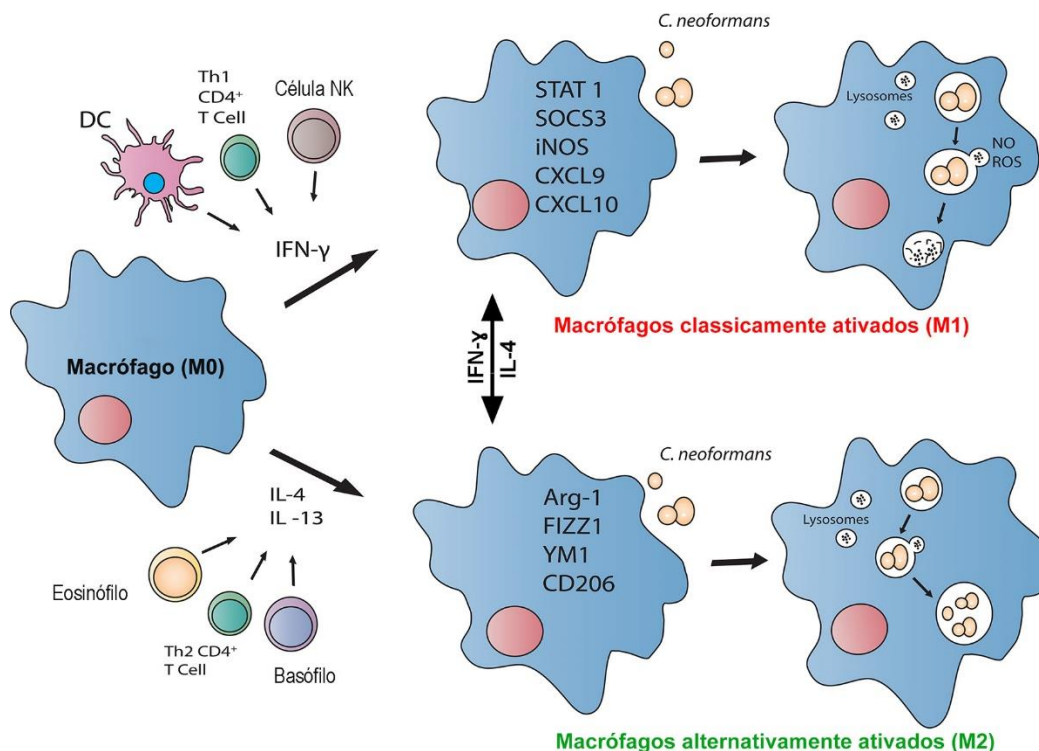


Figura 7. Plasticidade fenotípica do macrófago na criptococose. Adaptado de Wager e Wormley (2015).

Por sua vez, mediante a expressão de diversos fatores de virulência mencionados anteriormente, *C. neoformans* é capaz de resistir a esses mecanismos microbicidas promovendo: a perturbação da maturação do fagolisossomo, ao dificultar a acidificação, fluxo de cálcio, e atividade proteolítica (SMITH et al., 2015; FU et al., 2018); danos à membrana do fagolisossomo (TUCKER et al., 2002; DAVIS et al., 2015); e sequestro e neutralização de ROS e NO (WANG et al., 1995; CHATURVEDI et al., 1996; DE JESÚS-BERRÍOS et al., 2003). Além disso, suas leveduras são também capazes de tolerar o baixo pH do fagolisossomo, e exibem melhor crescimento nesse do que quando a alcalinização é induzida experimentalmente (LEVITZ et al., 1999). No fagolisossomo subvertido, o fungo evita a vigilância imune e células competentes na sua eliminação, e é capaz de sobreviver e proliferar, caracterizando-o como um patógeno intracelular facultativo (FELDMESSER et al., 2000).

Assim, estudos em diferentes modelos animais indicam que a permanência do fungo no hospedeiro está intimamente relacionada ao abrigo intracelular fornecido pelo macrófago,

creditado como provável sítio celular da infecção criptocócica latente (GOLDMAN et al., 2000; FELDMESSER et al., 2000; DROMER et al., 2011). Essa teoria foi reforçada pela demonstração da existência de uma pequena população de leveduras exibindo fenótipo de dormência durante a infecção de uma linhagem de macrófagos murinos imortalizados (ALANIO et al., 2015).

Entretanto, considerando a reativação e/ou prosseguimento e disseminação da infecção, a etapa de residência intracelular é temporária, e resulta no retorno do fungo à matriz extracelular mediante diferentes mecanismos. Os mecanismos de escape incluem a exocitose lítica, que leva à lise e morte do macrófago; e a exocitose não lítica, sem prejuízo para nenhuma das células em interação, prevenindo alarmar o sistema imune do hospedeiro. A transmissão das leveduras entre macrófagos adjacentes também é uma possibilidade, e evita sua exposição ao ambiente extracelular (WAGER et al., 2016). É hipotetizado que essa habilidade do fungo em parasitar transientemente o macrófago contribua para a sua migração para o SNC carregado por esse último, que é abandonado após o atravessamento da BHE. Esse mecanismo é conhecido como cavalo de Tróia (CHARLIER et al., 2009). Além deste, mecanismos alternativos para a invasão do SNC são admitidos (CHANG et al., 2004; OLSZEWSKI et al., 2004).

Nesse contexto, macrófagos apresentam um papel imunológico paradoxal na infecção por *C. neoformans*, atuando tanto na contenção e eliminação do fungo, quanto contribuindo para a sua persistência, proliferação e disseminação no hospedeiro (MCQUISTON & WILLIAMSON, 2012). De fato, embora a depleção de macrófagos alveolares resulte no agravamento da infecção em ratos (SHAO et al., 2005), em camundongos leva à redução da carga fúngica pulmonar e cerebral, bem como da severidade da doença (SHAO et al., 2005; KECHICHIAN et al., 2007; CHARLIER et al., 2009). Considerando as diferenças de susceptibilidade entre ratos e camundongos, avaliados como hospedeiros resistentes e susceptíveis à criptococose, respectivamente, esses estudos em conjunto sugerem que a proteção frente à infecção criptocócica reside na adequada ativação dos macrófagos. Evidências crescentes indicam que essa adequada ativação ocorre no contexto da polarização M1/M2 (WAGER et al., 2016).

Macrófagos são células de alta plasticidade fenotípica e funcional, passíveis de modulação por estímulos ambientais, sejam eles exógenos (*e.g.* microrganismos e seus

componentes) ou endógenos (*e.g.* citocinas) (figura 7). Nesse sentido, um microambiente composto predominantemente de citocinas de um perfil pró-inflamatório, com IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$ , levam a ativação clássica de macrófagos, associada a uma otimizada produção de ROS e NO, superior capacidade fungicida e controle da infecção criptocócica, sendo esses macrófagos denominados M1 (VOELZ et al., 2009; DAVIS et al., 2013, 2015). Experimentos com leveduras de *C. neoformans* engenheiradas para a expressão dessas citocinas no curso da infecção têm corroborado essa visão (WAGER et al., 2018; FA et al., 2019). Na infecção por leveduras selvagens, essas citocinas são produzidas principalmente por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) e células NK (ZHANG et al., 1997; NEAL et al., 2017). Macrófagos M1 podem ser identificados por marcadores como INOS, supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3) e o transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1) (WILSON et al., 2014; WAGER et al., 2016).

Divergentemente, a exposição de macrófagos a citocinas como IL-4 e/ou IL-13 direciona para a ativação de um fenótipo alternativo conhecido como M2 (figura 7). Neste estado, macrófagos apresentam reduzida atividade microbicida, permitindo a proliferação intracelular e disseminação do fungo (VOELZ et al., 2009; DAVIS et al., 2013). Os marcadores deste fenótipo incluem a expressão do receptor de manose (CD206) e a arginase-1, enzima que compete pelo substrato da INOS, arginina, consequentemente afetando a produção de NO e citrulina. Por outro lado, a atividade da enzima resulta na produção de L-ornitina e ureia (RATH et al., 2014; WAGER et al., 2016).

Esses dois fenótipos coexistem no hospedeiro, podendo os macrófagos transitarem de um para o outro (figura 7). De fato, o predomínio da população de células M1 ou M2 alterna no curso da criptococose, sendo o deslocamento para uma polarização M2 acompanhado da piora do quadro da doença (ARORA et al., 2011; DAVIS et al., 2015). Consistentemente, a indução da deficiência de citocinas da resposta Th1 por meio da inativação gênica ou neutralização por anticorpos leva a uma redução da sobrevivência de camundongos infectados (HOAG et al., 1997; DECKEN et al., 1998; CHEN et al., 2005).

Por sua vez, *C. neoformans* é capaz de interferir e influenciar na modulação dessas respostas no hospedeiro, geralmente induzindo a resposta não protetora Th2 por meio da expressão de fatores de virulência como urease e lacase (OSTERHOLZER et al., 2009; QIU et al., 2012; WANG et al., 2015). Não obstante, acredita-se que a presença concomitante de

elementos da resposta Th2 seja favorável no curso da doença ao contrabalancear uma resposta Th1 excessiva (COELHO et al., 2014; GRAHNERT et al., 2014; SATO et al., 2015).

Assim, a resposta imune na criptococose é complexa e ainda relativamente pouco compreendida. Primeiramente, extrapola a histórica dicotomia Th1/Th2, com descrições mais recentes da participação de outras respostas como a Th17. Essa resposta é mediada pela produção da citocina IL-17 em resposta a outras como IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF $\beta$  e IL-23, contribuindo para o controle da carga fúngica juntamente à resposta Th1, embora na presença desta última seja dispensável (ZHANG et al., 2009; WOZNIAK et al., 2011; LAROCQUE-DE-FREITAS et al., 2018). Além disso, evidências clínicas e experimentais têm se acumulado no sentido de apontar a patologia da criptococose, em uma parcela dos casos, como decorrente da própria exacerbação de respostas imunes e seus mecanismos concebidos tradicionalmente como adequados e benéficos ao hospedeiro (PIROFSKI & CASADEVALL, 2017). Esse paradoxo é evidenciado por casos de pacientes com infecções concomitantes por *C. neoformans* e HIV que manifestaram SIRI após o início da terapia antirretroviral (TARV), e representam de 10 a 20% dos pacientes com meningite associada ao HIV (BICANIC et al., 2009; TENFORDE et al., 2017). Nesses pacientes, observa-se a ativação robusta de uma resposta Th1, produção de IFN- $\gamma$  e dano neurológico acentuado (BICANIC et al., 2009; MEYA et al., 2015, 2016).

Essa resposta paradoxal não é restrita a pacientes HIV+, e pode ser observada de forma semelhante mediante a redução de terapia imunossupressora, sendo denominada síndrome da resposta inflamatória pós-infecciosa (SRIPI) (PANACKAL et al., 2015; WILLIAMSON et al., 2015). Experimentos conduzidos com camundongos imunodepletados de células T auxiliares ou camundongos deficientes de RAG-1 reconstituídos dessas células corroboraram o envolvimento de células TCD4<sup>+</sup> na patogênese dessas síndromes inflamatórias (ESCHKE et al., 2015; NEAL et al., 2017).

Dessa forma, se em um extremo da doença constituído de fraca ou inadequada (Th2) resposta imune os danos teciduais são causados pela expressão de fatores de virulência e proliferação desenfreada do fungo (revisado em CASADEVALL et al., 2018), o extremo oposto é caracterizado pelo dano associado a hiperativação da resposta imune Th1/Th17 (figura 6) (PIROFSKI & CASADEVALL, 2017). Esses danos auto infligidos pelo hospedeiro podem ser gerados por mecanismos clássicos de resistência a microrganismos

(*e.g.* NO, ROS e enzimas proteolíticas) quando estes são acompanhados de necrose, deposição anormal de colágeno, fibrose tecidual ou formação de edemas, podendo assim comprometer o funcionamento adequado do órgão (CHEN & NUÑEZ, 2010; SHURIAN & QURESHI, 2019). Haja vista que os órgãos acometidos geralmente apresentam baixa capacidade regenerativa, como pulmões e cérebro, é frequentemente benéfico ao hospedeiro que tais mecanismos de resistência sejam assistidos e equilibrados por mecanismos de tolerância (*e.g.* secreção de IL-10, exaustão de células T efetoras ou indução de sua subpopulação T regulatória). Assim, ocorre o amortecimento dos danos, manutenção da homeostase tecidual e funcionalidade do órgão, mesmo que às custas do comprometimento da capacidade de contenção da carga fúngica (SHURIAN & QURESHI, 2019).

A resposta imune, protetora ou não, é iniciada e coordenada a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a danos (DAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) distribuídos na superfície celular e em sítios intracelulares dos fagócitos. Embora a cápsula envoltória de *C. neoformans* obstrua o reconhecimento de PAMPs da parede celular, os próprios constituintes da cápsula podem interagir com e ativar receptores, como é o caso do GXM e os receptores do tipo Toll TLR2 e TLR4 (SHOHAM et al., 2001). Enquanto a ligação a este último não surte efeito na produção de citocinas ou na resposta frente a *C. neoformans*, o engajamento de TLR2 leva à promoção de citocinas do perfil Th1, bem como a redução da carga fúngica pulmonar e atraso da mortalidade de camundongos (YAUCH et al., 2004; BIONDO et al., 2005). O receptor TLR9, ligante de DNA genômico de *C. neoformans*, também elicitava um perfil Th1 e o recrutamento leucocitário, refletindo em uma maior resistência à infecção criptocócica pulmonar murina (NAKAMURA et al., 2008; QIU et al., 2012).

Dentre os receptores de lectina do tipo C (CLRs), apenas o receptor de manose tem demonstrado papel protetor frente à infecção criptocócica, sendo sua deficiência atrelada ao aumento da carga fúngica pulmonar e à aceleração da morte em ensaios de sobrevivência (NAKAMURA et al., 2007, 2015; CAMPUZANO et al., 2017; DAN et al., 2008). Entretanto, outros integrantes dessa família, como dectina-1 e dectina-2, podem contribuir em processos como a fagocitose, bem como na modulação para a produção de citocinas do perfil Th1, no caso desse último (NAKAMURA et al., 2015; LIM et al., 2018).



O receptor citosólico NLRP3, pertencente à família NOD, também já foi descrito como importante na resposta anti-criptocócica. Quando ativado em resposta a PAMPs ou DAMPs, esse receptor medeia a montagem de uma plataforma enzimática multiproteica denominada inflamassoma, que regula a maturação e secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18 (KELLEY et al., 2019). A deficiência de receptores para essas citocinas ou de componentes do complexo do inflamassoma leva ao aumento da carga fúngica e à redução da sobrevivência de camundongos infectados com *C. neoformans* (WANG et al., 2011; LEI et al., 2013; SHOURIAN et al., 2018).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral:**

Considerando a importância da infecção latente na patofisiologia da infecção de *C. neoformans*, este trabalho visa investigar sítios reservatórios alternativos para a infecção criptocócica latente em modelo animal, bem como esclarecer o papel dos macrófagos na manutenção e/ou reativação da dormência de leveduras de *C. neoformans*.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- Caracterizar fenotipicamente linhagens transformantes fluorescentes de *C. neoformans*;
- Avaliar a aplicabilidade de linhagens fluorescentes como ferramenta para o estudo da dormência em *C. neoformans*;
- Avaliar e caracterizar o uso de linhagens transformantes fluorescentes em ensaios de interação com macrófagos murinos;
- Estudar a dinâmica da disseminação de *C. neoformans* em modelo experimental murino;
- Analisar a resposta transcriptômica do macrófago murino na interação com leveduras dormentes ou não-dormentes de *C. neoformans*;
- Investigar o efeito de diferentes perfis de ativação de macrófagos na manutenção ou reativação de leveduras dormentes de *C. neoformans*.

### **3. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO E USO DE LINHAGENS FLUORESCENTES PARA ANÁLISE DA INTERAÇÃO *CRYPTOCOCCUS*-HOSPEDEIRO**

A fim de aperfeiçoar metodologias para o estudo da interação patógeno-hospedeiro no contexto da criptococose, nosso grupo de pesquisa desenvolveu linhagens fluorescentes repórteres de *C. neoformans*. Dados anteriores do laboratório detectaram a presença de unidades formadoras de colônias na medula óssea de camundongos após uma infecção pulmonar experimental com *C. neoformans*. A partir deste resultado, despertamos interesse na investigação de sítios reservatórios para a infecção criptocócica latente, tema que ainda hoje é alvo de debate, e será abordado no próximo capítulo desta tese.

Haja vista que a colonização do órgão é o primeiro passo na formação de um sítio reservatório, decidimos lançar mão do uso de cepas fluorescentes no rastreamento da disseminação de *C. neoformans* no hospedeiro murino. Previamente, entretanto, foi necessário a caracterização/validação das linhagens fluorescentes quanto à expressão dos diversos fenótipos de *C. neoformans*, incluindo a dormência, bem como a aplicabilidade em ensaios de interação com o hospedeiro ou seus componentes celulares, temas deste capítulo.

#### **3.1. Materiais e métodos**

As etapas referentes à construção das linhagens transformantes e os testes iniciais de fenótipos e fatores de virulência de *C. neoformans* foram realizados pelo estudante de iniciação científica Marco Tulio Aidar, sob a supervisão da prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Fernandes, integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) (AIDAR et al., 2017).

##### **3.1.1. Condições de cultivo de *C. neoformans***

As linhagens de *C. neoformans* selvagem, H99 (variedade *grubii*) e seus mutantes construídos foram cultivadas a 30°C sob agitação de 100-180 rpm em meio YPD líquido (extrato de levedura 1%, glicose 2% e peptona 2%) ou sólido (ágar 2%) com pH = 5,6. *Escherichia coli* foi cultivada sob agitação de 150-200 rpm em meio LB líquido (peptona 1%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 1%) e sólido (ágar 1,5%) com pH = 7,2.

### 3.1.2. Meios de cultivo para testes de fenótipo e fatores de virulência

As linhagens transformantes foram testadas quanto à expressão de fatores de virulência e características fenotípicas nas seguintes condições: estresse osmótico (1,5M NaCl), estresse na parede celular (0,5% Congo Red e 0,05% SDS), estresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), formação de cápsula (Sabouraud ácido diluído em MOPS), produção de melanina (*Niger Seed Agar*), urease (*Christiansen's Urea Agar*), fosfolipase (solução com emulsão de ovo diluído em 1:1 com PBS a 8% no meio) e acasalamento (*Agar Filament*). As culturas de *C. neoformans* foram lavadas duas vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) após 24 h de crescimento a 37°C sob agitação de 150 rpm e ajustadas para 2x10<sup>8</sup> células/ml. Os inóculos para avaliação da formação de colônias nos meios estressores foram feitos a partir de uma suspensão de fungo a 2x10<sup>8</sup>, decaindo a concentração até 2x10<sup>3</sup> células/ml. Para os testes de fatores de virulência foram usadas as concentrações de 2x10<sup>7</sup> células/ml para cada cepa testada. A quantificação da espessura da cápsula (diâmetro total celular – diâmetro do corpo celular delimitado pela cápsula) foi avaliada por meio do uso de tinta nanquim e observação de 50 células por microscopia de luz.

### 3.1.3. Construção dos plasmídeos

Os genes *HIS3* e *PAB* foram obtidos por PCR a partir do DNA genômico de *C. neoformans* de linhagem selvagem H99 variedade *grubii*. A reação de amplificação foi realizada com volume final de 25 µl contendo: 50 ng de gDNA template, 1X OneTac Polimerase MasterMix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) e 0,4 µM de cada primer (LF498/LF499 e LF502/503) para obtenção dos genes *HIS3* e *PAB* que possuam extremidades com sítios de restrição para BamHI. Foram utilizados os seguintes ciclos de temperaturas: desnaturação inicial de 94°C por 30 s, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s cada, anelamento a 55°C por 30s, extensão de 68°C por 3 min e extensão final de 68°C por 10 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados a partir de gel de agarose 1% e QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Crawley, UK).

Tabela 1. Primers utilizados.

Oligo	Alvo	Nome	Sequência	Tamanho do fragmento
1	5' HIS3BHI	LF498	CTAGGATCCATGGCCCGAACGA AGCAGACC	0,856kb
2	3' HIS3BHI	LF499	CTAGGATCCGATAGTCGCCATC AGCCAGTC	
3	5' PABBHI	LF502	CTAGGATCCATGTCCGTCGAAA CCGCTACAT	3,2kb
4	3' PABBHI	LF503	CTAGGATCCGGGTGTTGAGGCC TGTGAGTA	
5	5' HIS3ClaI	LF512	GGTTCGACGGTATCGATGTGTGG AATTGTGAGCGGATA	2,2kb (HIS3GFP/mCherry)
6	5' HIS3SacII	LF513	TGGAGCTCCACCGCGGCTTCAT GGCTCCTTGTCTCTG	4kb (PABGFP/mCherry)
7	3' HIS3SpeI	LF514	CCGCTCTAGAAGTCTTCAT GGCTCCTTGTCTCTG	1,5kb (GFPØ)
8	5' NSL_Neo	LF226	CCGGCTTCCATCCGAGTA	1,5kb (mCherryØ)
9	3' GFP_R	Fp63	CTACATCTCTTCCGTGTTAATAC	1,5kb (HIS3)
10	5' NSL_hph	LF28	GCGGGAGATGCAATAGGTCAG	2kb(mCherryØ)
11	3' MCHERRY_R	Fp59	CTACATCTCTTCCGTGTTAATAC	HG – 3,9kb PG – 5,9KB GØ – 3,0KB (Usando Fp63)
12	5' hisH3FBamHI	LF22	TCGGATCCGTTATCGATGAGAA GACTCG	HG – 2,1kb PG – 4,7KB GØ – 1,2KB (Usando LF22)

A clonagem foi realizada no plasmídeo pGEMTeasy (3000bp) após a obtenção dos genes com as extremidades restritivas de interesse. Para clonagem em pGEMTeasy foi utilizada uma proporção de 1:3 em relação à quantidade de inserto por reação, ou seja, para 25 ng de pGEMTeasy foi usado 21 ng de HIS3BHI (856bp) e 67 ng de PABBHI (2678bp), em uma reação contendo: 1X Tampão T4 DNA Ligase (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA), 1  $\mu$ M ATP, 1 U T4 DNA ligase, para um volume final de 20  $\mu$ l, incubado a 4°C durante à noite (OV, *overnight*). Em seguida, os plasmídeos contendo os genes de interesse foram transformados em *E. coli* DH5 alfa por choque térmico, de acordo com o protocolo de Hall&Frøger (2007). As colônias brancas de *E. coli* resultantes da transformação foram inoculadas em meio LB líquido para posterior miniprep e obtenção dos plasmídeos com os

insertos. A inserção foi confirmada por gel de agarose 1% e digestão do plasmídeo com BamHI em uma reação de 3 µg plasmídeo, 1X Tampão CutSmart (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA), 5 U BamHI-HF para um volume final de 20 µl.

A obtenção dos insertos de HIS3BHI se deu por digestão com 20U BamHI-HF, 1X Tampão CutSmart e 20 µg plasmídeo num volume final de 20 µl e PABBHI com 10 U BamHI, 10U BSAI, 1X Tampão CutSmart e 12 µg de plasmídeo num volume final de 30 µl. Os plasmídeos pCN50 (O' Meara et al., 2010) e pCN51 (Charpentier et al., 2004) que possuem os genes de GFP e mCherry, respectivamente, previamente obtidos por miniprep, foram digeridos com a mesma reação de 20 U BamHI-HF, 1X Tampão CutSmart e 20 µg plasmídeo num volume final de 20 µl e desfosforilados numa reação de 1 pmol plasmídeo, 1X Tampão de reação Antarctic Phosphatase (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA), 5 U Antarctic Phosphatase para um volume final de 20 µl, incubado a 37°C por 30 min e a 80°C por 2 min para parar a reação. Os insertos e os plasmídeos desfosforilados foram purificados com QIAquick Gel Extraction Kit. A reação de ligação entre os plasmídeos pCN50 (7000bp), pCN51 (6800bp) desfosforilados e os insertos se deu na proporção de 1:5 em relação aos insertos e se deu por 50 ng vetor, 1X Tampão T4 DNA Ligase, 1,5 µl ATP, 1 U T4 DNA ligase, 22 ng HIS3BHI e 95,5 ng PABBHI para um volume final de 15 µl, incubado a 4°C ON. Após a ligação, foram feitas transformações por choque térmico em *E. coli* e novas minipreps para obtenção dos plasmídeos.

Para verificar a orientação do inserto, foram feitas digestões com enzimas de restrição específicas. pCN50/HIS3 (banda esperada de 1560bp) e pCN50/PAB (banda esperada de 1760bp): 5 U KpnI, 1X Tampão CutSmart, 10 µg de plasmídeo em um volume final de 20 µl; pCN51/HIS3 (banda esperada de 1581bp): 5 U HindIII, 1X Tampão CutSmart, 10µg de plasmídeo em um volume final de 20 µl; pCN51/PAB (banda esperada de 5179bp): 5U BglIII, 1X NEBuffer™ 3.1 (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA), em um volume final de 20µl. Todas as bandas esperadas foram verificadas por gel de agarose 1% e visualizadas sob luz ultravioleta.

As construções *HIS3-GFP*, *PAB-GFP*,  $\emptyset$  GFP, *HIS3-mCherry* e  $\emptyset$  mCherry foram obtidas a partir de PCR. As reações foram feitas com 50 µl de volume final contendo: 50 ng DNA template, 1X MasterMix Taq LongAmp™ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA), 0,2 µM de cada primer (LF512/LF513 para *HIS3-GFP*, *PAB-GFP* e  $\emptyset$  GFP; LF512/LF514

para *HIS3-mCherry* e  $\emptyset$  *mCherry*) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por 1min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg cada, anelamento de 59°C por 1 min, extensão a 65°C por 4 min e extensão final a 64°C por 10 min. A construção *PAB-mCherry* foi obtida a partir de digestão na seguinte reação: 10 µg DNA template, 10 U HindIII-HF, 10U SpeI, 1X Tampão *CutSmart* e incubada a 37°C ON em um volume final de 20 µl. Os cassetes obtidos foram inseridos nos plasmídeos pSDMA57 (marca de resistência para Neomicina) e pSDMA58 (marca de resistência para Higromicina B) (ARRAS et al., 2015) por possuírem tais marcas de resistência, sendo clonados os insertos contendo os genes de *GFP* e *mCherry*, respectivamente. O plasmídeo pSDMA57 foi digerido com enzimas de restrição em reação contendo: 20 µg plasmídeo, 20 U SacII, 20 U ClaI, 1X Tampão *CutSmart* e incubada a 37°C ON, em um volume final de 40 µl para posterior recombinação com os cassetes *HIS3-GFP*, *PAB-GFP*,  $\emptyset$  *GFP*. O plasmídeo pSDMA58 foi digerido com enzimas restrição em reação contendo: 10 µg plasmídeo, 10 U SpeI, 10U ClaI, 1X Tampão *CutSmart* em um volume final de 20 µl e incubada 37°C ON. As reações de recombinação foram feitas contendo: 100 ng de plasmídeo e cassetes em reações separadas e usando *In-Fusion PCR Cloning Kit* (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA), em um volume final de 10 µl e um ciclo de 37°C por 15 min e 50°C por 15 min. Para a ligação de pSDMA58 com *PAB-mCherry* foi feita uma reação contendo: 50 ng plasmídeo, 154,7 ng *PAB-mCherry* para uma proporção de 1:5 em relação aos cassetes, 1X Tampão T4 DNA Ligase, 1 µM ATP, 1 U T4 DNA ligase, para um volume final de 16 µl, incubado a 4°C ON.

Para confirmar a inserção dos cassetes nos plasmídeos pSDMA57 e pSDMA58 foram feitas digestões com enzimas de restrição específicas. Para *HIS3-GFP* e *PAB-GFP* usou-se as seguintes enzimas e reações: 10 µg plasmídeo, 5 U ClaI, 5 U EcoRI-HF, 1X Tampão *CutSmart*, em um volume final de 20µl e incubadas a 37°C ON, gerando os fragmentos de 1,5 kb, 2,0 kb e 2,4 kb. Para  $\emptyset$  *GFP*: 10µg plasmídeo, 5U ClaI, 5U SacI, 1X Tampão *CutSmart* em um volume final de 20µl incubadas a 37°C ON, formando-se bandas de 1,5kb e 6kb. Para *PAB-mCherry*: 10µg plasmídeo, 5U HindIII, 5U SpeI, 1X Tampão *CutSmart* em um volume final de 20µl incubadas a 37°C ON, formando-se bandas de 4,0kb e 6,3kb. Para *HIS3-mCherry* e  $\emptyset$  *mCherry*: 10µg plasmídeo, 5U SpeI, 5U ClaI, 1X Tampão *CutSmart* em um volume final de 20µl incubadas a 37°C ON, formando-se bandas de 1,5kb e 2,0kb, respectivamente, ambas com bandas de 6,3kb.

### **3.1.4. Transformação em *C. neoformans* por biobalística**

*C. neoformans* cepa H99 foi cultivado em 50 ml de YPD líquido por 24 h a 30°C e agitação de 120rpm, lavadas uma vez e a 4000rpm por 5min com solução salina estéril (NaCl 0,9%), ressuspendidas em um volume de 6ml (1ml por placa), espalhadas em placas de YPD + Sorbitol 1M e deixadas secando no fluxo laminar estéril à temperatura ambiente por 1 h. Uma suspensão de 50 µl de partículas de tungstênio (previamente esterilizadas) foi adicionada em tubos eppendorfs separados contendo 5 µl DNA (1 µg), 5 µl CaCl<sub>2</sub> estéril (2,5 M), 20 µl espermidina estéril (0,1 M) e misturados lentamente por 10min. Foi adicionado 150 µl de etanol absoluto e centrifugado à 13000 rpm por 10 s três vezes para remoção do DNA que não estava precipitado nas partículas de tungstênio. Ao final da lavagem, foi adicionado 4 µl de etanol absoluto em cada tubo contendo o DNA precipitado nas partículas de tungstênio, passados rapidamente em banho sonicador e imediatamente aplicados nos discos contendo as membranas carreadoras previamente esterilizadas. As membranas com as partículas foram depositadas em recipientes contendo sílica por 30min antes dos tiros. As partículas foram aceleradas em ambiente contendo vácuo e pressão provocada por gás Hélio (membrana de pressão de 1250 psi, BioRad) e atiradas em cultura de *C. neoformans* H99 em meio YPD + Sorbitol 1 M em um BioRad PDS-1000/He. Depois dos tiros, as placas foram armazenadas em estufas a 30°C por 16 h e a cultura transformada foi lavada com 5 ml de solução salina. As células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo contendo 200 µg de Neomicina (para os mutantes com o gene de GFP) e Higromicina B (para os mutantes com o gene de mCherry) e incubadas a 30°C por 7 dias. As colônias obtidas foram plaqueadas em meio YPD e analisadas em microscópio de fluorescência e citometria de fluxo.

### **3.1.5. Microscopia de fluorescência**

As linhagens mutantes e selvagem foram avaliadas quanto à fluorescência emitida e ao endereçamento correto das proteínas fluorescentes por meio de visualização em microscópio de fluorescência Axiovert 100, (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com os filtros 38 HE (verde), 63 HE (vermelho) e DIC (contraste de fase) ou campo claro nas objetivas de 40 x, 60 x e 100 x (usando óleo de imersão). As imagens foram processadas e ajustadas no software ZEN lite 2012 SP2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).



### **3.1.6. Uso de animais para experimentação**

Todos os procedimentos envolvendo os camundongos e seus cuidados foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Brasília (UnBDoc nº 66729/2016) e conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Brasileiro de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### **3.1.7. Análise de citometria de fluxo**

As medições da intensidade de fluorescência emitida pelas linhagens transformantes foram realizadas por citometria de fluxo. As leveduras das cepas selvagem e mutantes foram cultivadas como mencionado acima, lavadas e ressuspensas ( $5 \times 10^5$  células/mL) em PBS para aquisição por citômetro de fluxo FACSVerse (BD). Os dados foram analisados com o programa FlowJo v.10. A mediana da intensidade de fluorescência (IFM) obtida de cada transformante foi normalizada para a linhagem selvagem (valor IFM do transformante/valor IFM da linhagem WT) para permitir a computação do incremento na emissão de fluorescência em relação à linhagem parental.

### **3.1.8. Geração de macrófagos derivados da medula óssea**

Os macrófagos derivados da medula óssea foram obtidos por um método descrito anteriormente (MARIM *et al.*, 2010). Resumidamente, os fêmures e as tíbias murinas foram dissecados de camundongos C57BL/6 de 10 a 12 semanas de idade e lavados com RPMI-1640 gelado (Sigma-Aldrich) para liberar células da medula óssea. As células foram centrifugadas ( $300 \times g$ , 5 min, 4°C), ressuspensas em tampão de lise de hemácias (*Red Blood Cell Lysis Buffer*; Sigma-Aldrich), lavadas e semeadas a  $2 \times 10^6$  células/placas de Petri em 10 mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) contendo 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor (SFB), 10% de meio condicionado de fibroblastos L929 e 50 µg/mL de gentamicina em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% e temperatura de 37°C. No dia 4 de cultivo, a cultura celular recebeu mais 10 mL de meio completo fresco. No dia 8, as monocamadas de macrófagos foram lavadas com meio aquecido a 37°C e desaderidas usando *TrypLETM Express* (Gibco). Em seguida, as células foram lavadas, ressuspensas em meio experimental, composto de RPMI suplementado com 10% de SFB e utilizadas para os experimentos.

### **3.1.9. Ensaios de infecção em *Galleria mellonella***

Para os ensaios de virulência *in vivo*, as lagartas de *G. mellonella*, no último estágio larval, foram mantidas no escuro a 25 °C e utilizadas para a infecção. As cepas de *C. neoformans* foram cultivadas e lavadas como mencionado acima e ressuspendidas em PBS a  $1 \times 10^6$  leveduras/mL. Para cada linhagem testada, 14 a 17 larvas por grupo foram inoculadas na penúltima pata com 10  $\mu$ l (contendo  $5 \times 10^4$  células) da suspensão fúngica usando uma seringa Hamilton e, posteriormente, foram mantidas a 37°C. Um grupo controle não infectado recebeu apenas PBS. As larvas foram examinadas diariamente após a inoculação e o escore de larvas mortas foi utilizado na montagem de curvas de sobrevivência para análise pelo método de Kaplan-Meier usando os testes estatísticos *log rank* e *Wilcoxon* (MYLONAKIS *et al.*, 2005). Após 5 dias de infecção, amostras de larvas mortas foram inoculadas com 100  $\mu$ L de PBS para posterior recuperação da hemolinfa. Esta foi diluída 10 x com PBS, e analisada usando um microscópio de fluorescência Axiovert 100 para visualizar as células fúngicas e a avaliar a manutenção da emissão fluorescente.

### **3.1.10. Ensaios de fagocitose com macrófagos murinos**

A análise da fagocitose dos transformantes foi avaliada por meio de 3 técnicas: i) microscopia de luz comum e coloração com Panótico Rápido; ii) microscopia de fluorescência; e iii) citometria de fluxo. Todos os transformantes foram avaliados pela técnica “i”, metodologia padrão para avaliação de fagocitose de leveduras, e que prescinde que a linhagem fúngica emita fluorescência. Vale ressaltar que há variações do corante utilizado, que pode ser substituído por Giemsa ou outros corantes adequados. Anteriormente a interação fungo-macrófago, os macrófagos foram semeados a  $5 \times 10^4$  leveduras por poço na placa de 96 poços para adesão à superfície. Em paralelo, as leveduras de *C. neoformans* foram opsonizadas com 10  $\mu$ g/mL do anticorpo monoclonal 18B7 anti-GXM (uma doação de Arturo Casadevall) durante 20 minutos e utilizadas para infecção de macrófagos em uma Multiplicidade de Infecção (MOI) de 5. Após 2 h de infecção, os poços foram lavados para remover leveduras não fagocitadas, e a análise prosseguiu de acordo com as técnicas adotadas abaixo.

Para a microscopia de luz comum, prosseguiu-se com a coloração com Panótico Rápido (Laborcin), técnica de coloração hematológica que usa a combinação de um fixador (metanol) e corantes acidófilos e basófilos para a coloração do macrófago e também da levedura. Para a microscopia de fluorescência, foi necessária uma prévia marcação da linhagem selvagem com o fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (ou FITC, do inglês, *Fluorescein isothiocyanate*). Para isso, as leveduras foram incubadas por 10 minutos em PBS a 0,5 mg/mL de FITC (Sigma-Aldrich) e lavadas por repetidas vezes, de acordo com Chaka e colaboradores (1995). Posteriormente, foram opsonizadas e utilizadas para o ensaio de interação. Decorridas as 2 h deste ensaio, a monocamada de células foi lavada, e as células foram fixadas com uma solução tamponada de paraformaldeído a 4% por 20 minutos e analisadas posteriormente por microscopia de fluorescência a uma ampliação de 200 x. A porcentagem de fagocitose foi calculada de acordo com Roilides *et al.* (1998), dividindo o número de macrófagos com  $1 \geq$  levedura fagocitada pelos macrófagos observados multiplicados por 100. Além disso, o índice fagocítico foi obtido calculando o número médio de fungos internalizados por fagócito.

Para a citometria de fluxo, os macrófagos foram semeados ( $1,2 \times 10^6$ ) em placas de petri de 5 mm de diâmetro e sem tratamento para a adesão celular. A infecção se deu conforme descrito acima, e incluiu o uso da linhagem selvagem marcada com FITC. Em seguida, a monocamada de células foi lavada com PBS aquecido, desadherida, e marcada com anticorpo anti-CD11b conjugado a APC, na presença de PBS+2% SFB (para bloqueio de marcações inespecíficas), para a identificação dos macrófagos. Um anticorpo isotípico conjugado a APC foi utilizado como controle de marcação inespecífica. Posteriormente, a suspensão de células foi lavada e submetida à citometria de fluxo. A taxa de fagocitose foi obtida após a prévia seleção (“gating”) de eventos CD11b<sup>+</sup> (macrófagos) seguida do cálculo percentual da quantidade de eventos positivos para FITC/GFP (representativos de macrófagos contendo leveduras fluorescentes internalizadas) em relação a quantidade de eventos totais (*i.e.* positivos ou negativos para FITC/GFP, representativos de macrófagos engajados ou não na fagocitose, respectivamente), com o auxílio do programa FlowJo v.10.

### **3.1.11. Ensaio de morte fúngica com macrófagos murinos**

Anteriormente a interação, os macrófagos foram ativados com 1 µg/mL de LPS (Sigma-Aldrich) e 20 ng/mL de IFN-γ (Invitrogen) durante 3 horas. Em paralelo, as leveduras de *C. neoformans* foram opsonizadas como anteriormente e utilizadas para a infecção de macrófagos (MOI 2). Após 2 h de infecção, a monocamada de macrófagos foi lavada para a remoção de leveduras não fagocitadas, lisada com água destilada a 0,05% de SDS (as células de *C. neoformans* não sofrem lise nessas condições), e a suspensão fúngica resultante foi submetida a uma diluição seriada em PBS e plaqueada em meio agar Sabouraud a 30°C para a determinação das unidades formadoras de colônias (UFC). Este grupo foi utilizado como controle da taxa de leveduras internalizadas. Outro grupo, para determinação de capacidade fungicida, prosseguiu com a infecção após a lavagem do poço até atingir 24 h de interação. A morte do fungo foi calculada a partir da diferença percentual da contagem de UFC entre o grupo de determinação de capacidade fungicida (24 h) e o grupo de determinação de fagocitose (2 h) de cada linhagem testada.

### **3.1.12. Obtenção de células dormentes de *C. neoformans***

Leveduras de *C. neoformans* cepa H990 (variedade *grubii*) armazenadas a -80°C foram semeadas em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) à 30°C. Após 2 a 5 dias de crescimento, as leveduras (aproximadamente 10<sup>7</sup> células) foram coletadas com uma alça de repique e ressuspendidas em um frasco T25cm<sup>2</sup> com tampa ventilada contendo 10 mL de meio líquido YPD (1% extrato de leveduras, 2% peptona e 2% dextrose, pH 6-6,5) (BD Difco) a 150 rpm e 30°C durante 22 horas. Para garantir que a cultura atingisse a fase estacionária (S-Cn), 100 µL dessa pré-cultura (primária) foi utilizada como inóculo em novo meio submetido a mais 22 horas de incubação (cultura secundária).

Para a obtenção de leveduras dormentes, a cultura secundária, de fase estacionária, foi acondicionada em um saco plástico selado contendo um gerador de atmosfera hipóxica (<0,1% de oxigênio) (GENbag anaero, Biomérieux), e incubada durante 7 dias no escuro a 30°C, sem rotação, de acordo com Hommel e colaboradores (2019) (Figura 8). A culturabilidade e viabilidade das culturas foi monitorada a cada experimento a fim de confirmar o fenótipo de células dormentes vivas mas não cultiváveis (*Viable But Non-culturable*, VBNC), também segundo descrito por Hommel e colaboradores (2019).

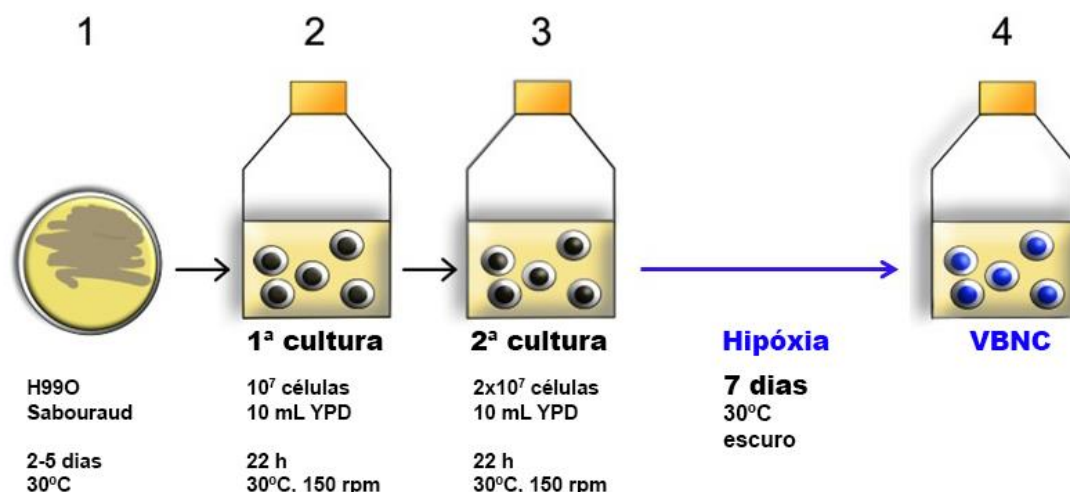


Figura 8. Metodologia para a obtenção de células dormentes in vitro. O protocolo consistiu de 4 etapas: (1) Leveduras de *C. neoformans* de uma cultura estoque mantida a -80°C foram semeadas em meio SDA e incubadas por 2 a 5 dias a 30°C; (2) Aproximadamente 10<sup>7</sup> células foram inoculadas em 10 mL de meio YPD em um frasco ventilado e incubadas sob agitação (150 rpm) a 30°C por 22 horas; (3) 100 µL dessa pre-cultura líquida contendo por volta de 2x10<sup>7</sup> células foram transferidos para um novo frasco com meio para mais 22 horas de incubação; (4) Após a 2ª cultura atingir a fase estacionária, esta foi submetida a hipóxia, no escuro, a 30°C durante 7 dias para a obtenção de células viáveis mas não cultiváveis (VBNC). Adaptado de Hommel e colaboradores (2019).

### 3.1.13. Teste de culturabilidade por CFU

Para avaliar a culturabilidade (*i.e.* capacidade da célula fúngica formar uma colônia), as amostras de suspensão de leveduras foram diluídas e contadas com o auxílio do citômetro de fluxo Guava easyCyte 12HT Benchtop (Merck) ou de um hemocitômetro (câmara de Neubauer). Posteriormente, a concentração de leveduras foi ajustada para 1x10<sup>5</sup> células/mL de PBS e 100 µL da suspensão (contendo 1x10<sup>4</sup> células) foi inoculada em placas de meio SDA em duplicata técnica. As placas foram incubadas a 30°C por 3-5 dias para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados foram expressos como porcentagem média de culturabilidade.

### 3.1.14. Curva de Crescimento

As cepas foram cultivadas como mencionado anteriormente, e a suspensão de leveduras ajustada para 10<sup>4</sup> células/mL. Desta suspensão, foram plaqueados 250 µL em duplicata em uma placa de 96 poços com tampa (não seladas para permitir oxigenação), que foi incubada durante 4 dias a 30°C sob agitação lateral contínua de média intensidade (para

o teste de latência), ou sem agitação (para as demais curvas de crescimento) no espectrofotometro de placa EON (BioTek). A cada 20 minutos a densidade óptica (OD) a 600 nm foi mensurada. A determinação da latência de crescimento (fase lag ou  $\lambda$ ) foi calculada com base no programa do próprio equipamento.

### **3.1.15. Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo**

Devido à impossibilidade de avaliar a viabilidade de células dormentes, por definição não cultiváveis, com base na técnica de UFC, a viabilidade do fungo foi avaliada por meio de citometria de fluxo. Para isso, foram utilizadas sondas *LIVE/DEAD Fixable Violet* (LVD) (405 nm/450 nm) ou *Green* (488 nm/530 nm) (Invitrogen) (250 uL a 1:1000) incubadas com  $10^6$ - $10^7$  células durante 20 minutos a 30°C sob temperatura ambiente e protegido da luz. A técnica é baseada na reação de sondas fluorescentes, impermeáveis à membrana celular, com aminas celulares. Desta forma, células mortas, que apresentam perda na integridade da membrana, adquirem uma marcação mais intensa permitindo sua distinção de células vivas. Como controle foram utilizadas células mortas após incubação a 70°C durante uma hora (S-Cn *Heat killed*, HK).

### **3.1.16. Análise estatística**

A análise estatística foi conduzida utilizando o programa *GraphPad Prism* v.6.0. Os testes *one-* ou *two-way* ANOVA seguidos do pós-teste Dunnett ou Tukey foram utilizados para comparações em relação a um grupo controle ou entre os grupos, respectivamente. O teste t-student foi empregado na comparação entre dois grupos independentes. Valores de *p* inferiores a 0.05 foram considerados significativos.

## 3.2. Resultados

### 3.2.1. Construção e validação das linhagens repórteres fluorescentes

Com o intuito de obter linhagens fluorescentes de *C. neoformans* com emissão fluorescente verde ou vermelha, os genes *HIS3* e *PAB*, clonados do genoma da linhagem de *C. neoformans* H99, foram fusionados aos genes codificadores das proteínas fluorescentes *GFP* e *mCherry*, por meio da recombinação nos vetores pCN50 (O' MEARA *et al.*, 2010) e pCN51 (CHARPENTIER *et al.*, 2004), respectivamente, no sistema de *Escherichia coli*. O gene *HIS3* codifica para a Histona H3, proteína altamente conservada em eucariotos, intimamente associada ao DNA e que apresenta papel essencial na regulação da estrutura da cromatina e na expressão gênica (POSTBERG *et al.*, 2010). O produto do processamento do gene *PAB* (do inglês, *Poly (A) Binding Protein*) é uma proteína caracterizada pela sua habilidade de ligação à cauda poli (A) do mRNA citoplasmático e, portanto, apresenta função central na regulação da expressão gênica (GORGONI *et al.*, 2004). A escolha desses genes se deu devido a essa citolocalização distinta entre os seus produtos, o que permite padrões diferentes de marcação celular.

Recentemente, foi identificada e caracterizada no genoma de *C. neoformans* uma pequena região intergênica denominada “*Safe Haven*”, segura para inserções de DNA sem comprometer a expressão de genes da vizinhança. Com isso em mente, as construções contendo *GFP* ou *mCherry* foram clonados nos plasmídeos pSDMA57 (marca de resistência para Neomicina) ou pSDMA58 (marca de resistência para Higromicina B), respectivamente, que contêm a sequência dessa região, e foram utilizados para a transformação de *C. neoformans* mediada por biobalística (ARRAS *et al.*, 2015). Finalmente, foi obtido uma série de colônias de transformantes *HIS3-GFP*, *PAB-GFP* e  $\emptyset$  *GFP* (plasmídeo vazio contendo *GFP*) contendo o gene de resistência para Neomicina, e transformantes *HIS3-mCherry*, *PAB-mCherry* e  $\emptyset$  *mCherry* (plasmídeo vazio, com *mCherry*) contendo o gene de resistência para Higromicina B. Entretanto, como confirmado por PCR, somente ocorreu a integração gênica no *Safe Haven* no transformante  $\emptyset$  *GFP* (resultado não exibido).

Após uma seleção preliminar das colônias de brilho mais intenso e estável com o uso de microscópio de fluorescência, elas foram testadas para a intensidade de fluorescência também por citometria de fluxo (figura 9). Foram selecionados 2 transformantes contendo apenas o plasmídeo vazio,  $\emptyset$  *GFP* (33 e 34) e  $\emptyset$  *mCherry* (9 e 24), bem como também 2

linhagens de brilho mais intenso de cada transformação: *HIS3-GFP* (26 e 64), *PAB-GFP* (18 e 22), *HIS3-mCherry* (26 e 44) e *PAB-mCherry* (30 e 33).

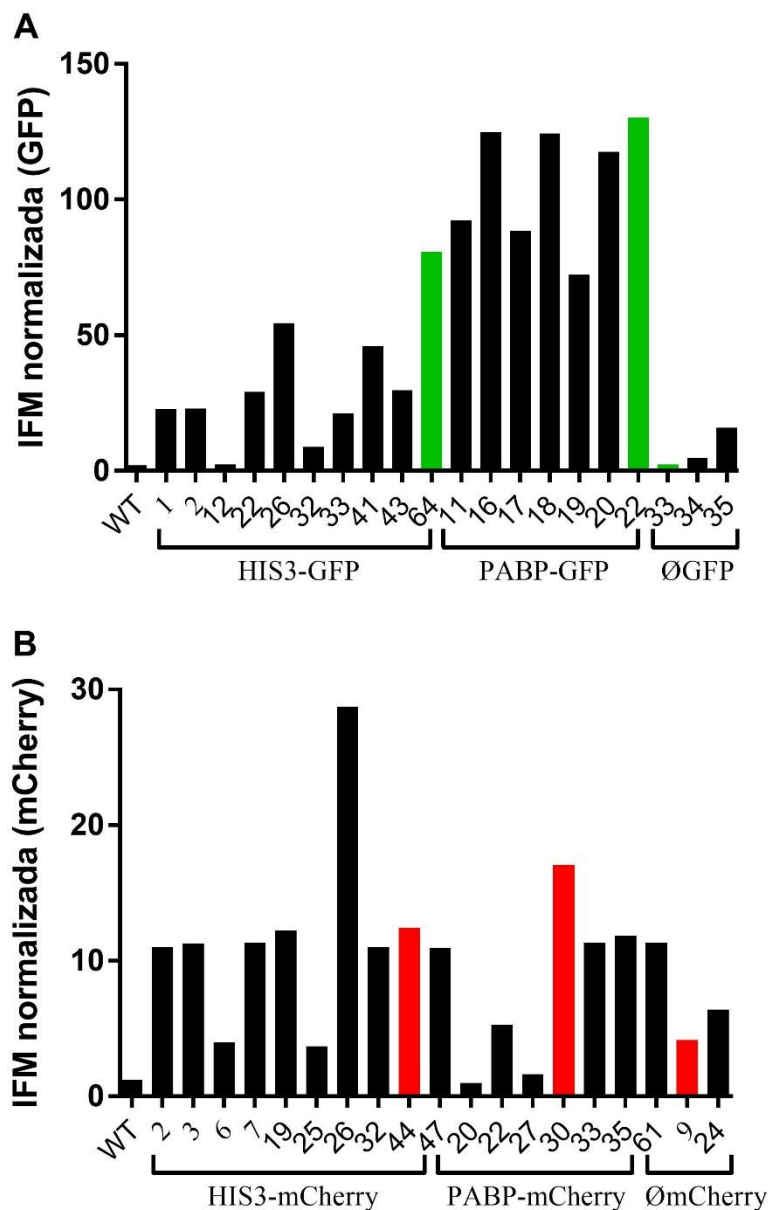


Figura 9. Intensidade de fluorescência emitida pelas linhagens engenheiradas. Intensidade de fluorescência média (IFM) emitida pelos transformantes em relação à IFM da linhagem parental, avaliada por citometria de fluxo. Foram utilizados os filtros 527/32 nm (FITC-A) e 700/54 (PerCP-Cy5.5-A) para a análise dos transformantes GFP (A) e mCherry (B), respectivamente. Os transformantes selecionados ao final dos testes de virulência foram representados em verde ou vermelho.



Os transformantes selecionados foram submetidos a uma série de testes, descritos mais adiante, para a determinação do transformante da dupla que demonstre o perfil de características fenotípicas e fatores de virulência mais próximo da linhagem parental. A partir deste momento, somente serão exibidos e descritos neste trabalho os resultados desses transformantes que melhor se sucederam nesses testes: *HIS3-GFP* (mutante 64), *PAB-GFP* (22),  $\emptyset$  *GFP* (33), *HIS3-mCherry* (44) e *PAB-mCherry* (30)  $\emptyset$  *mCherry* (9) (figura 9).

Para a verificação do esperado padrão de distribuição intracelular dos fluoróforos nas linhagens engenheiradas, estas foram submetidas à microscopia de fluorescência (figura 10A). Foi observado que ambos os transformantes *HIS3-GFP* e *HIS-mCherry* emitiram luz verde e vermelha, respectivamente, co-localizada à uma luz azul adquirida com a utilização do marcador nuclear DAPI, indicando um bem-sucedido endereçamento dos fluoróforos para o núcleo da levedura. Diferentemente, e como esperado, os transformantes *PAB-GFP* e *PAB-mCherry* apresentaram brilho verde e vermelho, respectivamente, difuso pelo citosol e limitado pela parede celular.

Com o auxílio da citometria de fluxo, foi detectada forte emissão de fluorescência verde dos transformantes *HIS3-GFP* e *PAB-GFP*, que apresentaram intensidade de fluorescência média (IFM) aproximadamente 40 e 130 vezes maior que a linhagem parental, respectivamente (figura 10B e C). Os transformantes *HIS3-mCherry* e *PAB-mCherry*, entretanto, apresentaram fraca emissão de fluorescência vermelha, atingindo níveis de IFM aproximadamente 5 e 15 vezes maior que a linhagem parental, respectivamente (figura 10B e C). As construções de *C. neoformans* transformadas apenas com o plasmídeo vazio contendo os genes *GFP* e *mCherry* apresentaram um brilho pouco maior (inferior ao dobro) que o da linhagem selvagem (figura 10B), e difusa pela célula (figura 10A), provavelmente devido à fraca intensidade da autofluorescência do fungo juntamente ao fato dos fluoróforos não se apresentarem fusionados às proteínas His3 e Pab.

Foi avaliado também a ocorrência de invasão de fluorescência entre os canais (fenômeno conhecido como vazamento de canal) utilizados para a captação do *GFP* (filtro 572/32) e *mCherry* (700/54), não havendo interferência considerável (resultados não mostrados).

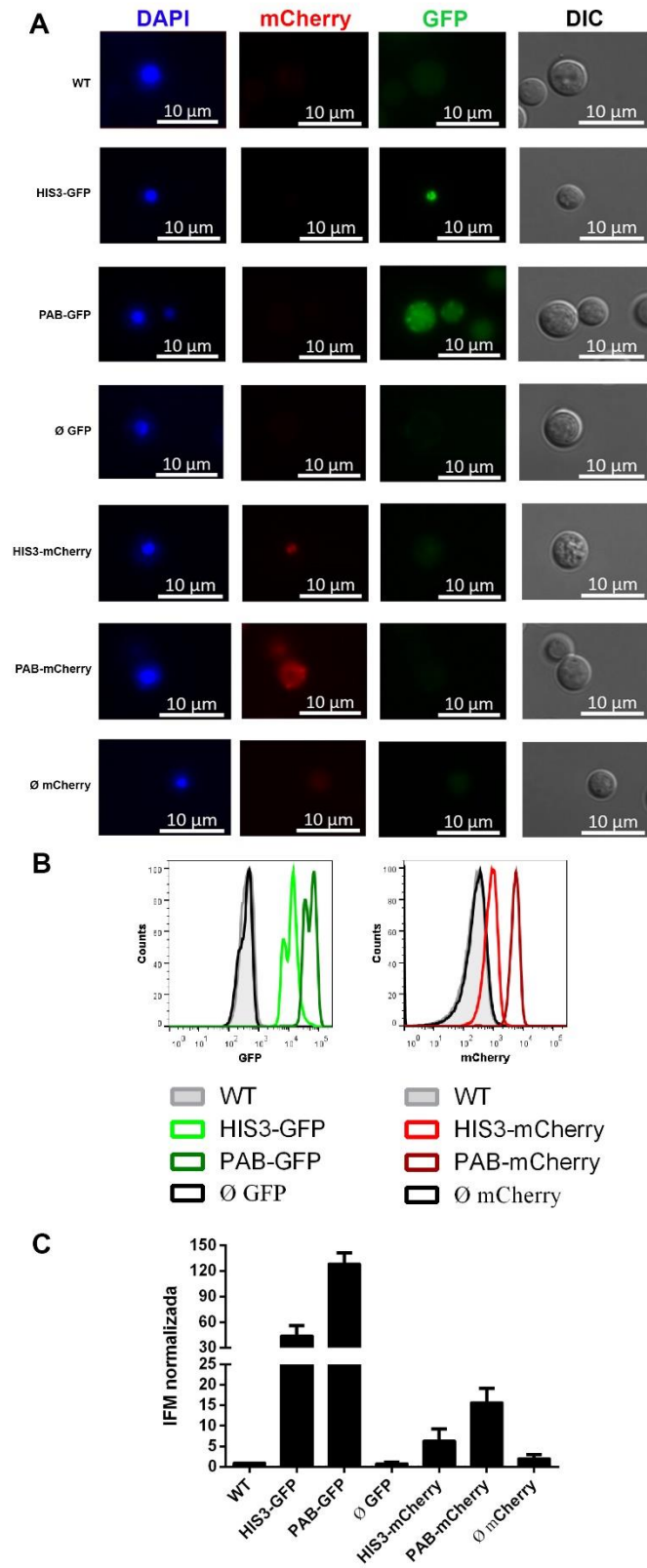


Figura 10. Distribuição intracelular dos fluoróforos e intensidade de fluorescência dos transformantes engenheirados. (A) Os transformantes foram observados sob a magnificação de 400 x com o auxílio

de microscópico de fluorescência. (B) Histograma de fluorescência dos transformantes nos canais de detecção da emissão de fluorescência do GFP e mCherry, avaliado por citometria de fluxo. (C) Intensidade de fluorescência média (IFM) emitida pelos transformantes em relação à IFM da linhagem parental, avaliada por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SEM de dados obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

### **3.2.2. As linhagens transformantes não apresentam alteração nos fenótipos e fatores de virulência em relação a linhagem parental**

*C. neoformans* encontra no ambiente e no hospedeiro mamífero condições de estresse variadas, frente às quais perpassa por bem caracterizadas alterações fenotípicas e/ou expressão de fatores de virulência, de forma a se adaptar para garantir sua sobrevivência e proliferação. No hospedeiro, duas características são altamente determinantes para o sucesso da infecção, sendo elas a capacidade de crescimento à temperatura fisiológica de 37°C e a resistência aos mecanismos microbicidas dos leucócitos, como a produção de espécies reativas de oxigênio. Assim, os transformantes foram cultivados, tanto a 30°C, quanto a 37°C, em meio YPD padrão ou contendo menadiona, um doador de ânion superóxido, ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Todos os transformantes apresentaram, comparativamente à linhagem selvagem, crescimento inalterado a 30°C, bem como termotolerância a 37°C, seja na ausência ou presença dos agentes químicos estressores (figura 11A e B).

Foi avaliada também a sensibilidade das linhagens ao estresse da integridade da membrana e parede celular, por meio do uso do SDS, detergente que desestabiliza a membrana plasmática celular, e Congo Red, agente que se liga nas cadeias de glicanos e previne a formação regular de microfibrilas (KOPECKÁ *et al.*, 1992) (figura 11). Além disso, os transformantes foram inoculados em meio hipertônico de cloreto de sódio para avaliar a resistência ao estresse osmótico (figura 11D). Não foi observada alteração substancial na formação das colônias entre os grupos avaliados, sob quaisquer condições testadas.

Na análise de crescimento em meio líquido a 37°C, porém, o transformante *PAB-mCherry* apresentou atraso no crescimento em relação às demais linhagens (figura 12).

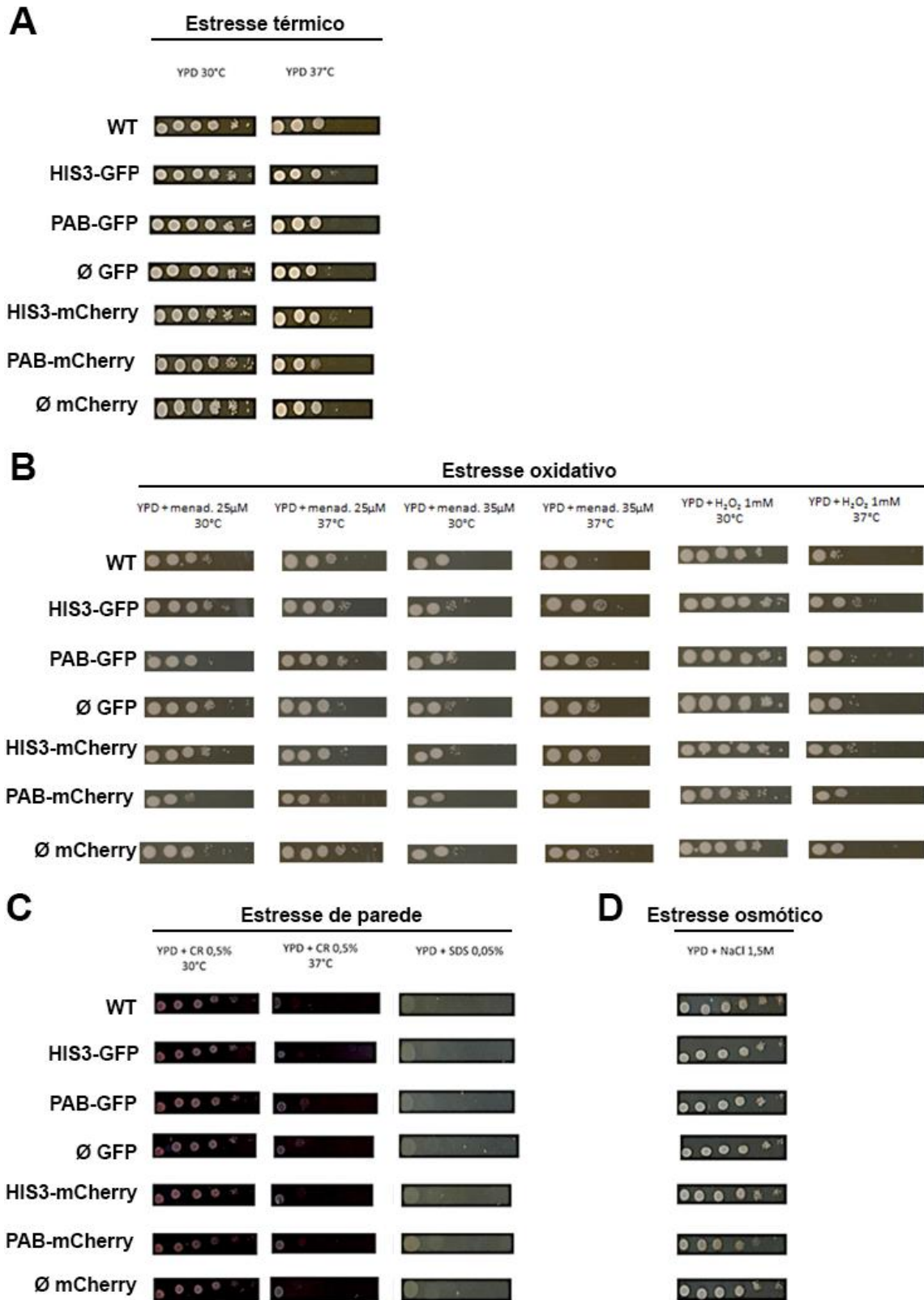


Figura 11. Análise fenotípica das linhagens transformantes sob condições de estresse. Uma suspensão de leveduras de cada linhagem transformante e selvagem foi submetida a diluições seriadas de base

10 ( $2 \times 10^7$  a  $2 \times 10^3$  células/mL), as quais foram utilizadas para o plaqueamento de 5  $\mu$ L de suspensão fúngica em meio de cultura YPD agar padrão a 30°C e 37°C (A), ou meio YPD contendo as concentrações indicadas de menadiona ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), Congo Red (CR) ou SDS (C) ou NaCl (D). As culturas foram incubadas sob as temperaturas indicadas até o aparecimento de colônias (2 a 5 dias) e fotografadas.

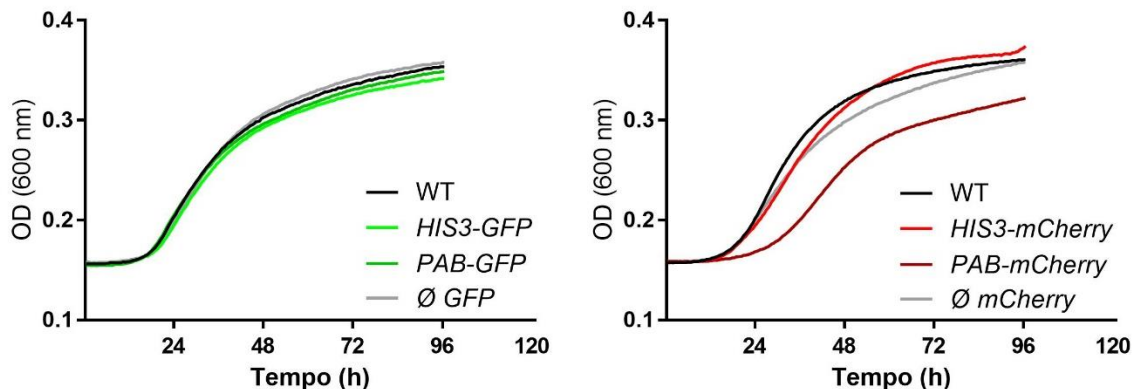


Figura 12. Curva de crescimento das linhagens transformadas de *C. neoformans*. As suspensões de leveduras ( $10^4$ /mL) das linhagens transformantes foram cultivadas em meio YPD líquido, a 37°C, durante 96 horas, para a análise do crescimento por meio do monitoramento da densidade óptica (OD 600).

Em adição, para verificar o impacto da integração gênica do *GFP* e *mCherry* também no ciclo de vida de acasalamento bipolar de *C. neoformans*, as linhagens (MAT $\alpha$ ) foram co-cultivadas com a linhagem KN99a (MAT $\alpha$ ) e posteriormente avaliadas para a capacidade de filamentação (figura 13). Todas as linhagens foram positivas para o teste, como pode ser observado por meio da análise macroscópica e microscópica, esta última que, inclusive, permitiu a visualização das hifas de acasalamento fluorescentes.

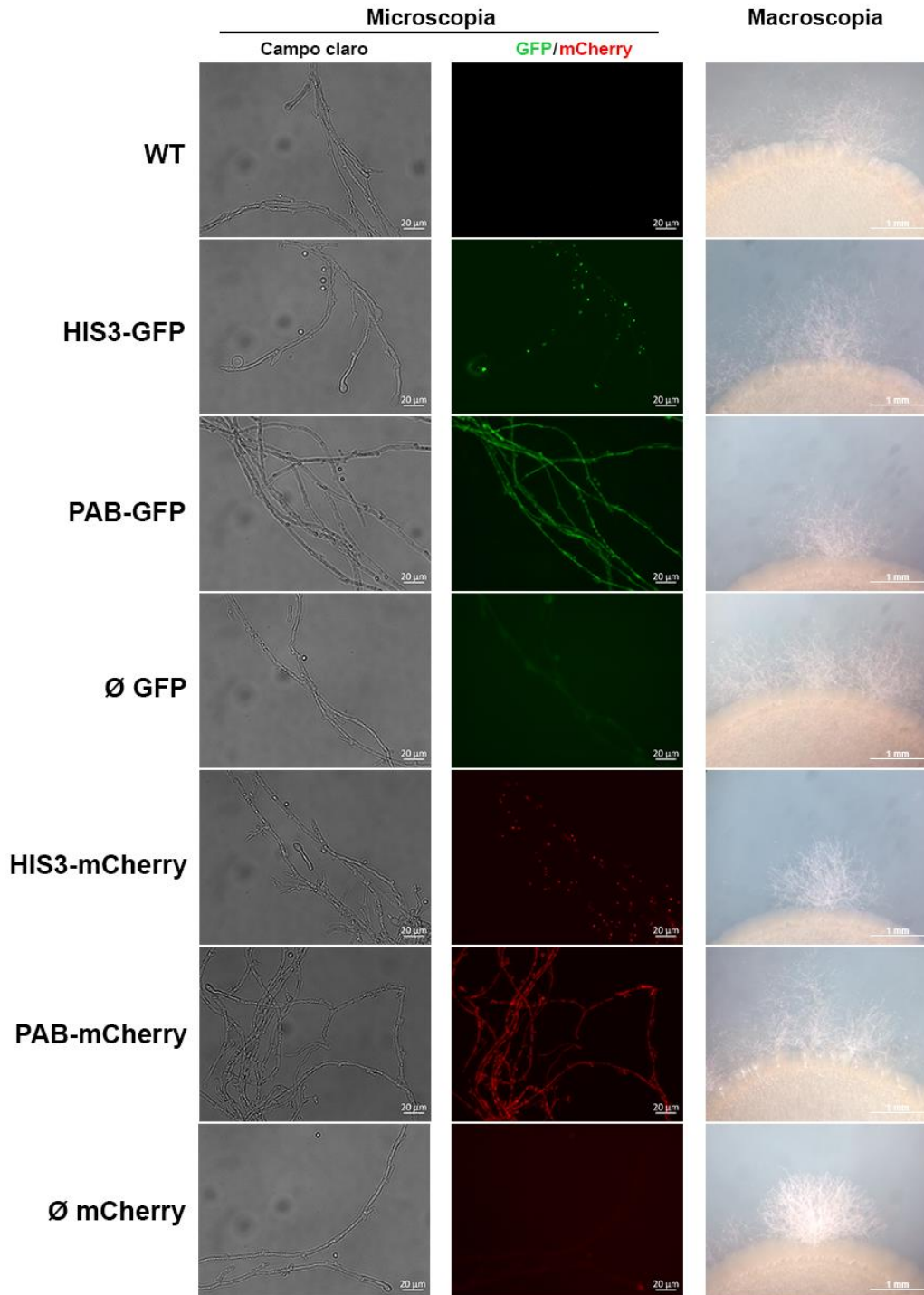


Figura 13. Análise da formação de hifas de acasalamento. As linhagens transformadas foram misturadas em igual quantidade (10  $\mu\text{L}$  de uma suspensão fúngica de  $1 \times 10^7$  células/mL) de células KN99 (MAT $\alpha$ ) e co-cultivadas em meio YNB por 10 dias a 30°C, no escuro. As micrografias das hifas foram tomadas com um microscópio de fluorescência em uma magnificação de 200 x, enquanto as colônias foram fotografadas com o auxílio de uma lupa sob o aumento de 2,5 x. A micrografia de fluorescência do WT exibida é da análise de GFP, canal em que *C. neoformans* apresenta maior autofluorescência. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

A presença de uma cápsula envoltória fúngica é um atributo de virulência único do gênero *Cryptococcus*, e permite o rápido diagnóstico clínico da meningite criptocócica por meio da preparação de amostras de fluido cefalorraquidiano com tinta nanquim (CASADEVALL *et al.*, 2018). Impenetrável às partículas escuras da tinta, a cápsula é evidenciada como um halo translúcido, o que permite a sua medição. Aplicando essa técnica, observamos que nenhuma das linhagens transformantes apresentou alteração no diâmetro da cápsula, exceto a  $\emptyset$  *mCherry*, que exibiu um aumento em relação à cepa parental (figura 14A e B).

Diferentemente, a capacidade de produção da melanina é um fator crítico compartilhado entre uma variedade de espécies fúngicas, incluindo *C. neoformans*, e é reflexo da atividade catalítica da lacase na oxidação de compostos fenólicos, abundantes em substratos preparados com sementes de Níger (ALP *et al.*, 2010). A produção e atividade de outras enzimas, as fosfolipases e urease, também estão intimamente relacionadas com a virulência de *C. neoformans* (COX *et al.*, 2001; OLSZEWSKI *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2013). O cultivo de *C. neoformans* em substratos ricos em ureia (juntamente a um indicador ácido-base) ou lipídeos resulta na alteração de cor do meio, seja devido à elevação do pH promovida pela formação da ureia (indicador de atividade de urease); ou pela formação de um halo de degradação translúcido (indicador de atividade de fosfolipase), respectivamente. Nossos transformantes foram testados para a produção dos fatores acima de acordo com essas metodologias e, como resultado, exibiram atividade das enzimas supracitadas similar à do fungo parental (figura 14). Nossos resultados indicam que as nossas linhagens transformantes diferem da linhagem parental ao expressarem proteínas fluorescentes, assemelhando-se a ela, contudo, quanto à expressão fenotípica e de fatores de virulência.



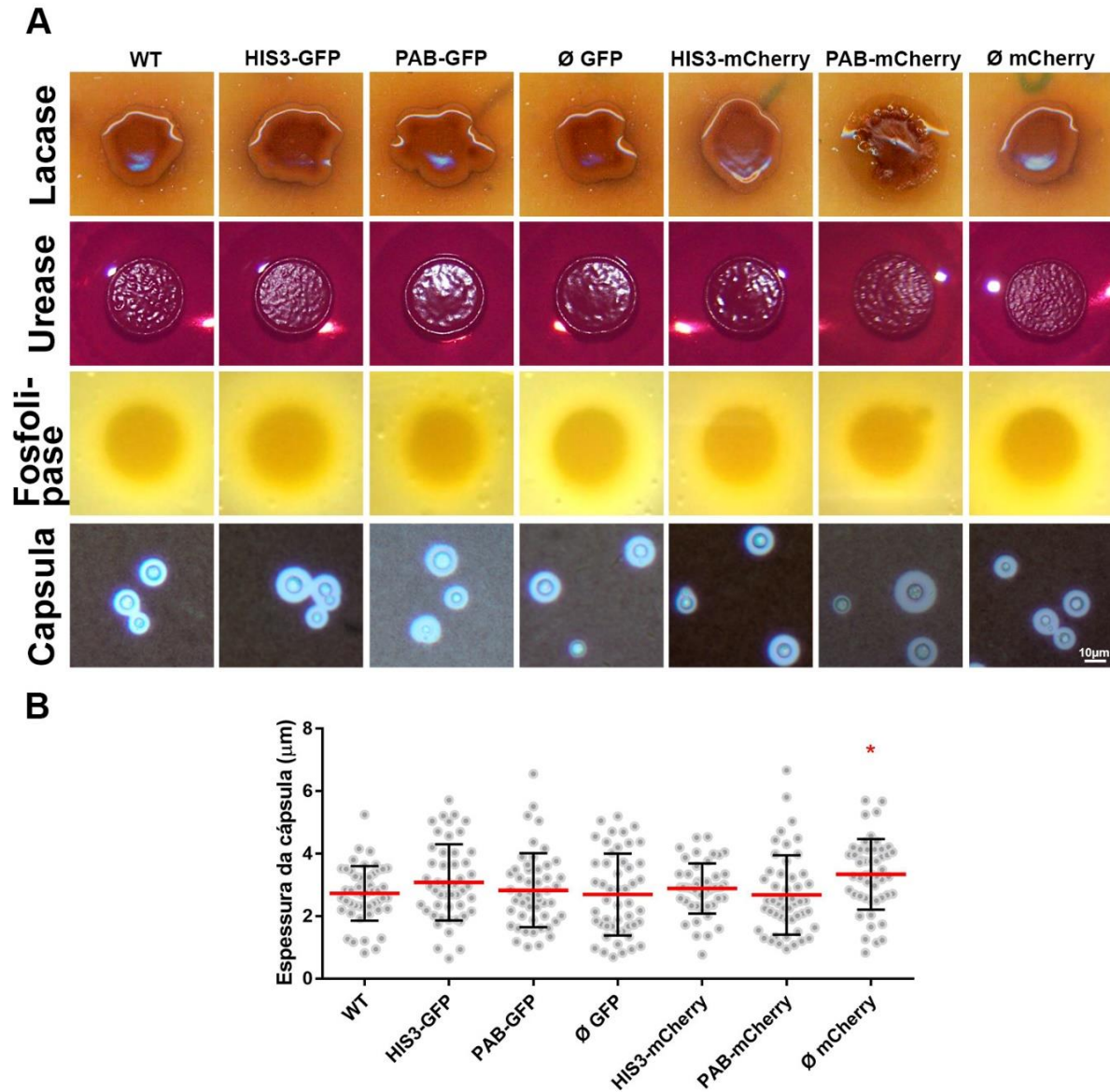


Figura 14. Avaliação dos fatores de virulência das linhagens transformantes. As linhagens transformantes e selvagem foram avaliadas para a atividade de lacase (Niger Seed Agar), urease (*Christiansen's Urea Agar*), fosfolipase (solução com emulsão de ovo diluído 1:1 com PBS a 8 % no meio) e formação de cápsula (crescimento em meio mínimo e preparação com tinta nanquim) (A). A análise da espessura da cápsula foi realizada por meio de microscopia de luz com base na formação da zona de exclusão de tinta nanquim (B). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ , comparado ao grupo selvagem.



### **3.2.3. As linhagens transformantes não diferem da linhagem parental na sobrevivência em macrófagos murinos ativados**

Confirmada a manutenção das características fenotípicas e dos fatores de virulência, as linhagens repórteres foram posteriormente avaliadas quanto a virulência em modelos animais (figuras 15 e 16). Na infecção experimental de lagartas *Galleria mellonella*, foi observado que os grupos inoculados com as linhagens *HIS3-GFP* e *PAB-mCherry* apresentaram sobrevivência sensivelmente superior à do grupo contendo o fungo. O grupo controle que recebeu a injeção constituída apenas do veículo do inóculo, PBS, não apresentou mortes durante o período de acompanhamento da infecção, o que exclui a possibilidade de morte em decorrência ao trauma físico gerado pelo procedimento de injeção (figura 15A). No curso do experimento, amostras de lagartas que sucumbiram à infecção foram utilizadas para a análise das leveduras transformantes, que apresentaram a manutenção da habilidade de emitir fluorescência. Foi possível observar, inclusive, a internalização de leveduras por hemócitos fagocíticos de *Galleria* (figura 15B).

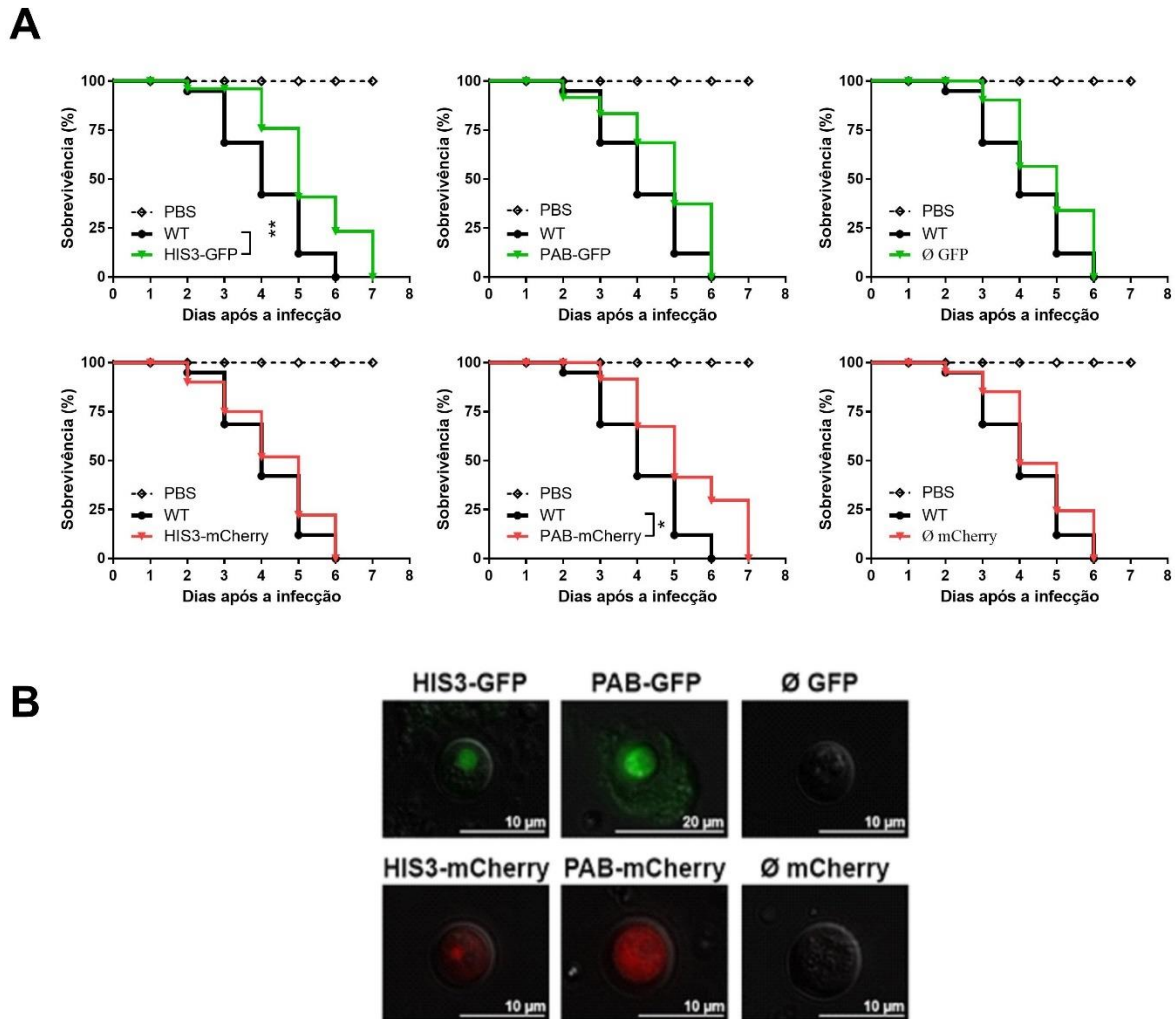


Figura 15. Virulência das linhagens transformantes no modelo de infecção de *Galleria mellonella*. Grupos de 14-17 Lagartas de *G. mellonella* foram inoculadas na penúltima pro-pata com PBS sozinho (controle do trauma da inoculação) ou contendo  $1 \times 10^4$  leveduras de cada transformante. (A) As lagartas foram examinadas diariamente para a contagem de indivíduos mortos. (B) Após 5 dias de infecção, amostras de lagartas que sucumbiram à infecção foram submetidas a uma nova injeção com PBS e recuperação da hemolinfa para a análise das leveduras por microscopia de fluorescência. A micrografia mostra a sobreposição do contraste de fase com o canal verde (grupos GFP) ou vermelho (grupos mCherry). Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , comparado entre os grupos indicados por colchetes.

Na infecção experimental em outro modelo animal, *in vitro*, utilizando macrófagos murinos primários previamente ativados, não houve diferença estatística significativa na redução da carga fúngica entre os grupos experimentais, de acordo com a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) dos fagócitos infectados (figura 16).

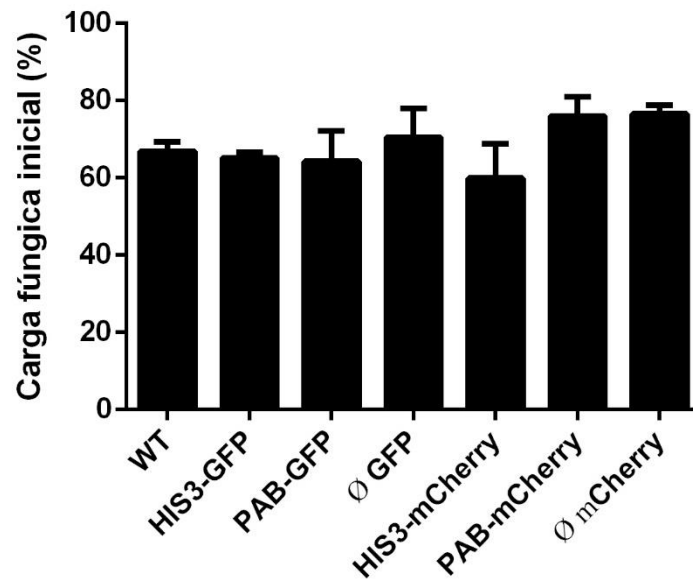


Figura 16. As linhagens transformantes não apresentam diferença da cepa parental na susceptibilidade à morte por macrófagos murinos. Macrófagos murinos primários foram ativados por 3h com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e IFN- $\gamma$  (20  $\text{ng}/\text{mL}$ ) e posteriormente desafiados com as linhagens transformantes (MOI 2) previamente opsonizadas com 18B7 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após a infecção, a monocamada de células foi lavada, lisada, e a suspensão de leveduras resultante foi diluída e semeada em meio YPD para a contagem de UFC. A carga fúngica foi calculada a partir da diferença percentual da contagem de UFC entre o grupo de determinação de capacidade fungicida (24h) e o grupo de determinação de fagocitose (2h) de cada linhagem testada. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SEM e são representativos de 2 experimentos independentes.

Ainda por meio do emprego desse modelo de infecção, os transformantes foram avaliados para a fagocitose por macrófagos, com base na análise da quantidade de macrófagos engajados na fagocitose, e quantidade média de leveduras internalizadas por estes. Novamente, não foram observadas diferenças entre as linhagens testadas, de acordo com o emprego de técnicas de coloração associadas à microscopia de luz (figura 17A). É interessante notar que o incremento visualizado no diâmetro da cápsula do transformante  $\emptyset$  *GFP* (figura 14B) não foi o suficiente para se traduzir na diminuição da fagocitose, em um ganho na resistência à atividade microbicida dos macrófagos, ou na alteração da curva de sobrevivência de *Galleria* (figuras 16 e 15, respectivamente).

### **3.2.4. As linhagens transformantes são aplicáveis para a otimização de ensaios de fagocitose de *C. neoformans***

Com a finalidade de avaliar a aplicabilidade dos transformantes na otimização de ensaios para avaliação de fagocitose, macrófagos murinos foram co-cultivados com as linhagens transformantes obtidas de maior intensidade de emissão de fluorescência, *HIS3-GFP* e *PAB-GFP*, e analisados com o uso de técnicas baseadas na detecção de fluorescência. Como controle, foi utilizado o fungo selvagem marcado previamente com o fluoróforo FITC (figuras 17 e 18).

Para a avaliação por microscopia de fluorescência, apenas o transformante *PAB-GFP* foi utilizado. Observou-se índice fagocítico e capacidade fagocítica estatisticamente iguais entre o grupo *PAB-GFP* e a linhagem selvagem (figuras 17B e D), o que está de acordo com os resultados obtidos com o uso de microscopia de luz comum (figura 17A e C).

A fagocitose dos transformantes foi avaliada também por citometria de fluxo, desta vez incluindo o grupo *HIS3-GFP* (figura 18A e B). Foi possível a visualização de populações bem delimitadas de macrófagos contendo (perfil CD11b<sup>+</sup>FITC/GFP<sup>+</sup>) ou não (perfil CD11b<sup>+</sup>FITC/GFP<sup>-</sup>) leveduras internalizadas na infecção com as linhagens transformantes, especialmente *PAB-GFP* e a linhagem parental marcada com FITC (figura 18B). Como esperado, a cepa parental não marcada emitiu um fraco sinal fluorescente que não permitiu a distinção dessas duas populações de macrófagos. Leveduras extracelulares puderam ser identificadas na infecção com as linhagens *PAB-GFP* e WT marcada com FITC, mas não na infecção com *HIS3-GFP*, devido à maior robustez de emissão de fluorescência das primeiras, o que permitiu a distinção das leveduras extracelulares (CD11c<sup>-</sup>FITC/GFP<sup>+</sup>) de restos celulares (CD11c<sup>-</sup>FITC/GFP<sup>-</sup>).

Em relação às taxas de fagocitose entre as linhagens testadas (figura 18A), não foram observadas diferenças estatísticas significativas, o que corrobora a análise de fagocitose realizada por microscopia de luz ou fluorescência (figuras 17C a D).

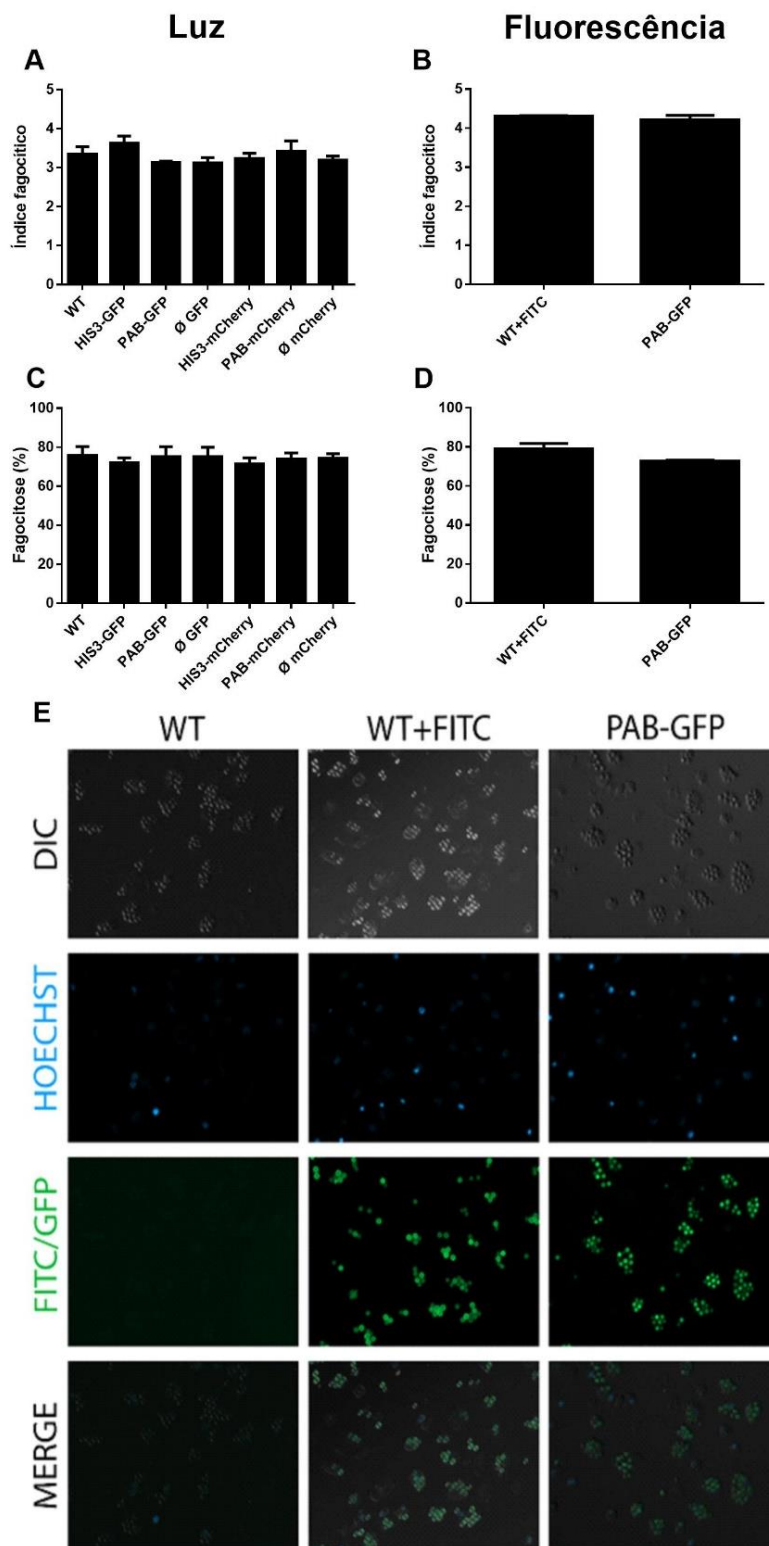


Figura 17. As linhagens transformantes não apresentam diferença da cepa parental na fagocitose por macrófagos murinos. Macrófagos murinos primários foram desafiados com as cepas transformantes (MOI 5) previamente opsonizadas com 18B7 (10 µg/mL). Após 2 h de interação, a monocamada de

células foi lavada, fixada e corada (para microscopia de luz) para análise de internalização do fungo com o auxílio de microscópio de luz ou de fluorescência. Índice de internalização de leveduras após 2 h de interação avaliado por microscopia de luz comum (A) ou fluorescência (B). Capacidade fagocítica de macrófagos após 2 h de interação avaliado por microscopia de luz comum (C) ou de fluorescência (D). (E) Micrografias de fluorescência da interação entre macrófagos e leveduras com magnificação de 200 x. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SEM e são representativos de 2 experimentos independentes.

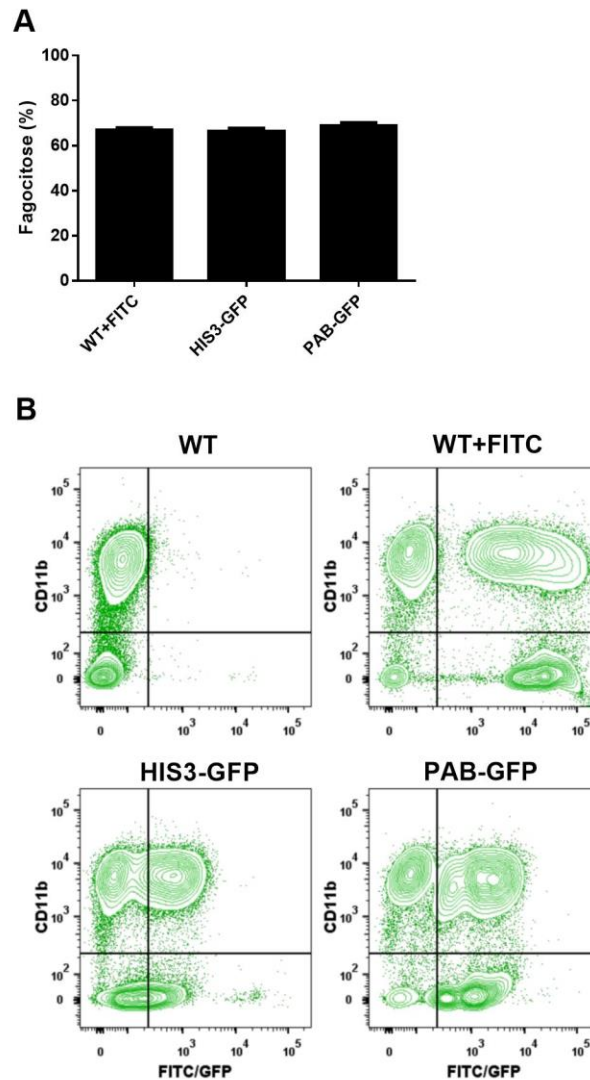


Figura 18. Aplicação das linhagens transformantes na análise de fagocitose por citometria de fluxo. Macrófagos murinos primários foram desafiados com as linhagens transformantes (MOI 5) ou selvagem marcada (WT-FITC) ou não (WT) com FITC e opsonizadas com 18B7 (10  $\mu$ g/mL) previamente à interação. Após 2 h de interação, a monocamada de células foi lavada, desadlerida e marcada com anticorpo anti-CD11b conjugado a APC para a identificação dos macrófagos. (A) Capacidade fagocítica de macrófagos após 2 h de interação avaliado por citometria de fluxo. (B) Gráficos de pontos (“dot plot”) CD11b-APC vs FITC/GFP obtidos a partir dos ensaios de interação.

### **3.2.1. PAB-GFP *C. neoformans* cultivado sob privação de nutrientes e hipóxia manifesta o fenótipo de células viáveis mas não cultiváveis e expressão estável de GFP**

Recentemente, foi caracterizada a indução de leveduras viáveis mas não cultiváveis (VBNC) de *C. neoformans in vitro* (HOMMEL et al., 2019). Devido à grande relevância deste fenótipo para a patofisiologia da criptococose, nós pretendíamos confirmar se a nossa linhagem fluorescente é capaz de alcançar tal estado. Para isso, aplicamos o protocolo de indução de células dormentes de Hommel e colaboradores (2019), e que consiste essencialmente no crescimento das leveduras até a fase estacionária (STAT), exaurida de nutrientes, e subsequente exposição prolongada da cultura a uma atmosfera de hipóxia (leveduras HYPOx). Ao final do protocolo, inoculamos as leveduras HYPOx, ou leveduras controles (STAT) em novo meio fresco, sólido ou líquido, para avaliar tanto a capacidade (culturabilidade) quanto a latência de crescimento (*i.e.* fase lag ou  $\lambda$ ), respectivamente. Observamos que tanto as leveduras selvagens quanto engenheiradas apresentaram drástica redução da culturabilidade para níveis médios inferiores a 1%, compatível com os níveis descritos por Hommel e colaboradores (2019) (Figura 19A). Em acordo com esse resultado, através do monitoramento de OD das culturas em meio líquido e determinação da extensão da fase lag, observamos um significativo atraso no crescimento das culturas preparadas com células HYPOx (Figura 19B).

Paralelamente, também verificamos a viabilidade das leveduras, uma vez que ambos resultados poderiam ser reflexo de alta mortalidade celular (Figura 19C e D). Para isso, incubamos as células com uma sonda de viabilidade fluorescente violeta, LVD, e verificamos a intensidade da marcação (de aumento proporcional à perda da integridade da membrana) por meio de citometria de fluxo. Como controle, inativamos leveduras STAT por calor (HK). Como esperado, as leveduras selvagens e PAB-GFP apresentaram alta viabilidade, e apenas uma tênue redução de viabilidade em relação às leveduras STAT, o que também é esperado para células submetidas ao protocolo (HOMMEL et al., 2019).

Finalmente, ainda por meio de citometria de fluxo, avaliamos a expressão de GFP nessas amostras. Interessantemente, a população de leveduras PAB-GFP apresentou robusta emissão fluorescente, ainda que levemente reduzida em relação ao controle STAT. Leveduras HK apresentaram simultaneamente à intensa marcação com o corante de viabilidade

(indicativo de morte celular), uma redução praticamente total do sinal fluorescente, presumivelmente devido à degradação térmica do GFP. Os mesmos padrões de emissão fluorescente para o marcador de viabilidade ou GFP foram observados por microscopia de fluorescência (Figura 20).

### **3.2.2. *PAB-GFP C. neoformans* cultivado sob privação de nutrientes e hipóxia exibe padrão específico de distribuição celular de *PAB-GFP***

Embora predominantemente encontrada no citosol, PAB1 é regularmente importada pelo núcleo para atuar na biogênese do mRNA e no transporte deste para o citosol, permitindo assim a tradução proteica. Sob determinadas condições de estresse celular, a tradução é comprometida simultaneamente à redistribuição de Pab1 (e transcritos a ela ligados) em estruturas não delimitadas por membranas conhecidas como grânulos de estresse (GE) (BRAMBILLA et al., 2019).

Durantes as análises de microscopia de fluorescência, curiosamente observamos um perfil distinto de distribuição intracelular de Pab1 marcada com GFP, não difuso, como em STAT, mas consistindo em aglomerações características de GE. Além disso, as células apresentaram o acúmulo de sinal fluorescente também em uma área única, de disposição circular, lembrando um núcleo (Figura 20). Nesse sentido, nos perguntamos se poderia estar ocorrendo o acúmulo de PAB-GFP no núcleo, uma vez que, como mencionado acima, a organela é um sítio temporário da proteína. Para conferir esta hipótese, utilizamos uma sonda específica para DNA, NucBlue, para delimitar o núcleo em azul. De fato, fomos capazes de observar a co-localização do compartimento nuclear com regiões de alta concentração de PAB-GFP, confirmando nossa hipótese (Figura 21).



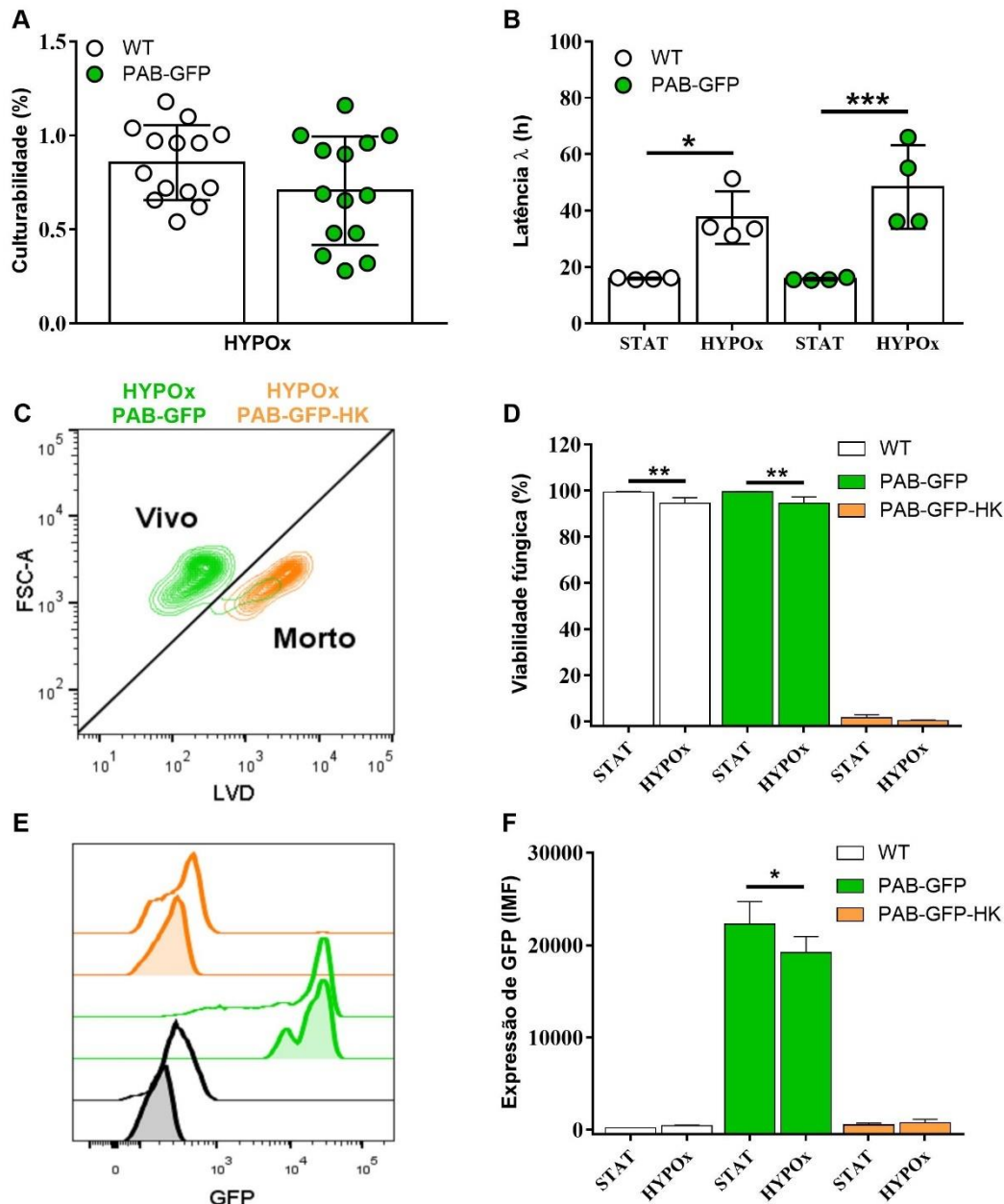


Figura 19. PAB-GFP *C. neoformans* cultivado sob privação de nutrientes e hipóxia manifesta o fenótipo de células viáveis mas não cultiváveis e expressão estável de GFP por citometria de fluxo. Leveduras WT ou PAB-GFP foram cultivadas até atingir a fase estacionária de crescimento e em seguida incubadas por 7 dias em atmosfera de hipóxia. Ao final da incubação, as leveduras foram plaqueadas em meio sólido para contagem de UFC e determinação da porcentagem de culturabilidade (A) ou incubadas em novo meio fresco para análise da latência de crescimento (B). As leveduras foram marcadas com um corante vital fluorescente (*Live/Dead violet*) para análise de viabilidade celular por citometria de fluxo (C, D). Ainda por citometria foi avaliada a expressão de GFP em células viáveis ou inativadas por calor (HK) (E, F). Os histogramas preenchidos denotam culturas do grupo STAT enquanto os vazios o grupo HYPOx. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SD de no mínimo dois experimentos independentes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , entre os grupos indicados por colchetes.

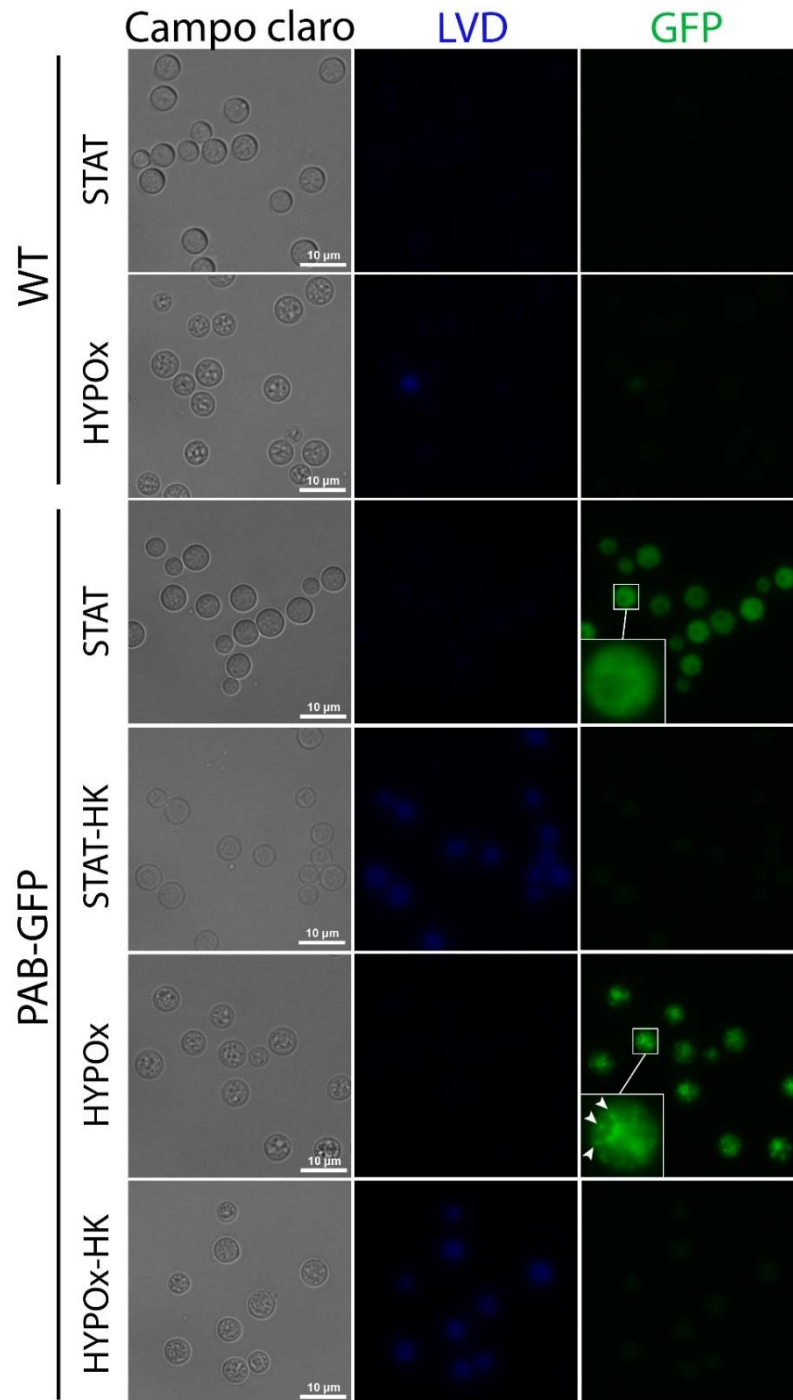


Figura 20. PAB-GFP *C. neoformans* cultivado sob privação de nutrientes e hipóxia exibe expressão robusta de GFP e padrão de distribuição celular de PAB-GFP específico por microscopia de fluorescência. Leveduras WT ou PAB-GFP foram cultivadas até atingir a fase estacionária de crescimento e em seguida incubadas por 7 dias em atmosfera de hipóxia. As leveduras foram (*Heat killed*) ou não inativadas por calor e submetidas a marcação com um corante vital fluorescente azul (*Live/Dead violet*) para análise de viabilidade celular e expressão de GFP por citometria de fluxo. As cabeças de seta indicam grânulos de estresse. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

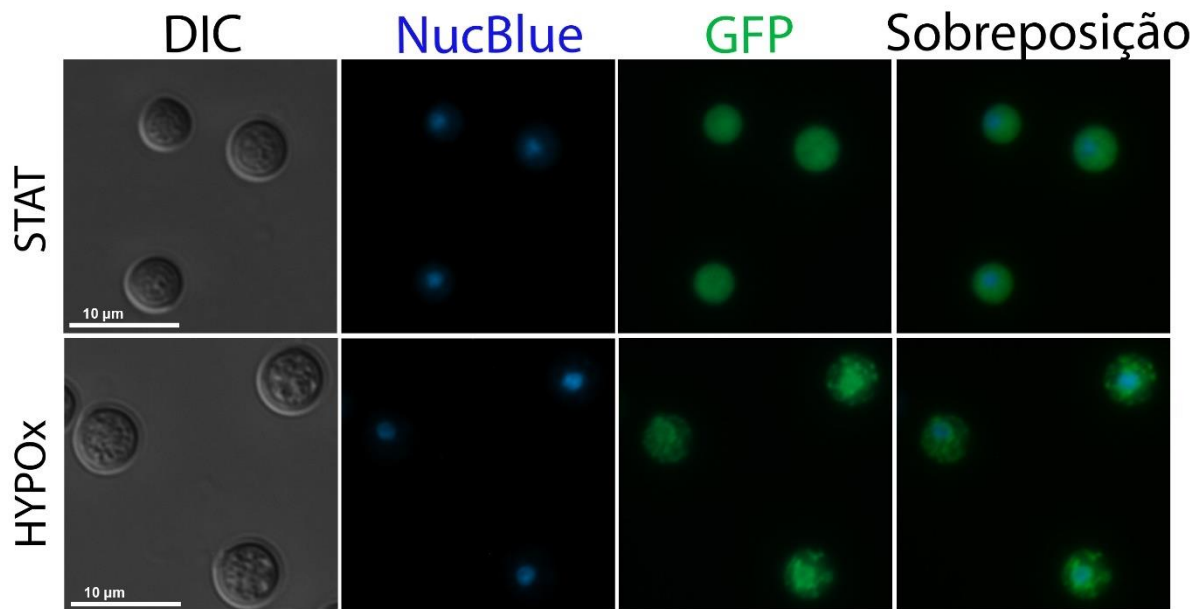


Figura 21. PAB-GFP *C. neoformans* cultivado sob privação de nutrientes e hipóxia exibe acumulação de PAB1 em grânulos de estresse e no núcleo. Leveduras WT ou PAB-GFP foram cultivadas até atingir a fase estacionária de crescimento e em seguida incubadas por 7 dias em atmosfera de hipóxia. As leveduras foram marcadas com NucBlue para evidenciamento do núcleo. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

### 3.3. Discussão

O uso de linhagens fluorescentes, tanto contendo *GFP* ou *mCherry*, não é inédito no estudo da interação *Cryptococcus*-hospedeiro. Voelz e colaboradores (2010) foram os pioneiros nessa aplicação, quando desenvolveram mutantes de *C. neoformans* e *C. gatti* contendo *GFP* que permitiram análises automatizadas de proliferação intracelular e fagocitose de *C. neoformans*, bem como o acompanhamento da dinâmica desses fenômenos em tempo real por microscopia de fluorescência de vídeo. Mais recentemente, nessa mesma linha, outro grupo construiu um mutante com semelhante emissão robusta e estável, mas de fluorescência vermelha, obtido com a integração do gene *mCherry* no genoma de *C. neoformans*. Este mutante permitiu a avaliação a longo prazo, *ex vivo*, da interação do fungo com leucócitos nos pulmões e linfonodos mediastinais, por citometria, cuja análise associada ao uso de marcadores de viabilidade propiciou simultaneamente a determinação da viabilidade do fungo no interior dessas células (UPADHYA *et al.*, 2017).

Ambos os transformantes de *C. neoformans* descritos acima, assim como o mutante *FNXI* que expressa *mCherry* (TENOR *et al.*, 2015), por apresentarem estabilidade e robusta emissão fluorescente, foram empregados no estudo da infecção de *C. neoformans* no modelo animal de *zebrafish* (*Danio rerio*) (TOBIN *et al.*, 2012; TENOR *et al.*, 2015; BOJARCZYK *et al.*, 2016; GIBSON *et al.*, 2017). O diferencial deste modelo em relação ao de inseto e camundongo, e que tem atraído interesse em pesquisas *in vivo* com ferramentas fluorescentes, é que o pequeno tamanho e alta transparência desse vertebrado permite análises de imagem em alta resolução, com visualização a nível do macrófago e da levedura (TOBIN *et al.*, 2012). Por meio do emprego de linhagens transformantes fluorescentes nesse modelo, foram identificados mecanismos de dano vascular pela infecção de *C. neoformans*, que tem implicações importantes na compreensão da invasão cerebral e ocorrência da meningite em humanos (TENOR *et al.*, 2015; GIBSON *et al.*, 2017). Além disso, permitiu-se o estudo da importância da fagocitose nos momentos iniciais da infecção, e de suas consequências prejudiciais ao hospedeiro, ao propiciar um sítio de replicação do fungo e incremento da sua virulência ao proporcionar condições estimuladoras para a expansão de sua cápsula (BOJARCZYK *et al.*, 2016). Esses achados enaltecem a importância da construção e aplicação de linhagens transformadas com genes codificadores para proteínas fluorescentes no estudo da interação parasita-hospedeiro em variados modelos animais.

As vantagens da marcação endógena da célula com fluoróforos integrados ao genoma frente à marcação celular exógena são muitas, e algumas delas foram corroboradas neste trabalho. Entre elas, predomina a alta estabilidade da fluorescência, que não é reduzida com a divisão celular ou com o decorrer do tempo, possibilitando análises superiores a três dias, uma grande limitação dos fluoróforos de marcação convencionais (*e.g.* FITC, UVITEX-2B e Calcofluor). Isso tem grande implicação em estudos a longo prazo, como na investigação de respostas adaptativas, que somente são efetivas após alguns dias do desafio do sistema imunológico. Vale ressaltar que as nossas linhagens transformantes apresentaram emissão fluorescente mesmo após cinco dias de infecção em *Galleria*. Parte dessa maior estabilidade é garantida pela baixa sensibilidade desses fluoróforos à variações de pH, diferentemente do fluoróforo largamente utilizado FITC, parcialmente neutralizado em ambientes ácidos, como o fornecido por fagolisossomos, cujo pH pode variar de 6.2 a 4.5 (LEVITZ *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2008). Outras vantagens estão relacionadas à economia de etapas de marcação e lavagens, ou de recursos (*e.g.* fluoróforos). Ademais, alterações estruturais da parede ou toxicidade celular associadas à marcação exógena estão entre as preocupações que tornam mais atraente o uso de transformantes fluorescentes (GERIK *et al.*, 2005).

Por outro lado, uma preocupação que paira sobre a edição de genomas se dá no risco da ocorrência de deleções ou substituições de genes funcionais. Estratégias como a inserção de construções em regiões de vazios de genes, como a região *Safe Haven*, ajudam a minimizar esse problema, embora não eliminem a possibilidade de ocorrer prejuízo na virulência do mutante, como foi observado para o mutante de *mCherry* contendo a construção direcionada para o locus *Safe Haven 2 (SH2)* (ARRAS *et al.*, 2015; UPADHYA *et al.*, 2017). Portanto, a avaliação de uma série de atributos de virulência consagrados e do crescimento em resposta ao estresse, como a conduzida no presente trabalho, é indispensável para a checagem da virulência após qualquer transformação genética realizada em *C. neoformans*. No presente trabalho, nossas linhagens não falharam nos testes mencionados acima, mesmo inexistindo o controle sobre o locus de inserção.

Nas infecções *in vivo* em modelo animal de inseto, observamos uma sensível perda de virulência nos transformantes HIS3-GFP e PAB-mCherry. No caso deste último, pode haver relação com a sua reduzida capacidade proliferativa, associada a uma maior susceptibilidade à morte por células fagocíticas do hospedeiro (BOUKLAS *et al.*, 2015).

Mais importante, porém, foi verificado que na interação com macrófagos murinos classicamente ativados não houve diferença no controle da infecção entre os nossos mutantes e a cepa parental. Inclusive, já foi demonstrado que a atividade da lacase (avaliada aqui por meio do teste de melanização), juntamente ao teste da sobrevivência em macrófagos, apresentam maior índice de correlação com a curva de sobrevivência de camundongos, modelo experimental clássico e ideal para testes de virulência de *C. neoformans*, do que quando esta é relacionada à curva de sobrevivência em *Galleria* (BOUKLAS *et al.*, 2015).

O modelo experimental de infecção em *Galleria* foi introduzido para estudos de patogenicidade de linhagens de *C. neoformans* em 2005 por Mylonakis e colaboradores, e adotado desde então de forma crescente por vários grupos devido à múltiplas razões: dispensa da aprovação por comissões de ética, baixos custos de criação das larvas, adaptação destas à temperatura fisiológica humana, apresentação de sistema fagocítico celular, disponibilidade da sequência do genoma e descrição extensiva do seu transcriptoma, incluindo transcritos de genes relacionados à resposta imune (VOGEL *et al.*, 2011; BOUKLAS *et al.*, 2015; LANGE *et al.*, 2018). Entretanto, o modelo *Galleria* não reproduz todos os aspectos da infecção em mamíferos, e seus resultados devem ser interpretados com cautela. Embora muitos estudos tenham correlacionado resultados entre os dois modelos de infecção, alguns estudos apresentaram certas inconsistências na virulência de *C. neoformans* entre o modelo de infecção em *Galleria* e *Mus musculus* (EISENMAN *et al.*, 2014; BOUKLAS *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016). Assim, embora nossos resultados sugiram que alguns dos transformantes sejam hipovirulentos no modelo *in vivo* de inseto, a análise conjunta dos nossos resultados obtidos com macrófagos murinos *in vitro* e com os testes de fenótipos e fatores de virulência de *C. neoformans* indica fortemente que as transformações não afetaram a virulência de *C. neoformans* no modelo mamífero.

Além do uso voltado para a identificação e rastreamento da célula em ensaios de interação, as proteínas fluorescentes são valorosas para a construção de linhagens repórteres de *C. neoformans*, contribuindo para o monitoramento da expressão de genes de interesse e na citolocalização de seus produtos proteicos. Permitem ainda, dessa forma, a descrição da importância de determinados genes de interesse nos processos biológicos do fungo e na interação com células do hospedeiro (LORANG *et al.*, 2001). Uma miríade de linhagens repórteres já foi engenheirada em *C. neoformans*, com a finalidade do estudo da (o): actina

(*GAL7-GFP*) (DEL POETA *et al.*, 1999), feromônio de acasalamento do tipo alfa (*MFalpha1-GFP*) (DEL POETA *et al.*, 1999), transportador dependente de cobre (*CUF1-GFP*) (WATERMAN *et al.*, 2012), enzima lacase (*LAC1-GFP*) (WATERMAN *et al.*, 2007), GTPases Cdc42 (*CDC42-GFP*) (PRICE *et al.*, 2008) e Rac1 e Rac2 (*RAC1-GFP* e *RAC2-GFP*) (BALLOU *et al.*, 2013), glutationa peroxidases Gpx1 e Gpx2 (*GPX1-GFP* e *GPX2-GFP*) (MISSAL *et al.*, 2005), proteína reguladora de resposta ao pH Rim101 (*RIM101-GFP*) (OST *et al.*, 2015), adesinas Cfl1, Dha1 e Dha2 (*CFL1-mCherry*, *DHA1-mCherry* e *DHA2-mCherry*) (GYAWALI *et al.*, 2017), proteína S-Acetiltransferase Pfa4 (*PFA4-GFP*) e Ras1 (*RAS1-GFP* e *RAS1-mCherry*), proteína reguladora central na sinalização de uma série de vias (NICHOLS *et al.*, 2015), entre outros. Notoriamente, *GFP* é o fluoróforo de preferência, provavelmente porque é superior aos demais nos quesitos foto-estabilidade, brilho, e disponibilidade de plasmídeos para transformação. Inclusive, pudemos constatar essas características neste trabalho, ao comparar os transformantes contendo *GFP* ou *mCherry*.

Entretanto, nenhuma das linhagens de *C. neoformans* supracitadas e construídas até então teve seu uso explorado no rastreamento da infecção criptocócica em modelo de camundongo *in vivo*. Por sua vez, em outro modelo de patógeno, um grupo fez uso de linhagens fluorescentes de *Mycobacterium bovis* para monitorar a infecção pulmonar experimental em camundongos com o uso de aparelho de imagiologia de fluorescência. No estudo, demonstraram ser possível determinar a biodistribuição desse patógeno no hospedeiro murino, além da carga de bactérias encontrada nos órgãos colonizados (KONG *et al.*, 2016). Foi possível também obter uma boa correlação entre o nível de fluorescência detectada e a quantidade de UFC bacteriana, o que cria a possibilidade de análises multitemporais em um mesmo indivíduo, já que o uso de aparelhos de imagiologia prescinde de eutanásia do animal. Essa técnica poderia inclusive reduzir massivamente o número de animais utilizados em um experimento de interação patógeno-hospedeiro, a depender do seu objetivo, para pelo menos metade da quantidade convencional utilizada, visto que são utilizados, no mínimo, dois pontos de análise no curso da doença. Recentemente, foi relatado o uso experimental *in vivo* da cepa KN99a de *C. neoformans* engenheirada para expressar luciferase. O uso combinado dessa cepa com técnicas de imagiologia permitiu o estudo da dinâmica de migração do fungo para o SNC, apresentando vantagens semelhantes às

encontradas por meio da utilização da cepa fluorescente de *M. bovis* (VANHERP et al., 2019).

O estudo da disseminação de *C. neoformans* no hospedeiro murino estava prevista neste trabalho, por meio do uso da técnica de imagiologia fluorescente combinada ao uso da linhagem fluorescente *PAB-GFP*. Esta linhagem foi selecionada pois mostrou um brilho mais intenso e estável em relação às demais linhagens construídas, além da manutenção da expressão de fenótipos de virulência da cepa selvagem.

Além desses fenótipos clássicos, o uso de *PAB-GFP* nos surpreendeu durante o teste de um fenótipo de *C. neoformans* recém-caracterizado *in vitro*. Recentemente, foi padronizada uma técnica de obtenção de leveduras dormentes de *C. neoformans* baseada na combinação de condições limitantes de nutrientes e oxigênio *in vitro* (HOMMEL et al., 2019). O advento dessa técnica significou um grande salto para o estudo da biologia dessas células e da infecção criptocócica latente, uma vez que células com características compatíveis com o estado de dormência só podiam ser obtidas até então a partir de animais infectados experimentalmente e isoladas com um rendimento extremamente baixo, tornando o procedimento inviável (Alanio et al., 2015).

Observamos que as culturas de *PAB-GFP* submetidas a esse protocolo reproduziram com sucesso muitos dos critérios definidores de células viáveis mas não cultiváveis, a citar o atraso no crescimento, baixa culturabilidade e manutenção da viabilidade celular (SALMA et al., 2013; HOMMEL et al., 2019). Mais surpreendentemente, mantiveram o sinal fluorescente do GFP sem drásticas perdas mesmo durante baixa atividade metabólica e após prolongada incubação, sobretudo em atmosfera de hipóxia. A maturação do GFP envolve modificações intramoleculares na presença de oxigênio, em níveis superiores aos demandados por outros fluoróforos-repórter, como mCherry. Baixas concentrações de oxigênio podem, portanto, prevenir a formação do cromóforo fluorescente (SHANER et al., 2005). Contudo, há outros estudos que, assim como o nosso, transpuseram as famigeradas limitações do uso do GFP em condições de hipóxia (CORALLI et al., 2001; SHANER et al., 2005). Hansen e colaboradores (2001) observaram que biofilmes da bactéria *Streptococcus gordonii* exibiram um requerimento mínimo extremamente baixo de oxigênio, de 0,00001% ou 0,1 ppm., para a maturação do GFP. Além disso, mesmo após a completa perda do sinal quando sob menores níveis de oxigênio, a fluorescência era inteiramente recuperada nos



minutos seguintes à reoxigenação da amostra. Nesse sentido, é possível que os níveis de oxigenação atingidos durante o protocolo de obtenção de células dormentes utilizado aqui (inferiores a 0,1% O<sub>2</sub>), não foram suficientemente baixos para afetar drasticamente a fluorescência do GFP. Ou, ainda, é plausível que o sinal do fluoróforo foi recuperado logo após a reexposição das leveduras à normoxia.

Uma particularidade extremamente interessante que constatamos nas leveduras PAB-GFP dormentes foi o padrão de distribuição intracelular da proteína Pab1, compatível com o aspecto de grânulos ribonucleoproteicos. A formação de tais grânulos não-membranosos é uma resposta adaptativa de eucariotos a condições de estresse celular diversas, e ocorrem juntamente ao declínio de processos de tradução (RIBACK et al., 2017). Eles se dividem basicamente em corpos de processamento e grânulos de estresse (GE), e enquanto o primeiro serve geralmente como um sítio de degradação de transcritos, acredita-se que GE atuem no armazenamento de mRNA, silenciamento traducional e proteção do RNA contra degradação (BUCHAN & PARKER, 2009; ANDERSON & KEDERSHA, 2009; KROSCHWALD et al., 2018). PAB1 é considerada um sensor de estresse fisiológico e um marcador clássico de GE, frequentemente na sua forma fusionada a GFP, como o caso deste estudo (BUCHAN et al., 2009; BUCHAN et al., 2011; MARTANI et al., 2015; RIBACK et al., 2017). Enquanto o nocaute de PAB1 resulta na menor frequência desses grânulos em *Saccharomyces cerevisiae*, sua superexpressão nesta levedura está relacionada a indução de fenótipos mais tolerantes a diferentes estresses (SWISHER & PARKER, 2010; MARTANI ET AL., 2015). Em *C. neoformans*, até então, só há descrições da presença de PAB1 em GE em resposta ao estresse térmico e osmótico, embora em outras leveduras se estenda à outras respostas como à depleção de fontes de carbono (glicose) e inibição da cadeia respiratória (BUCHAN et al., 2011; LEV et al., 2012; YANG et al. 2014). Interessantemente, essas duas últimas condições representam dois dos principais estresses indutores de células dormentes de *C. neoformans in vitro* (HOMMEL et al., 2019).

Sabe-se que um dos mecanismos de geração de GE é a transição do citoplasma de um estado mais fluido para um de maior rigidez, protegendo a célula em condições adversas por mecanismos pouco conhecidos, presumivelmente regulação metabólica, conservação energética e proteção de macromoléculas contra danos (BERNSTEIN et al., 2006; PETROVSKA et al., 2014; MUNDER et al., 2016; RIBACK et al., 2017). Essa transição de

fase líquida-sólida durante o estresse é mediada pela condensação de proteínas ligadoras de RNA como Pub e a própria Pab1, e ocorrem diante de diversos estresses que parecem convergir em um fenômeno comum de redução do pH do citosol, em razão da inatividade de bombas de próton sob o estresse celular. Esse estado de separação de fase vem sendo associado à entrada na dormência e pode ser revertido, o que coincide com o prosseguimento do ciclo celular e reativação da célula (RIBACK et al., 2017; KROSCHWALD et al., 2018; HEIMLICHER et al., 2019). Em *C. neoformans*, a suplementação de leveduras dormentes com ácido pantotênico, precursor de acetil-CoA, aumenta a frequência de células reativadas. Embora não tenha sido investigado alterações estruturais vinculadas a essa reativação, já foi demonstrado que os níveis de acetil-CoA regulam parcialmente a formação de GE em leveduras de *S. cerevisiae* sujeitas à privação de glicose (ROLLINS et al., 2017; HOMMEL et al., 2019). Nesse contexto, nossos resultados fortalecem uma associação estreita entre a dinâmica de formação de grânulos de estresse e os processos de dormência e reativação. Ensaio que avaliem a capacidade de dissolução de grânulos de estresse mediante o estímulo com fatores de reativação serão úteis para esclarecer essa questão.

Curiosamente, observamos aglomerados de PAB-GFP não somente no citosol, bem como também no interior do núcleo de *C. neoformans*. Embora majoritariamente encontrada difusa no citosol, PAB1 é regularmente importada pelo núcleo para atuar na biogênese do mRNA e em seguida na exportação do mRNA destinado a grânulos ribonucleoproteicos ou, mais comumente, à tradução (BRUNE et al., 2005; BRAMBILLA et al., 2018). Interessantemente, a restrição e acúmulo dessa proteína no núcleo já foi descrita em diferentes condições de estresse em células de humanos, e parecem ter impacto na redução da síntese proteica (BURGESS et al., 2011; COPELAND et al., 2013). Durante a indução da dormência, *C. neoformans* experimenta uma redução da diversidade concomitantemente ao aumento da concentração proteica, indicando que, embora de maneira geral reprimidos, os processos de transcrição e tradução ainda ocorram nesse estado celular (HOMMEL et al., 2019). Recentemente, a retenção nuclear de mRNA paralelamente à formação de GE citoplasmáticos foi descrita em células humanas sob estresse induzido com tubercidin. No estudo, os autores atribuíram o acúmulo no sítio nuclear a transcritos formados durante o estresse, enquanto a realocação para grânulos citoplasmáticos àqueles produzidos

anteriormente ao tratamento com tubercidin (HOCHBERG-LAUFER et al., 2019). Acreditamos que o mesmo padrão possa estar ocorrendo no nosso modelo.

Vale ressaltar a possibilidade de parte dos aglomerados de PAB1 observados no citosol se encontrar em vacúolos e ser alvo de autofagia (BUCHAN et al., 2013). De fato, células dormentes de *C. neoformans* obtidas com o protocolo que utilizamos apresentam tipicamente largos vacúolos e outras características associadas a autofagia, como despolarização mitocondrial e indução dos genes ATG9 e VPS13 (HOMMEL et al., 2019).

Nossos resultados sustentam o uso de PAB-GFP em ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo* que usufruam de técnicas baseadas em fluorescência, especialmente por ser a primeira linhagem fluorescente engenheirada de *C. neoformans* comprovadamente capaz de engajar na dormência e sobretudo permanecer rastreável. Além disso, o uso dessa linhagem pode ser particularmente importante em ensaios onde se deseja determinar carga fúngica em infecções que façam uso de células dormentes geradas *in vitro* (e. g. ensaios de reativação), uma vez que a metodologia convencional de quantificação de UFC não é adequada devido a razões que remontam a própria definição das células viáveis mas não cultiváveis.

Ademais, nossos resultados sugerem que PAB1 medeia diferentes mecanismos de regulação pós-transcricionais de células dormentes de *C. neoformans* em resposta aos estresses fisiológicos envolvidos na entrada da dormência, e que podem estar implicados tanto na sobrevivência e manutenção fenotípica dessas células quanto na dinâmica de quebra da dormência. Nosso trabalho também abre caminho para o uso do GFP (ou outras proteínas fluorescentes) como molécula-repórter para a investigação do comportamento, citolocalização e papel biológico de proteínas de interesse na dormência e reativação de *C. neoformans*, processos de grande relevância na patofisiologia da criptococose (DROMER et al., 2011; BRUNET et al., 2018).

## **4. CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE DISSEMINAÇÃO DE *C. NEOFORMANS* EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO**

Este capítulo aborda o estudo de potenciais sítios reservatórios para a infecção criptocócica experimental murina. Como mencionado anteriormente, a identificação de sítios colonizados durante a infecção com *C. neoformans* precede a avaliação do sítio como reservatório da infecção latente. Devido à impossibilidade, em razão de problemas técnicos e alheios à nossa vontade, de conduzir os ensaios avaliativos da disseminação da infecção criptocócica experimental murina *in vivo* com o auxílio do aparelho de imagiologia de fluorescência IVIS® Lumina, decidimos conduzir as análises de disseminação por meio da detecção do fungo por metodologias convencionais como a determinação de UFC.

### **4.1. Materiais e Métodos**

#### **4.1.1. Condições de cultivo de *C. neoformans***

As linhagens de *C. neoformans* H99 (variedade *grubii*) e B3501 (variedade *neoformans*) foram cultivadas durante 24 horas a 30°C sob agitação de 120 rpm em meio YPD líquido (extrato de levedura 1%, glicose 2% e peptona 2%). Posteriormente, foram lavadas com PBS, contadas em câmara de Neubauer e a suspensão de leveduras ajustada de acordo com a concentração de interesse para a infecção.

#### **4.1.2. Uso de animais para experimentação**

Todos os procedimentos envolvendo os camundongos e seus cuidados foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Brasília (UnBDoc nº 66729/2016) e conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Brasileiro de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### **4.1.3. Infecção de camundongos e determinação de carga fúngica**

Camundongos (*Mus musculus*) BALB/c e C57BL/6 de 10 a 12 semanas de idade foram utilizados para a infecção com *C. neoformans* cepa H99 ou B3501 cultivados como descrito anteriormente. Previamente à infecção, os animais foram anestesiados e então

inoculados: i) via intranasal ou intratraqueal com 50 uL de PBS contendo  $5 \times 10^4$  ou  $1 \times 10^5$  leveduras, respectivamente; ii) ou via intravenosa com 50 uL (via plexo venoso retro-orbital;  $5 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$  leveduras) ou 100 uL (veia lateral caudal;  $1 \times 10^4$  leveduras) de suspensão fúngica.

Nos tempos de análise pós-infecção indicados nas figuras, procedeu-se com a coleta da urina dos animais, anestesia para a coleta de sangue via plexo retro-orbital (em tubo contendo anticoagulante) e, posteriormente, eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>. Os camundongos foram dissecados para a coleta, pesagem e maceração dos órgãos com o uso do *Precellys*. As amostras de tecido lisado foram submetidas a diluições seriadas com PBS e plaqueadas em meio YPD agar a 10% de Soro Fetal de Cavalo (SFC), um estímulo necessário à recuperação da capacidade de proliferação de células dormentes de *C. neoformans* (ALANIO *et al.*, 2015). As amostras de urina e sangue foram plaqueadas (100 µL) sem diluição. Após 3-5 dias de crescimento em estufa à 30°C, foi realizada a contagem de UFC para a determinação da carga fúngica total. Para a mensuração da carga fúngica da medula óssea, procedeu-se com a metodologia de obtenção de células da medula óssea para diferenciação de macrófagos, descrita anteriormente. O pellet das células totais obtido foi ressuspensão em 150 uL de PBS e plaqueado inteiramente no meio.

#### **4.1.4. Análise estatística**

A análise estatística foi conduzida de acordo como mencionado anteriormente.

## **4.2. Resultados**

### **4.2.1. *C. neoformans* é capaz de se disseminar para a uma variedade de órgãos durante a infecção experimental murina, incluindo a medula óssea**

Investigamos primeiramente a disseminação de *C. neoformans* (cepa H99) por meio do uso de um modelo de infecção pulmonar via intratraqueal em camundongos C57BL/6. Foi avaliado a presença de leveduras em alguns fluidos corpóreos (urina e sangue) e em uma variedade de sítios anatômicos, incluindo aqueles comumente afetados (cérebro e pulmões) e órgãos menos frequentemente envolvidos ou nunca relatados na criptococose, como os olhos, baço, fígado, rins, glândulas sexuais acessórias (vesículas seminais e próstata, que foram retiradas juntamente a um fragmento da uretra; VSPU), testículos (incluindo epidídimo) e medula óssea dos ossos longos (fêmures e tíbias) (figura 22A).

Curiosamente, detectou-se a presença de *C. neoformans* em todos os tipos de amostras biológicas avaliadas, embora tenha sido encontrado na urina, sangue, testículos, olhos e medula óssea de somente alguns indivíduos infectados ( $\leq 50\%$ ), o que pode ter ocorrido em parte devido ao limite da sensibilidade analítica. Além disso, a carga fúngica mensurada nesses sítios, bem como nas glândulas acessórias, foi inferior a 100 UFC, que pode ser considerada baixa, especialmente considerando que a infecção secundária cerebral apresentou valores médios na ordem de  $10^4$  células (figura 22A).

### **4.2.2. A medula óssea é um sítio secundário de infecção criptocócica em diferentes linhagens de camundongos**

Dentre os órgãos avaliados, a medula óssea nos despertou um interesse particular, haja vista ser um sítio reservatório de infecção latente recorrente em outros modelos de patógenos, embora nunca tenha sido estudada sob essa ótica em *C. neoformans* (DAS *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2016; SEBASTIAN *et al.*, 2017). Por meio da infecção experimental via intravenosa, observamos que a disseminação para a medula óssea ocorre dentro de 24 horas após a infecção, e é quantitativamente inferior, no mínimo 10 x, comparada à disseminação para outros sítios examinados (figura 22B), à exceção do sangue, que inesperadamente mostrou negatividade para a presença do fungo.

Esse fenômeno, da disseminação de *C. neoformans* para a medula óssea, foi reprodutível em uma linhagem murina diferente, BALB/c (figura 22A a E), considerada uma linhagem de camundongo mais resistente à criptococose (ZARAGOZA *et al.*, 2007). Foi possível constatar uma diferença na cinética de disseminação para a medula óssea nos camundongos BALB/c, que não apresentaram leveduras na medula óssea com 21 dias de infecção, mas apenas numa análise mais tardia, com 30 dias após a infecção (contra 14 dias no modelo C57BL/6) via intranasal (figura 22A e C). Insta salientar, entretanto, que a rota intratraqueal, que é superior à intranasal na entrega mais precisa do fungo no espaço alveolar dos pulmões; e o uso do dobro do inóculo ( $5 \times 10^4$  vs  $10^5$ ) na infecção de C57BL/6 podem ter influenciado na detecção mais prematura do fungo na medula óssea desses camundongos. Não obstante, não foi observado no modelo BALB/c a invasão cerebral no tempo de 21, mas apenas de 30 dias de infecção (resultados não exibidos), o que pode corroborar o resultado da não detecção do fungo na medula após 21 dias de infecção.

Mesmo considerando a plausibilidade dos resultados sofrerem influência do viés experimental exposto, esses resultados, juntamente à heterogeneidade dos dados de UFC, são sugestivos de que a migração para a medula óssea é dependente da susceptibilidade da resposta imune do indivíduo (figura 22A e C). Além disso, o fato da infecção cerebral ocorrer concomitantemente à da medula óssea, e somente após o acometimento dos pulmões na infecção via intratraqueal de camundongos BALB/c, indica que a presença de leveduras na medula óssea consiste de uma infecção secundária, resultado de uma disseminação a partir do sítio primário pulmonar, provavelmente de natureza hematogênica, como demonstrado aqui (figura 22B).

#### **4.2.3. Ambas as variedades de *C. neoformans* são capazes de colonizar a medula óssea murina**

Por fim, no intuito de avaliar se esse padrão de migração para a medula óssea não está restrito à cepa, mas abrange a espécie *C. neoformans*, utilizamos a cepa B3501 (variedade *neoformans*) para a infecção intravenosa de animais C57BL/6 em duas concentrações. Novamente, observamos a migração de leveduras para a medula óssea, e que inclusive ocorreu de forma dose-dependente, haja vista que a quantidade de células detectadas na

medula óssea aproximadamente dobrou (de  $47.3 \pm 25.1$  para  $104 \pm 63,0$ ), proporcionalmente ao aumento do inóculo (de  $5 \times 10^5$  para  $1 \times 10^6$  células) (figura 22D e E).

No entanto, outros ensaios serão necessários para elucidar o mecanismo de disseminação para a medula óssea (*i.e.*, se são carreadas por fagócitos ou vão livremente), o status metabólico das células neste sítio (*i.e.* se a medula abriga leveduras dormentes), e a capacidade de células dormentes em reativar a infecção latente e promover a infecção sistêmica a partir deste sítio anatômico.



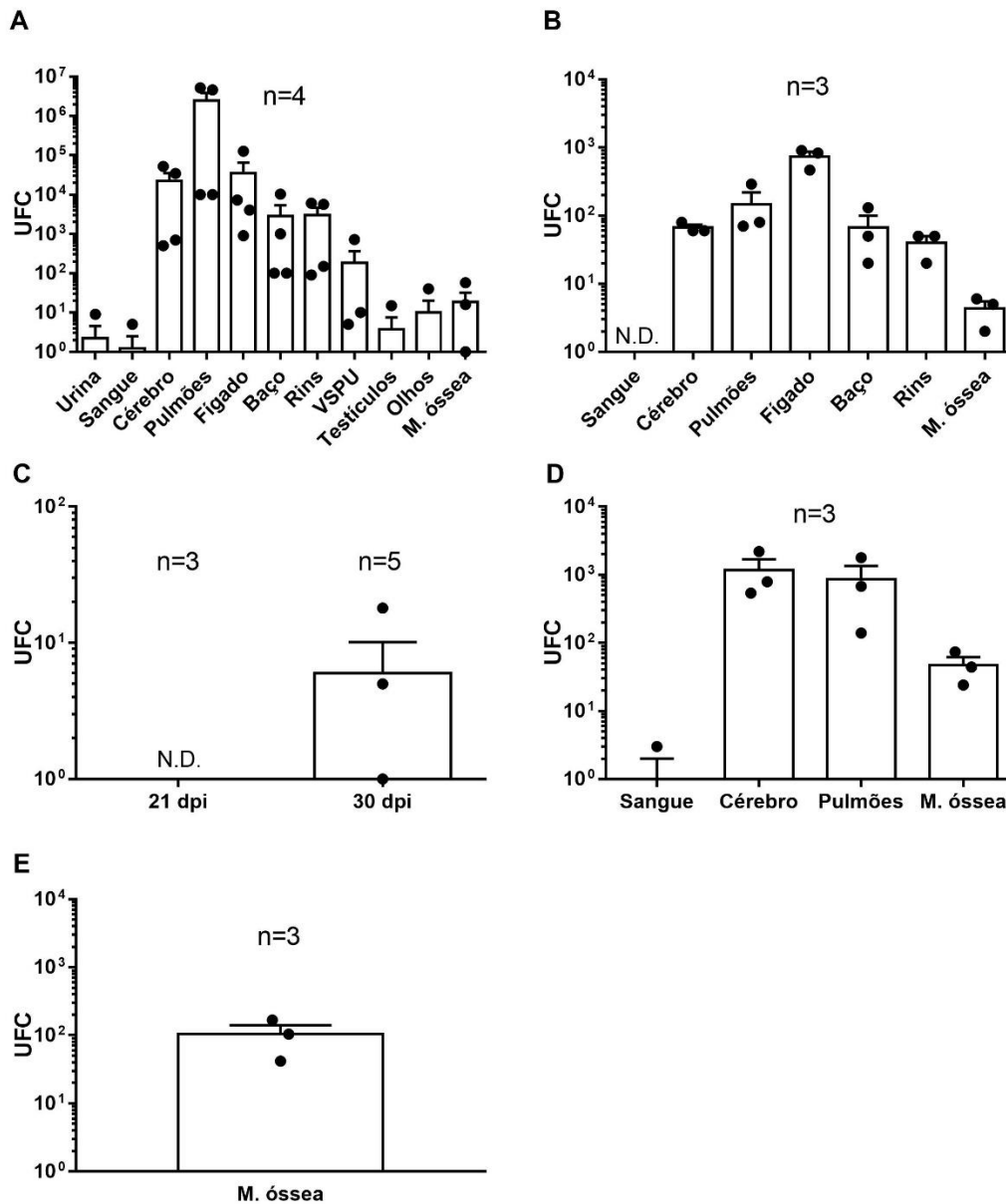


Figura 22. A infecção experimental de *C. neoformans* dissemina para uma série de tecidos murinos, incluindo a medula óssea. Quantificação total de UFC dos órgãos e fluidos indicados, coletados de camundongos infectados com *C. neoformans*. (A) Animais C57BL/6 foram infectados com  $1 \times 10^5$  leveduras da cepa H99, via intratraqueal, e analisados 14 dias pós-infecção (d.p.i.). (B) Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $1 \times 10^4$  leveduras da cepa H99, via intravenosa (veia lateral caudal), e analisados após 24 h de infecção. (C) Animais BALB/c foram infectados com  $5 \times 10^4$  leveduras da cepa H99, via intranasal, e analisados 21 e 30 dias d.p.i. para a presença de UFC na medula óssea. Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $5 \times 10^5$  (D) ou  $1 \times 10^6$  leveduras (E) da cepa B3501, via intravenosa (plexo venoso retro-orbital), e analisados 14 d.p.i. Vesículas seminais, próstata e uretra (VSPU). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SEM de UFC totais detectadas nos órgãos indicados e em 100  $\mu$ L de amostra de sangue ou urina.

### 4.3. Discussão

Nossos experimentos demonstram que *C. neoformans* é capaz de se disseminar, embora por vezes em baixa quantidade, para uma variedade de sítios anatômicos do hospedeiro murino, incluindo sítios de relevância na criptococose, como a próstata, já especulado como potencial reservatório da infecção em homens (DROMER *et al.*, 2011). Relatos de casos de pacientes HIV+ que apresentaram contaminação do trato urogenital (sêmen, fluido seminal, urina e a própria próstata) mesmo após o tratamento com antifúngicos fortalecem essa hipótese (LARSEN *et al.*, 1989; STAIB *et al.*, 1989; STAIB *et al.*, 1990).

Fomos capazes de detectar também, de forma inédita em modelo animal, o fungo na medula óssea murina, importante reservatório para a infecção latente de outros patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* (DAS *et al.*, 2013), *Leishmania sp.* (LOPES *et al.*, 2016), e o vírus HIV (CARTER *et al.*, 2010; SEBASTIAN *et al.*, 2017). A qualidade da medula óssea como sítio reservatório dos patógenos supracitados se dá mais especificamente por abrigarem células mesenquimais. Essas células podem fornecer um nicho favorável à persistência desses patógenos por apresentarem bombas de efluxo de drogas (DAS *et al.*, 2013), baixa produção de espécies reativas de oxigênio (DAS *et al.*, 2008), normalmente não expressarem moléculas de MHC II (JACOBS *et al.*, 2013) e residirem em sítios imunoprivilegiados (TORMIN *et al.*, 2011). Além disso, esses sítios são frequentemente sujeitos a hipóxia, fator envolvido na indução de células dormentes, inclusive de *C. neoformans* (MORANOVA *et al.*, 2009; HOMMEL *et al.*, 2019). Porém, até o nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou a capacidade de leveduras de *C. neoformans* infectarem tais células. Além disso, na medula óssea encontram-se outras células, de linhagem hematopoiética (como os monócitos), que poderiam ser alvo do parasitismo do fungo. Por fim, utilizamos rotas alternativas de infecção e diferentes linhagens tanto de camundongos quanto de *C. neoformans* que confirmaram a tendência deste em se alojar no interior da medula óssea.

É de crucial importância, entretanto, confirmar se essa baixa carga fúngica encontrada em tais sítios secundários de infecção seria o suficiente para promover uma nova infecção no hospedeiro. Do contrário, esses achados não possuem grande relevância biológica em termos da patofisiologia da infecção criptocócica latente ou mesmo de um relapso da doença, e refletem particularmente um fenômeno vinculado à disseminação do fungo em um cenário

onde o paciente já se encontra imunocomprometido e no qual a infecção foi derivada de demais sítios reservatórios, como os próprios pulmões. Um estudo realizado por Clancy e colaboradores (2006) abriu a possibilidade para o estabelecimento de uma infecção murina bem-sucedida a partir de doses incomumente pequenas. Os pesquisadores demonstraram que 22% dos isolados clínicos de *C. neoformans var. grubii* avaliados no estudo apresentaram uma dose letal mediana (LD50) com inóculos inferiores a 100 UFC na infecção de camundongos Swiss. Vale ressaltar que o sítio de inoculação utilizado, o SNC (via intracranial), é considerado imunoprivilegiado e também associado à letalidade da doença, podendo assim não refletir a infecção em outros sítios secundários (ENGELHARDT et al., 2017).

Deve-se também considerar que a quantificação de leveduras por meio da avaliação de UFC desses sítios possa estar subestimada, assumindo que parte da população celular possa se encontrar dormente – e portanto, não cultivável –, como previamente demonstrado durante a infecção pulmonar de camundongos por Alanio e colaboradores (2015). Embora a adição de soro fetal nas placas de meio sabouraud sólido no presente estudo possa ter contribuído para o restabelecimento da culturabilidade dessas células, os estímulos e condições adequadas para a reativação de leveduras dormentes de *C. neoformans* permanece enigmática (HOMMEL et al., 2019).

Nesse sentido, a infecção com as linhagens fluorescentes desenvolvidas pode ser útil na quantificação dessa população de leveduras por meio da citometria de fluxo do homogeneizado dos órgãos do animal. Entretanto, mesmo assumindo uma maior capacidade de quantificação da população de células dormentes com o uso de técnicas não dependentes da culturabilidade celular, a aplicação de sistemas de imagiologia de fluorescência no rastreamento da infecção com nossas linhagens fluorescentes, inicialmente prevista neste trabalho, certamente encontraria ainda maiores restrições na detecção do fungo nos sítios pouco colonizados. Limitações são inerentes a qualquer técnica, e nessa se encontra a relativamente baixa sensibilidade de detecção *in vivo* por aparelhos de imagiologia, devido a opacidade da pele e aos órgãos limitarem a formação de imagens fluorescentes abaixo de aproximadamente 100 µm (TOBIN et al., 2012). A exemplo, no estudo da infecção murina com cepas fluorescentes de *Mycobacterium bovis* acoplado ao uso desses aparelhos, uma boa visualização da infecção somente foi alcançada com inóculos grandes, na ordem de 10<sup>6</sup>

bactérias (KONG *et al.*, 2016). No modelo de infecção com uma linhagem de *C. neoformans* expressante de luciferase, o rastreamento confiável da infecção em camundongos só foi obtido a partir da presença mínima de  $10^4$  células no órgão, ao passo que uma visualização razoável dessas leveduras *in vitro* era alcançada com uma quantidade dez a cem vezes inferior (VANHERP *et al.*, 2019).

Estudos conduzidos em modelos animais têm auxiliado a elucidar essa intrincada questão da patofisiologia da infecção latente de *C. neoformans*. Dentre os modelos animais disponíveis, o rato (*Rattus rattus*) apresenta algumas vantagens, como um corpo avantajado que permite mais facilmente uma variedade de manipulações. A exemplo de sua vantagem anatômica, sua próstata, embora seja dividida em lóbulos (ventral, lateral, anterior e dorsal) como a de camundongos, apresenta um grande tamanho. O tamanho reduzido da próstata murina dificultou em muito o seu isolamento neste trabalho, limitando-nos a fazer a sua excisão juntamente com a uretra e vesículas seminais, como é indicado na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Desta forma, não foi possível identificar especificamente qual (is) sítio (s) anatômico (s) era (m) responsável (eis) por abrigar as leveduras detectadas. Porém, a análise histopatológica desses órgãos poderá ser útil nesse sentido.

A principal vantagem do modelo de rato, contudo, é a de que estes, diferentemente de camundongos, são capazes de desenvolver a criptococose pulmonar crônica (GOLDMAN *et al.*, 2000; GOLDMAN *et al.*, 2001; SABIITI *et al.*, 2012). Um dos poucos estudos realizados nesse modelo e que contribuíram para a investigação do tema tratado por esta tese foi conduzido por Goldman e colaboradores (2000). Eles observaram que, embora ratos imunocompetentes infectados com *C. neoformans* apresentassem a infecção pulmonar após infecção via intratraqueal, e que persistia por meses com a contenção do fungo nos pulmões, apenas alguns ratos apresentaram quadros de disseminação extrapulmonar. Dos tempos avaliados no trabalho (1.5, 6, 12.5 e 18 meses após a infecção), apenas ratos com 6 meses de infecção apresentaram infecção no baço (2/5 ratos, com UFC médio de  $2.46 \times 10^4$ ), rins (1/5, com uma colônia isolada) e 1/3 dos ratos avaliados após 18 meses apresentou uma colônia no cérebro. Mais interessante, após administrarem imunossuppressores aos ratos com a infecção crônica, foi observado um forte aumento da disseminação extrapulmonar, indício de reativação da infecção, possivelmente a partir de sítios reservatórios pulmonares. Não se descarta a possibilidade, entretanto, de que existam sítios reservatórios alternativos a esse.

Nesse contexto, é mais plausível que o envolvimento dos sítios extrapulmonares (*e.g.* medula óssea e próstata) verificado no presente trabalho esteja mais relacionado a um quadro de criptococose disseminada observado em hospedeiros imunocomprometidos (camundongos são considerados susceptíveis à infecção por *C. neoformans*) e subsequentemente associado à formação de sítios reservatórios para episódios de relapso da doença, do que uma disseminação resultado de infecção pulmonar primária em indivíduos imunocompetentes e gênese de infecções latentes. De fato, a detecção de *C. neoformans* na medula óssea ocorre quando já está em curso um alto comprometimento pulmonar e meningite, tanto em humanos, quanto no modelo de camundongo (figura 22A e C) (WOOD *et al.*, 1996; PANTANOWITZ *et al.*, 2000; SARAVANA *et al.*, 2003; DHARWADKAR *et al.*, 2014). Desta maneira, a instalação e persistência do fungo na medula óssea ainda poderia ser responsável pelos numerosos casos de relapso – e não de reativação - da infecção após terapias antifúngicas supostamente bem-sucedidas no combate da criptococose ou meningite associada. Ademais, a infecção de ratos para a análise de sítios de interesse como medula óssea e próstata podem ser importantes para a elucidação dessas questões.

A execução de demais experimentos necessários à avaliação do estado metabólico das leveduras encontradas nos mais diversos sítios anatômicos murinos (figura 22), e da capacidade destas células em reativar uma infecção latente, é fundamental para a determinação se o fungo encontra-se em dormência e, por conseguinte, se os sítios que abrigam essas células podem ser considerados reservatórios de infecções latentes promovidas pelos mesmos. Entretanto, tais avaliações apresentam determinadas limitações experimentais, visto que requerem análises (*e.g.* da expressão de genes do fungo relacionados à dormência e avaliação de marcadores metabólicos por citometria de fluxo) que utilizam grande quantidade de amostra do fungo.

Nesse sentido, o advento da metodologia recém-desenvolvida por Hommel e colaboradores (2019) para a produção de leveduras dormentes *in vitro* e sobretudo em abundância pode, entretanto, possibilitar o prosseguimento desses estudos. O conhecimento dessa metodologia possibilitaria a infecção experimental diretamente no sítio de interesse (*e.g.* a medula óssea) usando leveduras dormentes – contornando a limitação da baixa carga fúngica recuperada com as infecções convencionais –, seguida da avaliação da manutenção dessa dormência e/ou sua quebra seguida da disseminação no hospedeiro animal.

## 5. CAPÍTULO III – O PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA DORMÊNCIA DE *C. NEOFORMANS*

Este último capítulo inclui o meu trabalho iniciado durante o estágio de doutorado sanduiche (CAPES-PDSE) na unidade de Micologia Molecular do Instituto Pasteur (Paris, França). O objetivo desta etapa da tese foi investigar os mecanismos moleculares e celulares associados à infecção latente de *C. neoformans* e sua reativação em macrófagos murinos *in vitro*.

### 5.1. Materiais e métodos

#### 5.1.1. Cultivo de *C. neoformans*

O cultivo e indução de células dormentes se deu de acordo com o mencionado anteriormente. A culturabilidade e viabilidade das culturas foi monitorada a cada experimento a fim de confirmar o fenótipo de células dormentes vivas mas não cultiváveis (*Viable But Not Culturable, VBNC*).

#### 5.1.2. Teste de culturabilidade por CFU e método de plaqueamento

O teste de cultabilidade foi conduzido conforme descrito neste documento. Os resultados foram expressos como porcentagem média de culturabilidade. Alternativamente, foi calculada a razão entre a culturabilidade no tempo experimental indicado e a culturabilidade inicial (no tempo H2, exceto quando indicado), sendo o resultado expresso como “*Fold change*”.

Um método complementar para avaliação de culturabilidade descrito por Hommel et al., 2010, e que permite determinar a probabilidade de uma célula crescer foi utilizado. O método consiste em semear 100 células em 200 uL de meio mínimo (15 mM glicose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 29.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13 mM glicina e 3 uM de tiamina, pH 5.5, filtrado) por poço de uma placa de 96 poços e incubação durante 5 dias a 30°C. Assumindo que o nível de culturabilidade de uma população celular é sujeita à variação aleatória e segue uma distribuição de Poisson, a probabilidade ( $p$ ) de uma célula crescer pode ser determinada segundo a fórmula abaixo:

$$X \sim B(100, p) \quad p = 1 - \left(1 - \frac{x}{Y}\right)^{1/100}$$

Onde:

X= nº de poços positivos para o crescimento de colônias

Y= nº de poços semeados

Para testar a capacidade de reativação das leveduras dormentes foi adicionado ao meio mínimo SFB a 10 ou 2% ou ácido pantotênico (*D-Pantothenic acid hemicalcium salt*, Sigma) a 125 µM.

### **5.1.3. Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo**

A análise de viabilidade celular foi conduzida segundo protocolo anteriormente descrito nesta tese.

### **5.1.4. Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea**

Os macrófagos derivados da medula óssea (*Bone Marrow-Derived Macrophages*, BMM) foram obtidos por um método descrito anteriormente (MARIM et al., 2010). Resumidamente, os fêmures e as tíbias murinas foram dissecados de camundongos C57BL/6 de 10 a 12 semanas de idade e lavados com RPMI-1640 gelado (Sigma-Aldrich) para liberar células da medula óssea. As células foram centrifugadas (300 × g, 5 min, 4°C), ressuspensas em tampão de lise de hemácias (*Red Blood Cell Lysis Buffer*; Sigma-Aldrich), lavadas e semeadas a 2x10<sup>6</sup> células/placas de Petri em 10 mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) contendo 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor (SBF), 10% de meio condicionado de fibroblastos L929 (*L929-Cell Conditioned Medium*, LCCM) e 50 µg/mL de gentamicina em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% e 37°C. No dia três de cultivo, a cultura celular recebeu mais 10 mL de meio completo fresco. No dia sete, as monocamadas de macrófagos foram lavadas com meio aquecido a 37°C e desaderidas usando *TrypLE<sup>TM</sup> Express* (Gibco). Em seguida, as células foram lavadas, ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de (Gibco) e 5% de LCCM e plaqueadas durante a noite para a adesão celular. Antes dos experimentos, as monoculturas foram lavadas duas vezes com RPMI aquecido para a remoção das células não aderentes ou mortas em suspensão e incubadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB (exceto se mencionado de outra forma; meio completo de experimentação) e 1% de Penicilina e Streptavidina.

### **5.1.5. Ensaio de interação entre macrófagos e leveduras de *C. neoformans***

Macrófagos murinos foram diferenciados segundo mencionado anteriormente e plaqueados na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, sendo a quantidade determinada segundo a área do poço. Após um período de repouso durante a noite para permitir a adesão das células à placa, as monoculturas foram lavadas duas vezes com RPMI aquecido para a remoção das células não aderentes ou mortas em suspensão. As infecções se deram por meio da incubação dos macrófagos em meio RPMI completo contendo 10  $\mu\text{g/mL}$  de anticorpo monoclonal opsonizante 18B7 (mAb 18B7) e leveduras de *C. neoformans* na multiplicidade de infecção (MOI) 5 (*i.e.* cinco leveduras para cada macrófago), durante duas horas. Em seguida, as monoculturas foram lavadas de duas a três vezes com meio RPMI simples aquecido para a remoção de leveduras não internalizadas, adicionadas de meio completo fresco, e continuadas até 6, 12 ou 24 horas de interação, de acordo com o indicado nas legendas.

### **5.1.6. Ensaio de reativação de células dormentes co-cultivadas com macrófagos**

Após a aderência durante a noite e lavagem conforme mencionado anteriormente, as monoculturas de macrófagos foram tratadas para os ensaios com células polarizadas. Os macrófagos foram estimulados ou não (Uns) com 50 ng/mL de IFN- $\gamma$  (500 UI, Immunotools) sozinho ou simultaneamente com 100 ng/mL de LPS (*Escherichia coli* sorotipo O111:B4, Sigma), 20 ng/mL de IL-4 (Immunotools) ou 0,1  $\mu\text{M}$  de dexametasona (Sigma). Após 24 horas de tratamento, os poços foram lavados com RPMI aquecido e incubados com *C. neoformans* dormente (MOI 5) na presença de 10  $\mu\text{g/mL}$  de 18B7 para permitir a fagocitose das leveduras. Como controle, a suspensão de fungos e anticorpo opsonizante foi plaqueada em poços na ausência de células (Inóculo H2 ou H24). Em seguida, os poços foram lavados de duas a três vezes para a remoção do fungo não internalizado, sendo a co-cultura interrompida (controle H2) ou prolongada por mais 22 horas (ponto H24) com um meio fresco completo contendo os estímulos mencionados a fim de se manter o estado de polarização do macrófago. Vale ressaltar que o grupo tratado concomitantemente com IFN- $\gamma$  e LPS recebeu uma dose de LPS cinco vezes maior (500 ng/mL) durante o reestímulo a fim de adquirir macrófagos com atividade microbicida frente a *C. neoformans*.



Nos tempos experimentais citados, os macrófagos foram lisados com 200  $\mu$ L de uma solução de PBS a 0,05% de SDS à temperatura ambiente durante um minuto. Após a confirmação da lise total dos macrófagos com o auxílio de um microscópio, a suspensão de leveduras foi imediatamente adicionada de 800  $\mu$ L de PBS para diluição do SDS e centrifugadas a 1500 x g durante 4 minutos. As células foram lavadas por mais duas vezes com PBS e em seguida utilizadas para análise de culturabilidade e/ou de viabilidade do fungo. No tempo de 24 horas de interação (H24) as leveduras intracelulares também foram coletadas, lavadas e utilizadas para análise de culturabilidade, mas não de viabilidade, em razão da quantidade limitada de células obtidas.

Previamente aos ensaios mencionados, para confirmar a polarização dos macrófagos para os perfis esperados, foi realizada a extração do RNA total dos macrófagos estimulados por 24 horas (tempo H0) e análise da expressão de genes-assinatura de perfis M1 (*iNOS*, *Il6*) ou M2 (*Arg1*) por RT-qPCR. Paralelamente, o sobrenadante foi coletado e submetido à dosagem de nitrito e IL-6 pelo método de Griess e por ELISA, respectivamente. Além disso, as células foram avaliadas para a expressão de MHC-II, marcador de células M1, por citometria de fluxo.

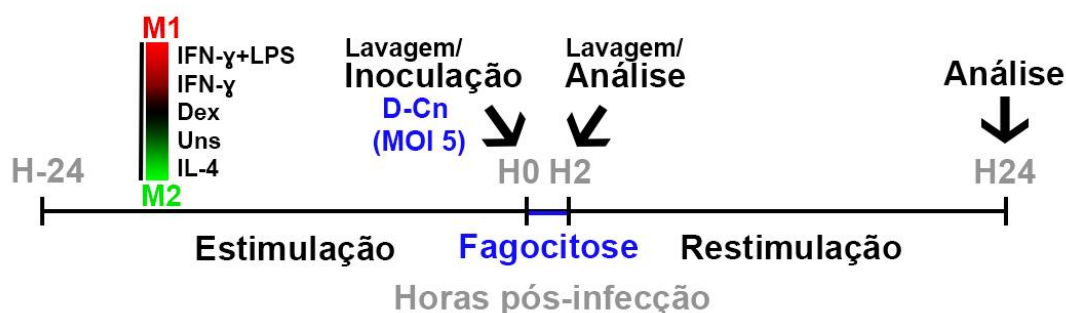


Figura 23. Desenho experimental do experimento de reativação de leveduras dormentes de *C. neoformans* co-cultivadas com macrófagos murinos.

### 5.1.7. RT-qPCR

O RNA total de macrófagos foi extraído com o RNAeasy kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, os níveis de transcritos de *iNOS*, *Il6* e *Arg1* foram avaliados por meio de RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) pelo método SYBR green utilizando-se o *SuperScript III Platinum SYBR green one-step* qRT-PCR kit (Invitrogen). As reações foram conduzidas em 20  $\mu$ L contendo 1x *supermix* (SYBR Green I,

MgSO<sub>4</sub>, Platinum taq DNA polimerase, dNTPs e estabilizantes), 0,3 uM de cada oligonucleotídeo e 4 ng de amostra de RNA. Após a etapa inicial de síntese de cDNA a 50°C por 15 min seguida de desnaturação a 95°C por 5 min, as amplificações foram realizadas por 50 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 30 s no aparelho LightCycler 480 (Roche Diagnostics). A expressão dos genes mencionados acima foi normalizada de acordo com a expressão do gene constitutivo GAPDH e expressa como “*Fold change*”, calculado pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A sequência dos oligonucleotídeos utilizados é listada na tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Oligonucleotídeos usados nas análises de RT-qPCR.

<b>Gene</b>	<b>Senso (5'-3')</b>	<b>Anti-senso 5'-3'</b>
<i>Arg1</i>	GTTCCCAGATGTACCAGGATTC	CGATGTCTTTGGCAGATATGC
<i>GAPDH</i>	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
<i>Il6</i>	GCTACCAAACCTGGATATAA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
<i>iNOS</i>	CGAAACGCTTCACTTCCAA	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT

### 5.1.8. Quantificação indireta de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico nas amostras de sobrenadante celular foi determinada de forma indireta por meio da quantificação do seu catabólito nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) pelo método da reação de Griess. Resumidamente, a amostra foi incubada com igual volume de reagente de Griess (combinação de uma solução de 1% de sulfanilamida em 5% de ácido orto-fosfórico e uma solução a 0,1% de cloridrato de naftiletlenodiamino) durante 5 minutos à temperatura ambiente. A concentração de nitrito foi calculada com base em uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (100 a 1,56 uM) em meio completo de experimentação. O corante azo formado foi quantificado por espectrofotometria a 540 nm.

### 5.1.9. Dosagem de citocinas

A avaliação dos níveis de IL-1β, IL-6 ou pro-IL-1β presentes nas amostras de sobrenadante ou lisado celular, no caso da última, se deu por de ELISA (*Enzyme-Linked*

*Immunosorbent Assay*; Ensaio de Ligação Imunoenzimático), de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). Os resultados foram expressos em pg/mL de citocina.

### **5.1.10. Imunofenotipagem celular**

A análise da expressão de MHC-II e moléculas co-estimulatórias de macrófagos foi realizada por citometria de fluxo. Após a incubação das células infectadas ou não com *C. neoformans* de acordo como descrito anteriormente, as células foram estimuladas ou não com 50 ng de IFN- $\gamma$  e 500 ng/mL de LPS e incubadas novamente até completar 24 horas de interação. Em seguida, as células foram coletadas e ressuspensas em PBS suplementado com 2% de SFB (solução de bloqueio) e marcadas duplamente com anticorpos monoclonais anti-CD11b (APC) e anti-MHC-II (PE), anti-CD80, anti-CD86 (conjugados a FITC) (todos eBioscience). Após uma hora de marcação a 4°C, as células foram lavadas e adquiridas por citometria de fluxo utilizando o Guava easyCyte 12HT Benchtop ou o FACSVerse (BD Biosciences), seguido da análise no programa FlowJo (versão X).

### **5.1.11. Sequenciamento de alto desempenho de RNA**

Após 6 horas de interação *C. neoformans*-macrófago, o sobrenadante foi coletado e armazenado e a monocamada de macrófagos foi lisada sobre o gelo. O RNA total das amostras do macrófago foi isolado utilizando o kit *RNAeasy* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante, ressuspensado em 50  $\mu$ L de água MilliQ, alíquotado e congelado a -80°C. O RNA total foi quantificado e teve sua integridade avaliada com o auxílio do *Bioanalyzer* 2100. O índice de integridade (*RNA Integrity Number*, RIN) das amostras foi igual ou superior a 9,9, de uma escala até 10 (dado não exibido)

Bibliotecas enriquecidas de RNA poliadenilado foram preparadas utilizando o TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram sequenciadas com o HiSeq 2500 (Illumina) gerando por volta de 25 a 30 milhões de leituras de fragmentos de extremidade emparelhada de 100 pb por amostra, pela equipe da instalação *The Biomics Platform* do Institut Pasteur (Paris, França). A contagem e anotações dos genes foram realizadas por Hugo Varet, do grupo de laboratório da própria instalação, sendo a análise da expressão diferencial de genes realizada pelo professor Christian Hoffman (USP). O diagrama de Venn foi produzido com o uso de uma

ferramenta *online* desenvolvida por Heberle e colaboradores (2015). Os demais heatmaps foram criados com o uso do programa *GraphPad Prism v.6.0*.

### **5.1.12. Análise estatística**

A análise estatística foi conduzida de acordo como mencionado anteriormente.

## 5.2. RESULTADOS

### 5.2.1. A infecção com leveduras dormentes de *C. neoformans* induz, no macrófago macrófago, uma resposta transcricional reduzida e específica

Por meio do sequenciamento de alto desempenho de transcritos de mRNA (RNAseq) do macrófago, avaliamos a regulação de vias de sinalização e genes relacionados ao metabolismo e principalmente à resposta imune em macrófagos diferenciados da medula óssea murina na interação com leveduras de *C. neoformans* em diferentes estados metabólicos: fase exponencial (E-Cn), estacionária (S-Cn) ou leveduras dormentes (D-Cn).

A análise de componentes principais (PCA) dos dados globais do transcriptoma e do *heatmap* global dos genes diferencialmente regulados mostrou diferentes padrões para todas as condições, possuindo D-Cn um padrão específico, porém próximo de S-Cn (figura 24A e B). E-Cn induziu a mais intensa resposta transcricional, com 2281 genes diferencialmente regulados, seguido de S-Cn e D-Cn (1991 e 813, respectivamente), que promoveu a infecção mais silenciosa (figura 24B e C). D-Cn foi capaz de regular um reduzido e específico transcriptoma (figura 24C), com 45 genes exclusivamente regulados pela mesma, incluindo a regulação negativa de *Nox1*, associado a produção de superóxidos e peróxido de hidrogênio. Ademais, conservou a capacidade de modulação de uma série de genes cuja expressão está associada à persistência no hospedeiro, incluindo os genes *Cat*, *Sod2* e *Cd274*, e a inibição de genes de papel oposto, como *Cd14*, *Tlr9* e *Ifngr1* (tabela 3). Contrariamente às formas não dormentes, D-Cn não induziu os genes autofágicos *Atg5* e *Atg12*, ou alguns genes normalmente associados ao reconhecimento e sinalização celular na infecção com fungos, como *Clec4e*, *Clec4d*, *Mrc1*, *Malt1*, *Syk* e *Raf1*.

Além disso, enquanto E-Cn induziu uma série de genes das famílias de quimiocinas CC e CXC, associadas principalmente ao recrutamento de monócitos e neutrófilos, respectivamente, macrófagos infectados com D-Cn ou S-Cn exibiram um conjunto menor e mais fracamente induzido desses genes, especialmente aqueles do tipo CXC (figura 25). Assim, de forma geral dentre as formas de *C. neoformans* avaliadas, E-Cn induziu a mais intensa expressão de genes pró-inflamatórios, como também um painel mais amplo destes, figurando exclusivamente nele genes como *Casp1*, *Nox2*, *Ptgs2*, *Cd40*, *Stat1* e *Jak1*, sendo

os dois últimos integrantes chaves da via de sinalização JAK-STAT, importante para o controle de várias citocinas e fatores de crescimento.

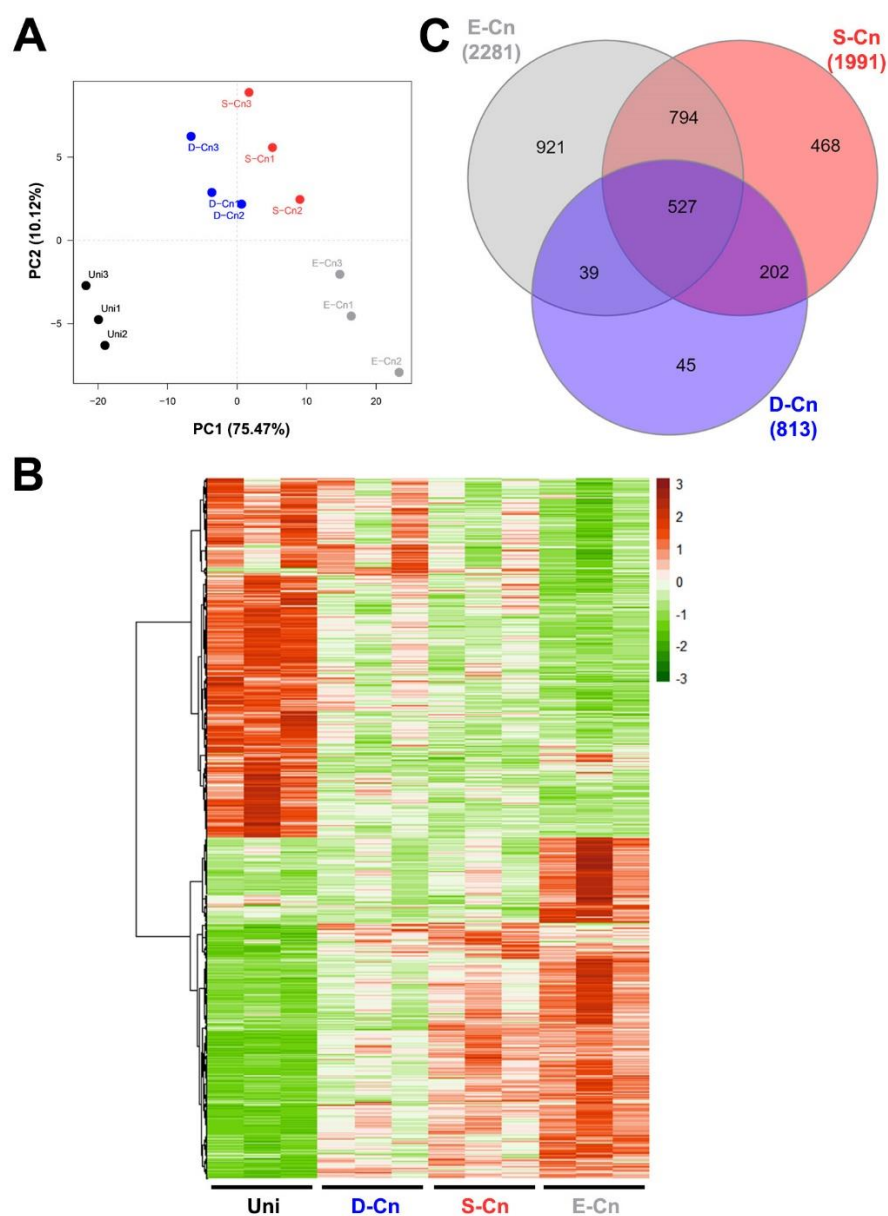


Figura 24. A infecção com leveduras dormentes de *C. neoformans* induz, no macrófago murino, um transcriptoma reduzido e específico. (A) A análise de componentes principais (PCA) do transcriptoma global do macrófago indicou diferenças drásticas entre o grupo não infectado (Uni) e os grupos infectados por 6 horas com *C. neoformans* na fase de crescimento exponencial (E-Cn), estacionária (S-Cn) ou no estado dormente (D-Cn). A maior diferença se deu na infecção por E-Cn, ocorrendo na infecção por D-Cn um perfil diferente das demais, mas próximo de S-Cn. (B) O heatmap global do transcriptoma permitiu observações semelhantes à do PCA. (C) O diagrama de Venn exibiu a intersecção de uma série de genes diferencialmente expressos comuns a todas as infecções, comuns a E-Cn e S-Cn, e em uma menor extensão entre cada um destes, principalmente E-Cn, e D-Cn. D-Cn modulou um conjunto de genes exclusivos e globalmente o menor transcriptoma detectado. Os dados representam a média de 3 replicatas biológicas independentes de genes diferencialmente regulados em relação ao grupo controle não infectado ( $p$  ajustado  $< 0,05$  e  $|\text{Log2FC}| > 0,5$ ).

Tabela 3. Genes selecionados que foram diferencialmente expressos em macrófagos murinos infectados por *C. neoformans*.

Regulação	Descrição	Gene
Regulados por todos <i>C. neoformans</i>	<i>Argininosuccinato Sintetase 1</i>	<i>Ass1</i>
	<i>Catalase</i>	<i>Cat</i>
	<i>Ligante 2 de Quimiocina com Motivo C-C</i>	<i>Ccl2</i>
	<i>Receptor 2 de Quimiocina com Motivo C-C</i>	<i>Ccr2</i>
	<i>Gene imunoresponsivo 1</i>	<i>Acod1 (IRG1)</i>
	<i>Antagonista do receptor de Interleucina 1</i>	<i>Il1rn</i>
	<i>Matriz Metaloproteinase 2</i>	<i>Mmp12</i>
	<i>Proteína homóloga do entalhe do locus neurogênico 4</i>	<i>Notch4</i>
	<i>Ligante de morte celular programada 1</i>	<i>Cd274 (PD-L1)</i>
	<i>Superóxido Dismutase 2</i>	<i>Sod2</i>
	<i>Antígeno de diferenciação</i>	<i>Cd14</i>
	<i>Interleucina-1 Beta</i>	<i>Il1b</i>
	<i>Receptor do Tipo Toll 9</i>	<i>Tlr9</i>
	<i>Gene autofágico 12</i>	<i>Atg12</i>
<i>Gene autofágico 5</i>	<i>Atg5</i>	
Regulados por todos <i>C. neoformans</i> exceto D-Cn	<i>Membro D da família do domínio da lectina tipo C 4</i>	<i>Clec4d (Dectin3, MCL)</i>
	<i>Membro E da família do domínio da lectina tipo C 4</i>	<i>Clec4e (Mincle)</i>
	<i>Receptor de manose</i>	<i>Mrc1/Cd206</i>
	<i>Proteína de Translocação 1 do Linfoma de Tecido Linfoide Associado à Mucosa</i>	<i>Malt1</i>
	<i>Óxido nítrico sintase 2</i>	<i>Nos2 (iNOS)</i>
	<i>Oncostatina M</i>	<i>Osm</i>
	<i>Raf-1 Proto-Oncogene, Serina</i>	<i>Raf1</i>
	<i>Tirosina quinase de baço</i>	<i>Syk</i>
	<i>Antígeno de ativação de linfócito T CD86</i>	<i>Cd86</i>
	<i>NADPH Oxidase 1</i>	<i>Nox1</i>
Regulados apenas por D-Cn	<i>Caspase 1</i>	<i>Casp1</i>
	<i>Antígeno de diferenciação 40</i>	<i>Cd40</i>
	<i>Membro A da família do domínio da lectina tipo C 6</i>	<i>Clec6a (Dectin2)</i>
	<i>Janus Kinase 1</i>	<i>Jak1</i>
	<i>NADPH Oxidase 2</i>	<i>Nox2/Cybb</i>
	<i>Prostaglandina-Endoperóxido Sintase 2</i>	<i>Ptgs2</i>
	<i>Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1</i>	<i>Stat1</i>
	<i>Receptor do Tipo Toll 2</i>	<i>Tlr2</i>
Regulados apenas por E-Cn	<i>Interleucina 10</i>	<i>Il10</i>

Os genes positivamente e negativamente regulados foram representados em alaranjado e verde, respectivamente.

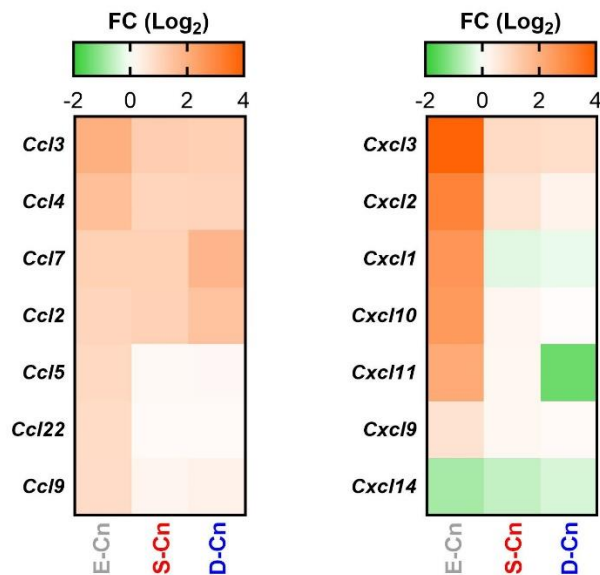


Figura 25. A infecção por *C. neoformans*, especialmente na fase exponencial, induz diversos genes relacionados a resposta quimiotática. *Heatmap* de genes das famílias de quimiocinas CC e CXC que foram diferencialmente regulados, em sua maioria positivamente, por *C. neoformans*, especialmente na condição de infecção por E-Cn.

### 5.2.2. Leveduras dormentes de *C. neoformans* são incapazes de ativar o inflamassoma NLRP3 em macrófagos murinos

Decidimos avaliar se as vias de sinalização do inflamassoma eram afetadas diferentemente entre o fungo dormente e não-dormente. A análise de RNAseq nos permitiu observar a expressão diferencial de uma série de genes do inflamassoma no macrófago sob infecção com quaisquer formas de *C. neoformans*. De forma geral, os genes relacionados à função de reconhecimento pelo complexo do inflamassoma (*Nlrp3*, *Nlrp1b* e *Zbp1*) ou de seus produtos (*Il1r1*) foram inibidos, enquanto, de acordo, o gene antagonista do receptor de IL-1, *Il1rn*, foi induzido (figura 26B). Consistentemente, *Il1b* foi reprimido em todas as infecções. Curiosamente, enquanto foi observada a tendência de indução de *Il1a* pelas formas não-dormentes, D-Cn foi incapaz de induzir esse gene. Em adição, genes associados a caspases inflamatórias, *Casp1* e *Casp4*, necessárias a função executora do inflamassoma, foram significativamente induzidas por E-Cn, mas não pelas demais leveduras.

A ativação do inflamassoma NLRP3 ocorre normalmente mediante dois sinais: reconhecimento de determinadas citocinas ou PAMPs, como LPS, levando à transcrição e



produção de pró-IL-1 $\beta$  e NLRP3 (denominado *priming*); e subsequentemente o reconhecimento de um sinal de dano (DAMP), o que resulta na maturação e secreção de IL-1 $\beta$ . Observamos que a infecção com *C. neoformans* não repercutiu no aumento dos níveis intracelulares de pro-IL-1 $\beta$  após 12 ou 24 horas de interação (Figura 26C), como observado por meio do estímulo com LPS, concordando com dados da literatura (GUO et al., 2013) e os nossos resultados de RNAseq (figura 26A) que mostram que a infecção de macrófagos com leveduras encapsuladas de *C. neoformans* é incapaz de induzir o *priming*. Consistentemente com dados prévios do nosso grupo (BÜRGELE et al., 2019), a interação entre o macrófago pré-estimulado com LPS (primado) e E-Cn ou S-Cn resultou no aumento da secreção de IL-1 $\beta$  após 24 horas de co-cultivo (figura 26D). Para verificar se o inflamassoma NLRP3 estava envolvido nesse aumento, infectamos também macrófagos derivados de camundongos deficientes para o seu receptor homônimo, quando observamos uma significativa queda dos níveis da citocina no sobrenadante celular. Interessantemente, leveduras da fase estacionária inativadas por calor ou leveduras dormentes foram incapazes de elevar significativamente os níveis de IL-1 $\beta$ , independentemente do macrófago utilizado. Em conjunto, nossos resultados demonstram que as leveduras dormentes de *C. neoformans* não só conservam a habilidade de leveduras não-dormentes em reprimir o primeiro sinal para ativação do inflamassoma como, diferentemente dessas, e mesmo na presença de um estímulo exógeno para o primeiro sinal, não ativam o inflamassoma NLRP3.

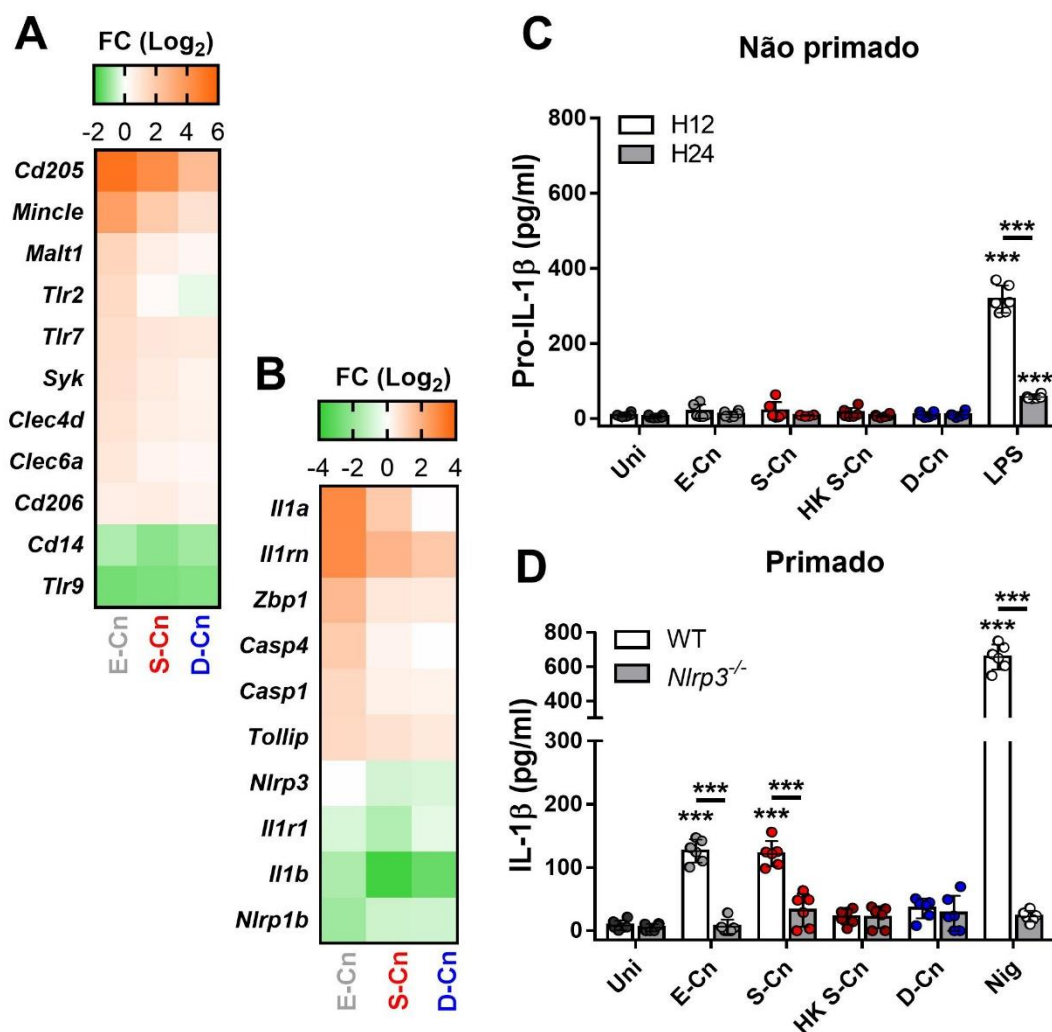


Figura 26. Leveduras dormentes de *C. neoformans* são incapazes de ativar o inflamassoma NLRP3 em macrófagos. (A) Genes pertencentes e relacionados a família de receptores do tipo Toll ou de lectinas tipo C, associadas ao priming, e seus transdutores de sinal, são fracamente induzidos por *C. neoformans*, especialmente por D-Cn. (B) Genes associados às vias de sinalização do inflamassoma são reprimidos por *C. neoformans*, ou fracamente induzidos, por leveduras dormentes de *C. neoformans*. (C) Os níveis intracelulares de pró-IL-1β são inalterados durante o co-cultivo com *C. neoformans* por 12 ou 24 horas, enquanto induzidos pelo estímulo exógeno com 500 ng/mL de LPS. (D) Aumento significativo dos níveis de IL-1β no sobrenadante de BMMs derivados de camundongos selvagens, mas não knockouts para Nlrp3, infectados com as formas não-dormentes, mas não D-Cn ou S-Cn inativado por calor (HK S-Cn; 70°C, 1 hora). Os macrófagos foram primados por 3 horas com LPS e então incubados com o agonista para NLRP3 e controle positivo, nigericina (nig; 20 μM, durante os 40 minutos finais do cultivo), ou com as diferentes formas do fungo por 24 horas. Os resultados são apresentados como médias ± SD de no mínimo dois experimentos independentes. \*\*\*p < 0,001, entre os grupos indicados, ou em relação ao grupo não infectado controle (Uni).

### **5.2.3. *C. neoformans* dormente assemelha-se a leveduras não dormentes no perfil de modulação de genes e marcadores associados à apresentação antigênica, embora induza maior expressão de MHC-II**

*C. neoformans* é um exímio modulador da função de células efectoras da resposta imune, ao que é atribuído principalmente à expressão de determinados fatores de virulência (CAMPUZANO & FLOYD, 2018). Nesse sentido, investigamos se a célula dormente seria capaz de conservar essa habilidade imunomodulatória sobre a função de macrófagos na apresentação de antígenos. A nível transcricional, de acordo com a análise de RNAseq do macrófago infectado, observamos a modulação de uma variedade de genes reguladores da apresentação para e ativação de linfócitos (e.g. *Cd274*, *H2-M2*, *H2-Ab1*, *Cd80*, *Icosl*) de forma semelhante entre as formas de *C. neoformans* testadas (figura 27A).

Interessantemente, o fungo dormente não só induziu *H2-Ab1* (figura 27A), gene integrante do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC-II), bem como estimulou a expressão dessa molécula na membrana celular, de acordo com citometria de fluxo (figura 27B). O mesmo resultado citométrico foi observado para a forma S-Cn inativada por calor, enquanto sua forma viável, assim como E-Cn, não alteraram a expressão da molécula – embora o tenham feito a nível transcricional. Em relação à expressão de moléculas co-estimulatórias, consistentemente com os dados do transcriptoma, nenhuma das formas do fungo alterou a expressão de CD80 a nível traducional. Já *Cd86* foi positivamente regulado por E-Cn e S-Cn, embora nenhuma forma de *C. neoformans* tenha de fato alterado a expressão de sua proteína na membrana do macrófago.

Já foi demonstrado o envolvimento da urease de *C. neoformans* no acúmulo de células dendríticas imaturas no curso da infecção pulmonar (OSTERHOLZER et al., 2009). Ademais, uma possível redução da atividade dessa enzima em células dormentes não seria incomum, uma vez que células dormentes de *C. neoformans* experimentam uma drástica diminuição metabólica global (HOMMEL et al., 2019). Assim, inoculamos as diferentes formas de *C. neoformans* em meio líquido de ureia Christensen em uma alta quantidade e um período de duas horas, de forma a suprimir o viés de um aumento da produção enzimática associado à proliferação celular – variável entre as formas testadas. Como esperado, D-Cn, assim como HK S-Cn, falhou em produzir urease nas condições testadas, visto que não detectamos o roseamento do meio verificado no cultivo com S-Cn, indício da alcalinização

do pH devido à catalização da hidrólise da ureia em amônia (figura 27C). Desse modo, nossos resultados indicam que células dormentes de *C. neoformans* assemelham-se a leveduras não dormentes no perfil de modulação de genes e marcadores associados à apresentação antigênica, embora induza maior expressão de MHC-II, possivelmente em consequência à sua reduzida atividade de urease.

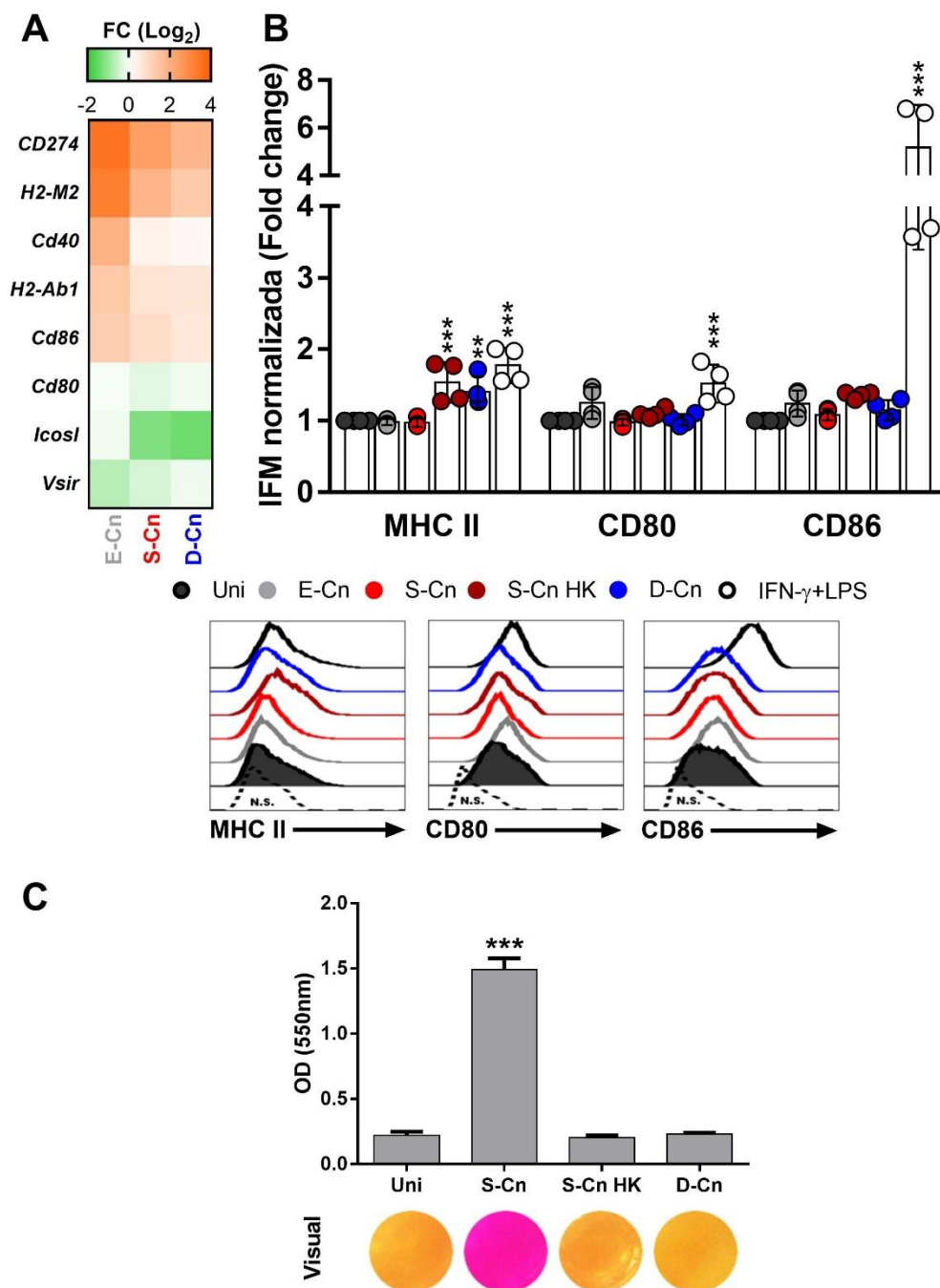


Figura 27. D-Cn modula semelhantemente genes e marcadores associados à apresentação antigênica, mas não a expressão de MHC-II na membrana. (A) O *Heatmap* mostra a manutenção, na infecção por D-Cn, do perfil modulatório de *C. neoformans* sobre a expressão de genes associados à apresentação de antígenos. (B) A análise citométrica mostra que macrófagos infectados com D-Cn por 24 horas exibem semelhante modulação de moléculas co-estimulatórias em comparação às formas não dormentes viáveis. Contudo, promovem, juntamente com S-Cn inativado por calor, um aumento da intensidade de fluorescência média (IFM) de macrófagos marcados para a expressão de MHC classe II por citometria de fluxo. (C) Diferentemente de S-Cn viável, sua forma inativada ou dormente

são incapazes de induzir alteração colorimétrica e, inferindo-se, atividade de urease, quando incubadas ( $10^8$  leveduras/mL) por 2 horas em meio Christensen líquido ( $37^\circ\text{C}$ , 100 rpm), examinado visualmente e com o auxílio de um espectrofotômetro a 550 nm. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SD de dois experimentos independentes.  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ , em relação ao grupo não infectado/inoculado controle (Uni).

#### **5.2.4. Leveduras dormentes de *C. neoformans* não induzem a produção de óxido nítrico, mas falham em sua neutralização**

A enzima óxido nítrico sintase induzível (INOS) responde à infecção por *C. neoformans* catalisando a hidrólise do aminoácido arginina em óxido nítrico (NO), capacitando assim o macrófago para conter e eliminar o fungo (WAGER et al., 2016). No nosso modelo, observamos que os genes *Slc7a1* e *Slc7a2*, principais transportadores para a aquisição de arginina pela célula (RATH et al., 2014), foram regulados positivamente por E-Cn e S-Cn, mas não por D-Cn (figura 28A e B). Além disso, verificou-se a indução simultânea, por todas as formas de *C. neoformans*, de uma via de obtenção alternativa mediante a reciclagem da citrulina, que é produzida concomitantemente ao NO pela INOS, e convertida novamente em arginina por meio das enzimas codificadas por *Ass1* e o gene constitutivo *Asl*. De acordo, E-Cn e em menor extensão S-Cn foram capazes de induzir a expressão de *iNOS* (*Nos2*), embora, interessante, D-Cn fora incapaz de promover uma indução significativa. Consistentemente, a expressão do gene codificador para arginase (*Arg1*), enzima que compete com INOS pelo uso da arginina como substrato, foi significativamente reprimida por S-Cn e D-Cn, sendo observada a mesma tendência na infecção por E-Cn.

Avaliamos também os níveis do indicador da produção de NO, nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), no sobrenadante celular após 24 horas de interação. Nenhuma infecção com *C. neoformans* resultou na produção efetiva de nitrito (figura 28C). Como é conhecida a capacidade de *C. neoformans* em detoxificar NO, avaliamos os níveis de seu indicador em culturas de macrófagos infectados co-expostos a IFN- $\gamma$  e LPS, conhecidos indutores de NO (KAWAKAMI et al., 1997). Interessantemente, enquanto S-Cn e E-Cn reduziram significativamente os níveis de nitrito induzidos por IFN- $\gamma$  e LPS, a interação com HK-Cn ou D-Cn resultou em níveis inalterados do subproduto de NO (figura 28D). Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que D-Cn não estimula a produção de óxido nítrico na

infecção de macrófagos, enquanto falha em neutralizar a molécula na interação com macrófagos classicamente ativados.

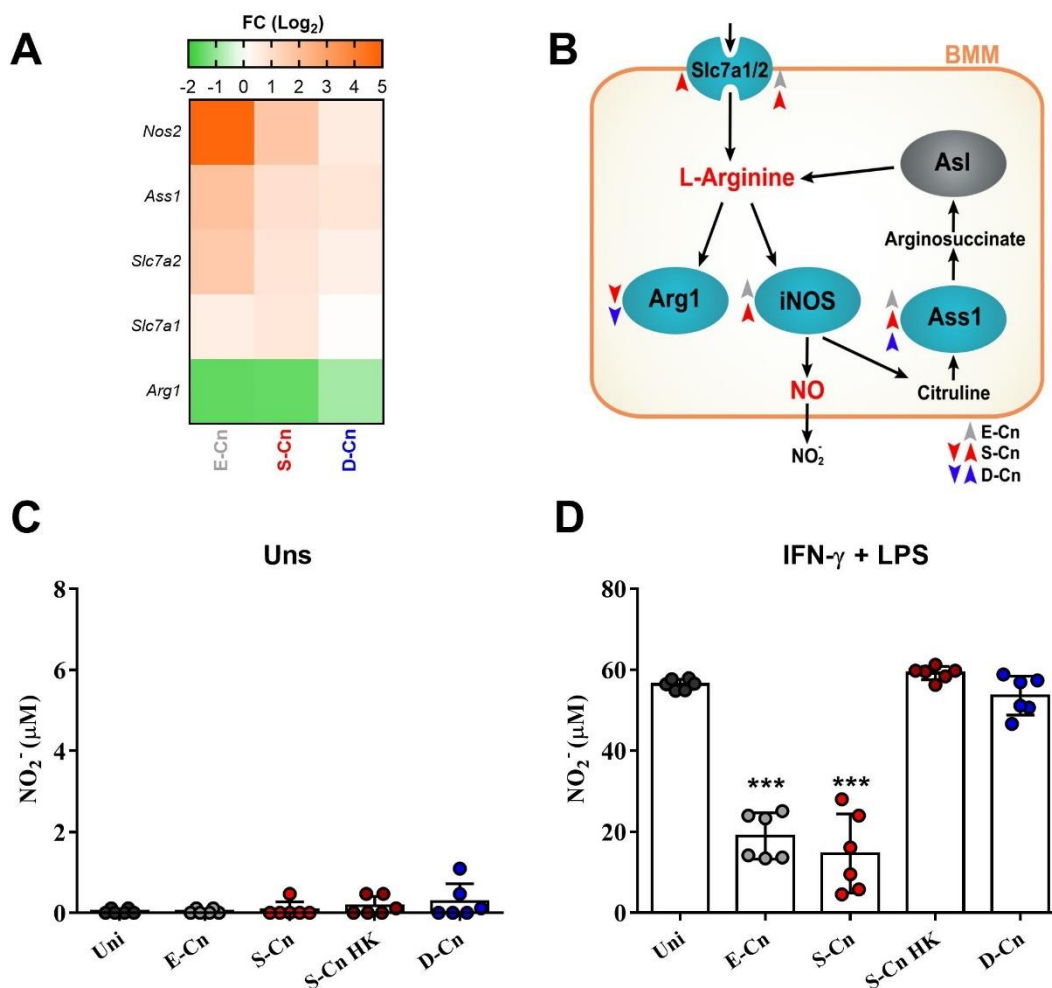


Figura 28. Leveduras dormentes de *C. neoformans* não induzem a produção de óxido nítrico, mas falham em sua neutralização. (A) O heatmap mostra a indução de vários genes relacionados à obtenção de arginina e sua metabolização via INOS durante a infecção de macrófagos por leveduras não-dormentes, mas não por D-Cn. (B) Mapa representativo das vias metabólicas da arginina, exibindo somente os genes diferencialmente expressos na infecção. As setas para cima e para baixo denotam genes positivamente ou negativamente regulados, respectivamente. Genes induzidos por D-Cn são representados por setas azuis, enquanto S-Cn e E-Cn por setas vermelhas e cinzas, respectivamente. (C) Determinação indireta da produção de óxido nítrico através da quantificação de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) do sobrenadante de macrófagos infectados por 24 horas submetido à reação de Griess. (D) Posteriormente à lavagem do fungo extracelular 2 horas após a infecção, os macrófagos foram ativados com 500 ng/mL de LPS e 500 UI de IFN-γ para a produção de óxido nítrico. Observa-se que enquanto nenhuma forma de *C. neoformans* é capaz de elevar os níveis de nitrito no sobrenadante dos macrófagos na ausência de estímulos exógenos, na presença desses, são capazes de reduzir os níveis da molécula, exceto na infecção com leveduras dormentes ou inativadas por calor. Os resultados são apresentados como médias de 3 replicatas biológicas (A), ou médias ± SD de dois experimentos independentes (C e D). \*\*\*p < 0,001, em relação ao grupo não infectado controle (Uni).

### **5.2.5. A interação com macrófagos murinos diminui a culturabilidade de leveduras intracelulares dormentes de *C. neoformans***

Por outro lado, nós também nos interessamos no comportamento das células dormentes de *C. neoformans* durante a interação com os macrófagos. Nesse sentido, nos perguntamos se o fenótipo de polarização do macrófago poderia exercer um papel na provisão de condições favoráveis ou prejudiciais à culturabilidade de células dormentes. Para adquirir diversos perfis de ativação do macrófago, nós os tratamos com citocinas indutoras para os estados de ativação M1 ou M2 (IFN- $\gamma$  e IL-4, respectivamente) (figura 23). Em adição, nós também estimulamos macrófagos concomitantemente com IFN- $\gamma$  e LPS para induzir uma robusta ativação do tipo clássica associada a uma superior atividade microbicida. O tratamento com o imunossupressor corticosteroide dexametasona foi aplicado para gerar macrófagos não ativados. Posteriormente, nós checamos marcadores-assinatura de perfis M1 e M2 para confirmar uma polarização bem-sucedida (Figura 29).

Como esperado, o estímulo com IFN- $\gamma$  levou à expressão de marcadores clássicos M1, induzindo a transcrição de iNOS e promovendo a expressão de MHC-II na membrana do macrófago (figura 29A e E, respectivamente). Por meio da estimulação concomitante com LPS, observou-se um forte incremento na expressão do gene INOS (figura 29A), e capacitação para a indução de transcritos de *Il6* e seus produtos de tradução (figura 29C e D), além de robusta e efetiva produção de NO, de acordo com a dosagem de nitrito (figura 29B). Alternativamente, observamos que o macrófago na presença de IL-4 foi fracamente capaz de induzir MHC-II e incapaz de induzir os demais marcadores M1 (figura 29A-E). Contrariamente aos estímulos IFN- $\gamma$  e/ou LPS, a citocina clássica do perfil Th2 modulou para uma razão inversa a expressão de *iNOS* e *Arg1* (figura 29A), caracterizando, portanto, um macrófago M2. O tratamento com dexametasona não induziu nenhum marcador de ativação, igualmente ao macrófago não estimulado (uns), enquanto significativamente suprimiu marcadores M1 quando coadministrado com IFN- $\gamma$  sozinho ou combinado com LPS (figuras 29A, B, D e E), comprovando sua atividade biológica.

Em seguida, conduzimos o co-cultivo desses macrófagos, previamente estimulados ou não, com D-Cn por mais 24 horas ou apenas 2 horas, como controle. Ressalta-se que os macrófagos foram re-estimulados com seus respectivos estímulos após a lavagem do fungo



extracelular (no tempo de 2 horas), de forma a garantir a manutenção do seu perfil de polarização e sobreposição da modulação elicitada pelo fungo. A internalização por macrófagos, independentemente do perfil fenotípico deste último, resultou na diminuição progressiva da culturabilidade do fungo até atingir níveis quase nulos ao final de 24 horas de cocultura, de acordo com a quantificação por UFC e pelo método de plaqueamento em meio líquido (Figura 30A e B). A reprodução desse resultado por meio de metodologias distintas para romper os macrófagos excluiu a possibilidade da solução de lise ter afetado a culturabilidade do fungo (Figura 30C). Além disso, a análise de viabilidade das leveduras recuperadas nesse ponto indica que não houve perda significativa de viabilidade fúngica no ambiente intracelular sob qualquer tratamento polarizador do macrófago (Figura 30D). Na ausência de macrófagos, porém, o fungo apresentou redução parcial da viabilidade, acompanhando e potencialmente justificando o decréscimo de culturabilidade verificado por UFC (Figura 30D e A, respectivamente). Esses resultados indicam que a internalização e permanência de D-Cn em macrófagos favorecem a manutenção e intensificação do estado de células vivas mas não cultiváveis.

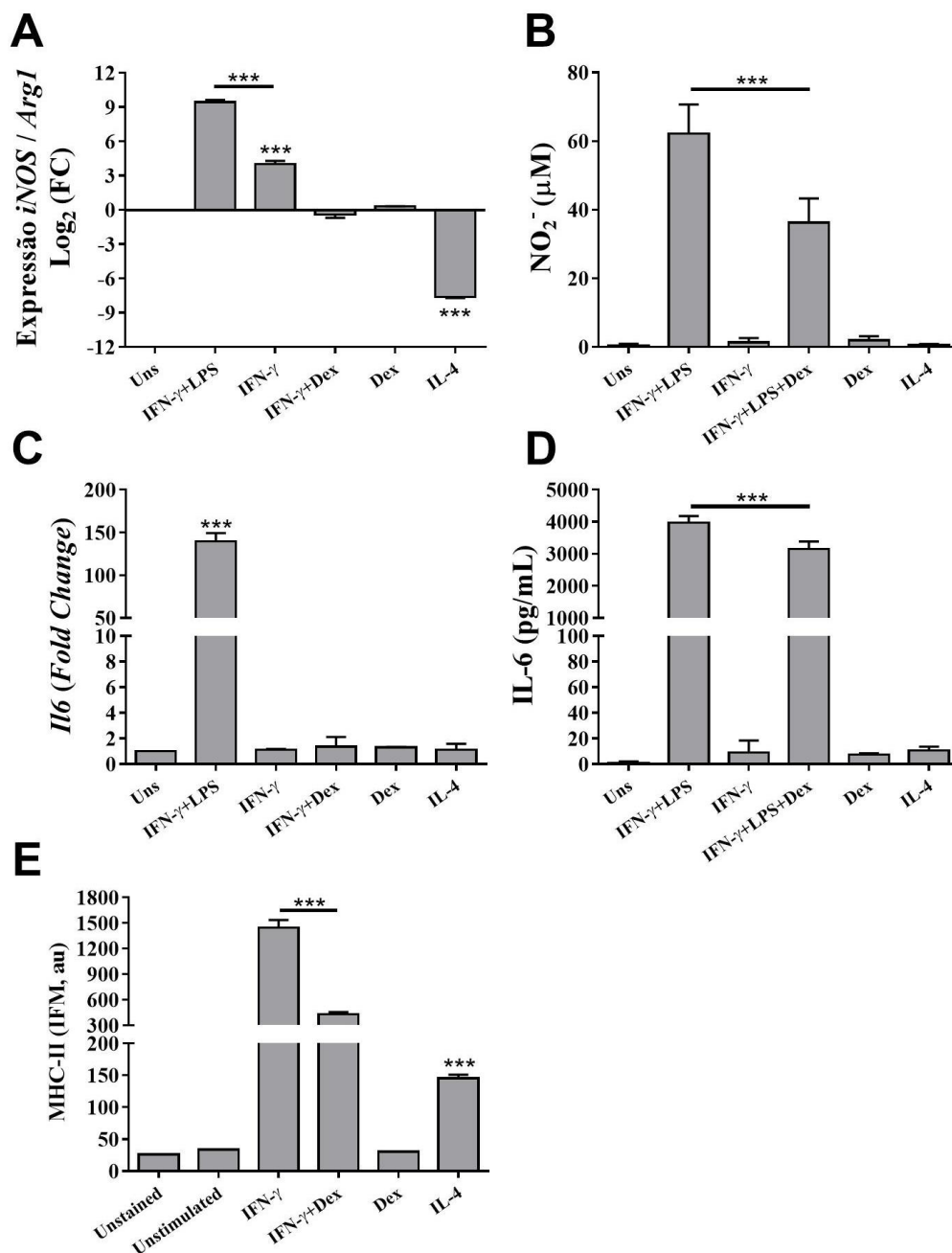


Figura 29. Análise da expressão de marcadores-assinatura de macrófagos murinos polarizados para M1 ou M2. (A-E) Macrófagos murinos (Uns) foram ativados classicamente com citocinas IFN- $\gamma$  (50 ng ou 500 U) sozinho ou concomitantemente com LPS (100 ng) para adquirir maior potencial pró-inflamatório. Para um perfil de ativação alternativa M2, utilizou-se a citocina IL-4 (20 ng/mL). Foi utilizado o tratamento com dexametasona (0,1  $\mu\text{M}$ ) sozinho para aquisição de um perfil não ativado (M0), ou na presença de indutores do perfil M1 para avaliar sua capacidade imunossupressora. A análise dos marcadores de M1 (*iNOS* e *Il6*) e M2 (*Arg1*) a nível transcricional foi conduzida por RT-qPCR. A expressão dos transcritos foi normalizada com o gene constitutivo *GAPDH* e indicada como “*Fold Change*” (C), ou utilizada para o cálculo da razão dos níveis de transcritos entre *iNOS* e *Arg1*, exibida como  $\text{Log}_2$  (FC) (A). A quantificação de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e *IL-6* do sobrenadante de cultura foi realizada por reação de Griess e ELISA, respectivamente (B, D). A análise dos níveis de expressão de MHC-II foi realizada por citometria de fluxo (E). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$

SD de uma replicata biológica representativa de no mínimo dois experimentos independentes conduzidos em triplicatas técnicas de 24 horas de cultivo sob estímulo. \*\*\* $p < 0,001$ , entre os grupos indicados, ou em relação ao grupo não estimulado controle (Uns).

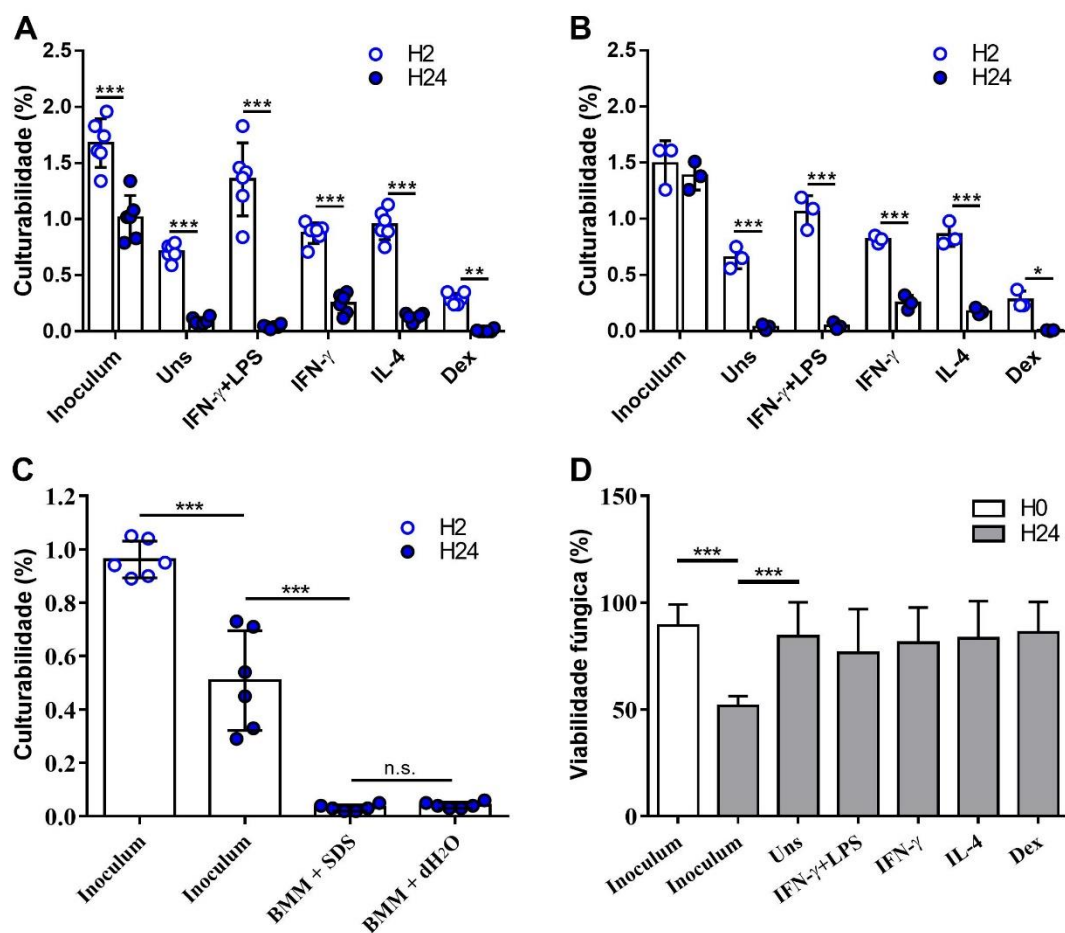


Figura 30. A interação com macrófagos decresce a culturabilidade de *C. neoformans* dormente intracelular independentemente do estado de polarização celular e sem afetar a viabilidade da levedura. Macrófagos murinos não ativados (Uns e Dex), classicamente ativados (IFN- $\gamma$  e IFN- $\gamma$ +LPS) ou alternativamente ativados (IL-4) foram co-cultivados com leveduras dormentes de *C. neoformans*. Após 2 e 24 horas de interação, as leveduras internalizadas foram liberadas com o uso de PBS a 0,05% SDS e analisadas para culturabilidade por contagem de UFC (A), método de plaqueamento em meio mínimo (B), e viabilidade por citometria de fluxo com o uso da marcação *Live/Dead* (D). (C) Para excluir um possível viés da interferência da solução de lise na culturabilidade do fungo dormente, este parâmetro foi avaliado comparando-se o uso de PBS a 0,05% de SDS e a lise obtida com água MilliQ, não tendo sido encontrada qualquer diferença. Os dados de culturabilidade foram expressados como a porcentagem relativa de colônias crescidas em meio SDA em relação ao inóculo plaqueado por amostra ( $10^4$  leveduras), ou pelo cálculo da probabilidade de crescimento de uma célula (método de plaqueamento de 100 células por poço). Cada amostra/replicata técnica foi plaqueada em duplicata para UFC (gerando 2 pontos no gráfico) e em unicata para o método de plaqueamento (1 ponto). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SD de uma replicata biológica representativa de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , entre os grupos indicados.

### **5.2.6. A interação com macrófagos murinos promove a reativação de leveduras dormentes de *C. neoformans* presumivelmente excitadas, enquanto essa reativação é frustrada por macrófagos robustamente ativados de forma clássica**

Considerando que *C. neoformans* é capaz de sofrer excitose e retornar do fagolisossomo ao ambiente extracelular, nós expandimos a análise para as leveduras recuperadas do sobrenadante de cultura após 24 horas de interação. Surpreendentemente, essas leveduras extracelulares experimentaram um aumento de culturabilidade de mais de 4 vezes em comparação às leveduras não internalizadas ainda no início (inóculo controle H2) e ao final da co-cultura (inóculo controle H24), e de forma semelhante em quase todas as condições de tratamento celular. Interessantemente, houve uma exceção: *C. neoformans* co-cultivado junto a macrófagos altamente pró-inflamatórios apresentaram uma resposta oposta, de perda de culturabilidade para níveis semelhantes à de leveduras intracelulares (Figura 31A e B).

Curiosamente, a taxa de culturabilidade e a produção de óxido nítrico apresentaram um comportamento inverso entre si, de forma que o macrófago estimulado com IFN- $\gamma$  e LPS e ímpar na capacidade de produzir óxido nítrico foi também o único hábil a frustrar a reativação do fungo, o que pode sugerir que o óxido nítrico tenha um papel na manutenção da dormência do fungo (Figura 31C).

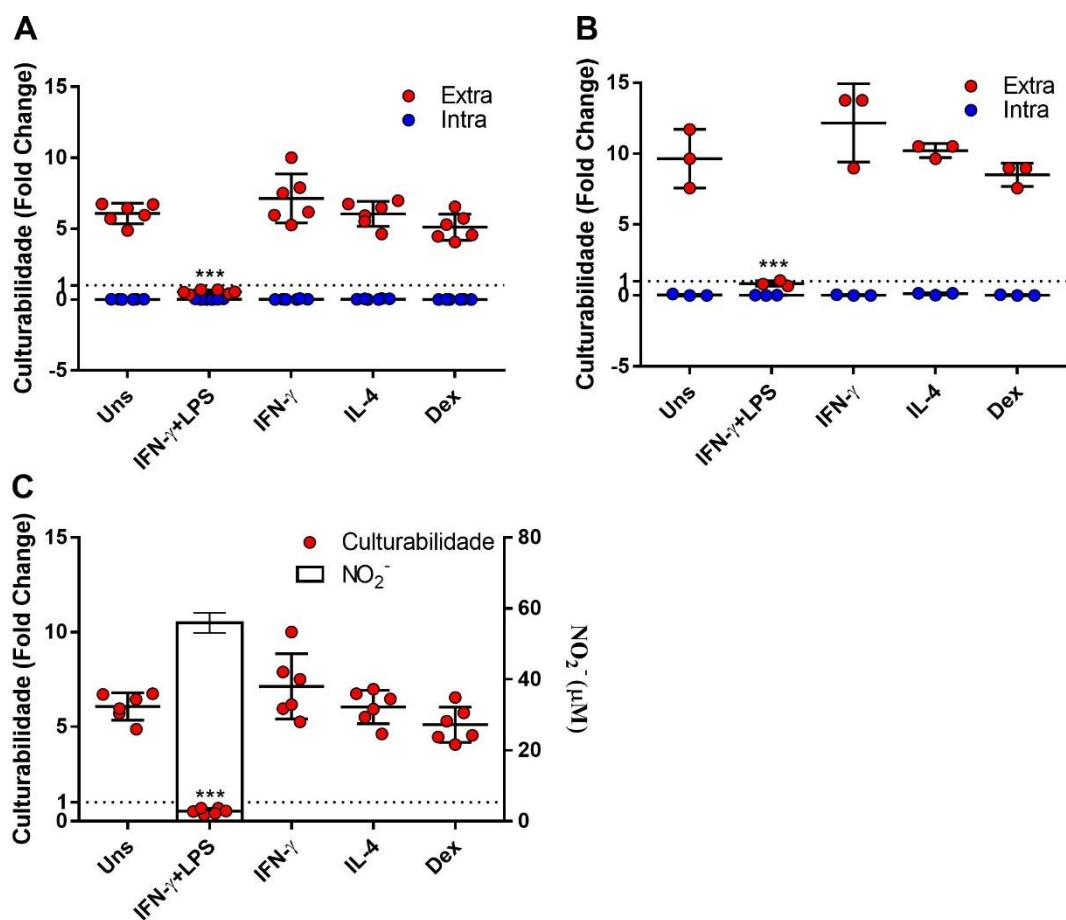


Figura 31. A interação com macrófagos resulta na reativação da população de leveduras dormentes recuperadas do sobrenadante, que é frustrada por macrófagos robustamente ativados de forma clássica. Após 24 horas de interação macrófagos-leveduras dormentes, as leveduras encontradas no sobrenadante (extracelulares ou extra), foram analisadas para culturabilidade por contagem de UFC (A) e método de plaqueamento em meio mínimo (B) da mesma forma que leveduras liberadas artificialmente dos macrófagos usando SDS (intracelulares ou intra). Os dados exibidos foram calculados com base na razão entre a culturabilidade do grupo indicado em relação à do grupo controle “inoculum H2”, demarcado pela linha pontilhada (limiar de reativação), e denotados como “*Fold Change*”. As leveduras extracelulares ultrapassaram o limiar de culturabilidade controle, sugerindo a reativação de uma parcela da população; de maneira oposta, a população de leveduras intracelulares, ou aquelas extracelulares advindas dos poços com macrófagos M1 polarizados com IFN- $\gamma$ +LPS retrogrediram, indicando o aprofundamento da dormência. (C) A sobreposição dos gráficos de culturabilidade das leveduras extracelulares e da produção de nitrito por meio do reagente de Griess mostra uma relação inversa entre a culturabilidade e a produção de elevadas quantidades de óxido nítrico. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SD de uma replicata biológica representativa de dois experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,001$ , em relação ao grupo não estimulado “Uns”.

### **5.2.7. A reativação das leveduras de *C. neoformans* na cocultura com macrófagos é influenciada pela presença de soro fetal bovino, apesar deste não ser um requisito necessário neste processo**

É sabido que o SFB, um dos constituintes do meio de experimentação usado e, portanto, em contato com as leveduras reativadas antes e após a internalização pelos macrófagos, apresenta a capacidade de reativar células dormentes em diferentes modelos, incluindo *C. neoformans* (ALANIO et al., 2015). Para avaliar o nível da influência do SFB no fenômeno de reativação observado, testamos o meio RPMI (pH 7,4) com diferentes concentrações do soro (0, 2 e a previamente utilizada, 10%), na ausência ou presença de macrófagos, além de meio mínimo (pH 5,5). Observamos que, em todas as concentrações de SFB testadas em meio RPMI, a presença concomitante de macrófagos levou a maiores valores de culturabilidade em relação às respectivas concentrações em meio livre de macrófagos (figura 32A). A concentração máxima de SFB (10%) induziu os maiores valores de culturabilidade, na ausência e, especialmente, presença de macrófagos. O meio RPMI sozinho ou sob baixa concentração de SFB (2%) foi incapaz de induzir a reativação das leveduras, enquanto a presença de macrófagos foi capaz de levar, igualmente nas duas condições, a um aumento de culturabilidade. O meio mínimo, mesmo sem soro, permitiu um dos maiores índices de culturabilidade. Consistentemente, por meio da técnica de plaqueamento de D-Cn em meio mínimo, observamos uma curva de culturabilidade dose-dependente de SFB (figura 32C).

Paralelamente, reproduzimos esses tratamentos na cocultura com um controle composto de 1% de leveduras cultiváveis e o restante de leveduras inativadas por calor (1% S-Cn + 99% S-Cn-HK), valor de culturabilidade semelhante ao obtido com o nosso protocolo de indução de células dormentes (figura 32B). Contrariamente aos resultados com D-Cn, a culturabilidade das leveduras sob tratamento com meio suplementado a 10% de SFB foi superior na ausência de macrófagos. Além disso, enquanto a culturabilidade na ausência de macrófagos acompanhava a dose de SFB empregada, não houve diferença significativa na culturabilidade, independentemente da dose ou presença de SFB, quando macrófagos estavam presentes.

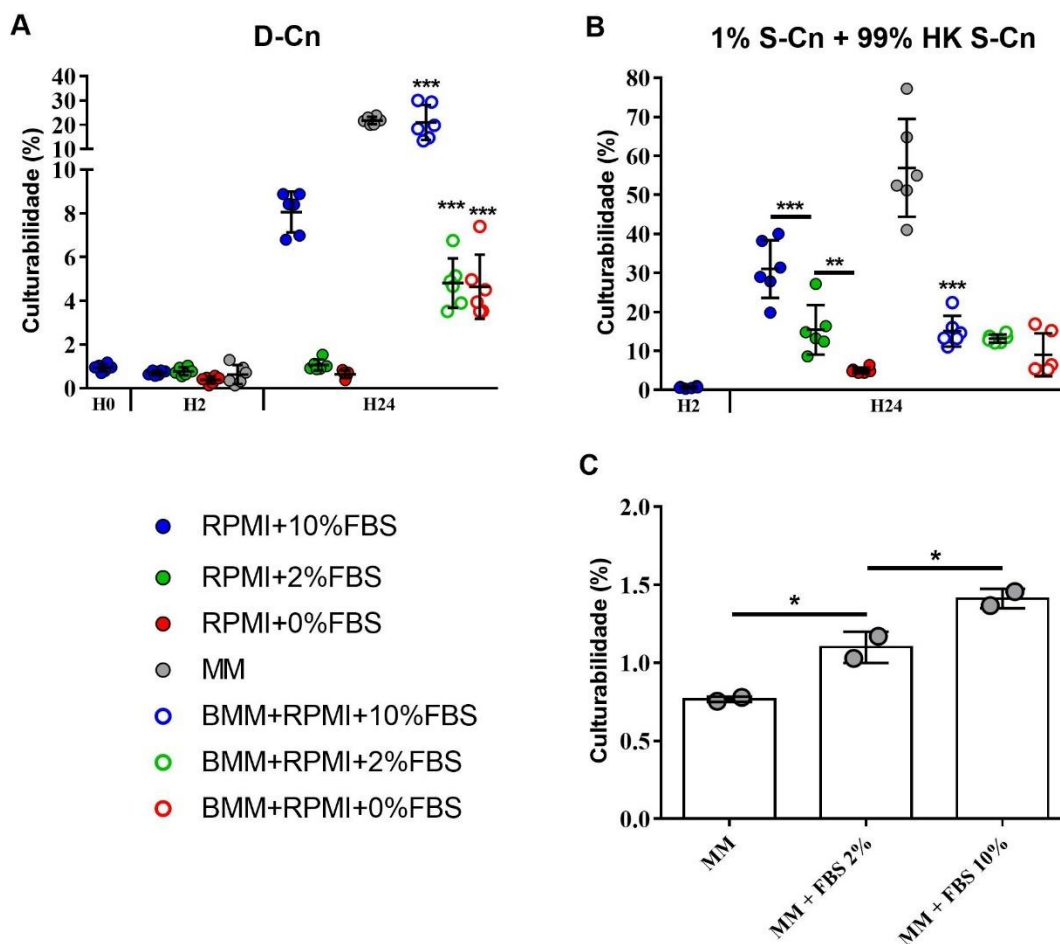


Figura 32. A reativação das leveduras de *C. neoformans* na co-cultura com macrófagos é influenciada pela, mas dispensa a presença de soro fetal bovino. (A) Leveduras dormentes foram cultivadas em meio RPMI contendo diferentes concentrações de SFB (0, 2 e 10%), na ausência (círculos preenchidos) ou presença (círculos vazios) de macrófagos, além de meio mínimo, nos tempos indicados. (B) Esse teste foi aplicado também para um inóculo constituído de 1% de leveduras na fase estacionária e 99% das leveduras desse mesmo cultivo que foram inativadas por calor (1% S-Cn + 99% S-Cn-HK). Os pontos representam a porcentagem de culturabilidade em meio SDA em relação ao inóculo. (C) Leveduras dormentes foram analisadas por meio da técnica de plaqueamento em meio mínimo, onde este foi suplementado com as concentrações de SFB mencionadas acima. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SD de uma replicata biológica representativa de dois experimentos independentes (A e B) ou de um experimento piloto (C). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , entre os grupos indicados ou em relação ao seu respectivo controle sem macrófago.

### **5.2.8. A inibição de INOS permite a reativação de leveduras dormentes frustrada por macrófagos robustamente ativados**

Observamos anteriormente neste estudo que a reativação de leveduras dormentes de *C. neoformans* durante a infecção de macrófagos é frustrada na presença de altas concentrações de óxido nítrico, concentrações estas que são atingidas somente mediante a estimulação combinada usando IFN- $\gamma$  e LPS (figura 31C). Posto isso, avaliamos se o tratamento dos macrófagos com o inibidor de INOS aminoguanidina seria capaz de reverter esse fenômeno observado. Para isso, primeiramente testamos diferentes concentrações do composto, e observamos a eliminação dos níveis de nitrito a 1 mM da droga, concentração que foi selecionada para o teste seguinte de culturabilidade (figura 33A). Interessantemente, o tratamento dos macrófagos robustamente ativados com o inibidor não só reestabeleceu a culturabilidade do fungo dormente, como surpreendentemente a levou a níveis superiores ao controle (macrófago não estimulado) (figura 33B). Interessantemente, a aminoguanidina não apresentou efeito direto na culturabilidade do fungo dormente, de acordo com o método de plaqueamento realizando-se diluição da droga no meio mínimo (figura 33C). Esses resultados indicam que a inibição de INOS permite a reconstituição da reativação de D-Cn frustrada por macrófagos robustamente ativados.



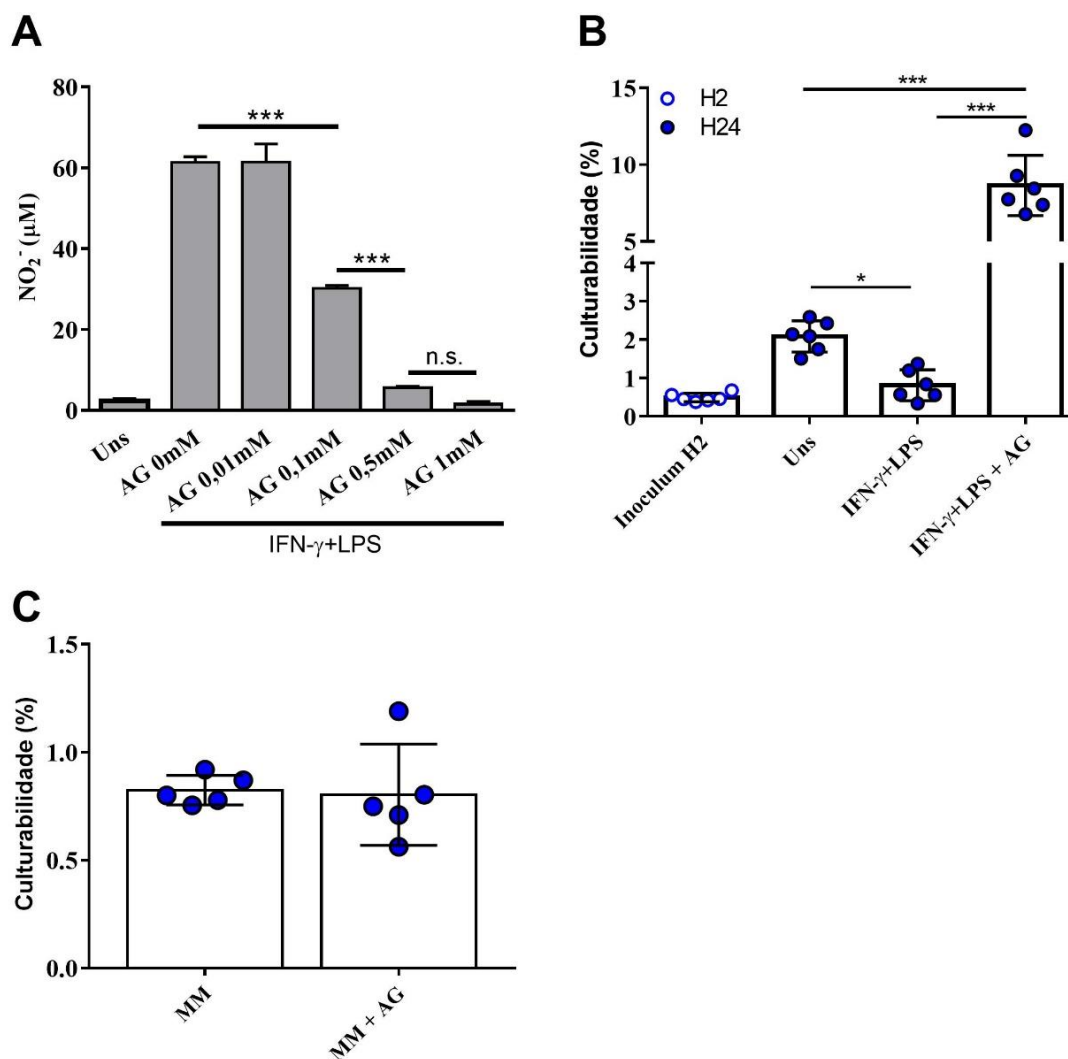


Figura 33. A inibição de iNOS permite a reconstituição da culturabilidade de D-Cn frustrada por macrófagos robustamente ativado. (A) Determinação da produção de nitrito pelo reagente de Griess com o sobrenadante de macrófagos tratados concomitantemente com IFN- $\gamma$ +LPS e diferentes concentrações (0,01 a 1mM) de cloridrato de aminoguanidina (AG), um inibidor de iNOS. Esse inibidor mostrou um efeito inibitório dose-dependente sobre a produção de nitrito. (B) Culturabilidade (UFC) de leveduras extracelulares obtidas do cultivo de leveduras dormentes com macrófagos não estimulados (Uns) ou estimulados com IFN- $\gamma$ +LPS na presença ou ausência de aminoguanidina a 1 mM. A reativação atingida na interação com macrófagos é perdida após a robusta ativação da produção de óxido nítrico, e reconstituída (e ultrapassada) pela inibição de iNOS com aminoguanidina. (C) Teste da exposição de aminoguanidina a 1 mM a leveduras dormentes pelo método de plaqueamento mostrou que não há efeito direto do inibidor sobre a culturabilidade do fungo. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  SD de uma replicata biológica representativa de dois experimentos independentes (A e B), ou médias de dois experimentos independentes (C). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , entre os grupos indicados.

### 5.3. DISCUSSÃO

Demonstramos aqui a modulação de uma resposta macrofágica peculiar durante a interação com leveduras dormentes de *C. neoformans*, permissiva à persistência intracelular do fungo e influenciada pelo microambiente de estímulos anti ou pró-inflamatórios. Sugerimos que os macrófagos, a dependerem do perfil de ativação adquirido frente a esses estímulos, M2 ou M1, possuem um papel determinante na reativação ou manutenção da infecção latente de *C. neoformans*, respectivamente.

Uma característica marcante da criptococose é a infecção latente, na qual se acredita que os macrófagos desempenhem um papel central (DROMER et al., 2011). Estudos em diferentes modelos animais indicam que macrófagos alveolares representam um sítio de persistência de *C. neoformans* no granuloma do hospedeiro (FELDMESSER et al., 2000; GOLDMAN et al., 2000; LINDELL et al., 2006), a partir do qual a infecção latente é reativada, dando lugar ao estabelecimento de uma infecção ativa e disseminada (GOLDMAN et al., 2000). Além disso, a infecção crônica é acompanhada de uma diminuída expressão de INOS nos granulomas de ratos (GOLDMAN et al., 2000). Nesse contexto, nós hipotetizamos que macrófagos, na interação com leveduras dormentes, apresentariam um fenótipo mais permissivo à persistência do fungo.

Recentemente, foi descrita a geração *in vitro* de leveduras dormentes de *C. neoformans*, pavimentando estudos de sua interação com células do hospedeiro (HOMMEL et al., 2019). A fim de testar nossa hipótese, implementamos o uso dessas leveduras na interação com BMMs e analisamos o fenótipo desta última na interação com leveduras em diferentes estados metabólicos. A análise global da resposta transcricional do macrófago infectado com leveduras dormentes nos permitiu observar uma específica e reduzida modulação, em relação à infecção com leveduras não dormentes, de genes e vias relacionados à ativação da resposta imune.

Muito embora, o fungo reteve a capacidade de regular genes e vias de sinalização importantes para a resistência do hospedeiro, incluindo PRRs, moléculas associadas à apresentação antigênica, mecanismos microbicidas oxidativos e nitrosativos, e via do inflamassoma. Posteriormente, validamos por outros ensaios, a nível proteico, a capacidade do fungo dormente em manipular processos críticos como a apresentação antigênica,

produção de compostos microbicidas nitrosativos e a ativação do inflamassoma. Esses resultados são discutidos em detalhes a seguir.

Macrófagos possuem a habilidade de apresentação antigênica a células T. Estas, por sua vez, quando ativadas, os habilitam a controlar a infecção por *C. neoformans* (WAGER et al., 2015). Em contrapartida, o fungo é capaz de modular o funcionamento de APCs, especialmente macrófagos, favorecendo sua persistência intracelular (MONARI et al., 2005; SIEGEMUND & ALBER, 2008). Observamos que nenhuma das formas de *C. neoformans*, incluindo D-Cn, estimulou a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície do macrófago, embora D-Cn tenha induzido marginalmente a expressão de MHC-II. Curiosamente, resultados semelhantes já foram observados em modelo de dormência de *Staphylococcus. epidermidis* e *M. tuberculosis* (MARIOTTI et al., 2013; CERCA et al., 2014). Uma das estratégias dessa última frustrar a apresentação antigênica é inibindo a maturação e acidificação do fagolisossomo, habilidade que é perdida em *M. tuberculosis* dormente (MARIOTTI et al., 2013). Embora esse estudo não tenha investigado o que levou o fenótipo dormente a perder a capacidade de manipular o fagolisossomo, é sabido que a urease produzida por *M. tuberculosis* tem um efeito alcalinizante sobre este (LIN et al., 2012). Em *Mycobacterium bovis*, já foi estabelecida uma associação entre a habilidade dessa bactéria expressar urease e sua capacidade de interferência na maturação, acidificação fagolisossomal e potencial de apresentação antigênica por macrófagos (MUKAI et al., 2008). Recentemente, foi demonstrado que a urease produzida por *C. neoformans* também permite um aumento significativo do pH fagolisossomal do macrófago (FU et al., 2018), o que poderia a princípio interferir na expressão de MHC-II. Isso poderia explicar por que o fungo dormente permitiu o aumento dessa molécula, uma vez que não fomos capazes de detectar atividade de urease nessas leveduras. Ensaio adicionais com o uso de uma linhagem de *C. neoformans* deficiente para essa enzima seriam úteis para confirmar nossa hipótese.

Uma outra possibilidade é que a infecção latente poderia estar associada a um quadro de imunotolerância induzida. De fato, a expressão de MHC-II na ausência de moléculas co-estimulatórias está associada à indução de células T anérgicas (VALDOR et al., 2013). Em consonância, observamos que o fungo dormente, assim como os demais testados, foram capazes de induzir *Cd274*, gene codificador de PD-L1, cuja ligação a seu receptor na superfície de linfócitos T também leva à anergia linfocitária (VALDOR et al., 2013). Estudos

recentes demonstraram um papel da sinalização PD-1/PD-L1 em promover a persistência da infecção criptocócica em camundongos (ROUSSEY et al., 2017; CHE et al., 2018).

O tipo de metabolismo de arginina adotado pelo macrófago é crítico para o direcionamento dos seus fenótipos de ativação M1/M2 e sua capacidade microbicida (RATH et al., 2014). Diferentemente de infecções com leveduras não dormentes (DAVIS et al., 2013), D-Cn foi incapaz de induzir a expressão de iNOS e genes relacionados à captação de seu substrato, frustrando assim a via de produção do óxido nítrico. Em contrapartida, verificamos uma perda completa da habilidade em neutralizar o óxido nítrico induzido experimentalmente, capacidade normalmente associada à atividade de enzimas produzidas pelo fungo, como flavohemoglobina denitrosilase e várias outras (DE JESÚS-BERRÍOS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2015). Entretanto, esse resultado não exclui a participação de outros mecanismos de resistência ou mesmo tolerância ao estresse nitrosativo em *C. neoformans*, especialmente considerando a vulnerabilidade do fungo a eles (DE JESÚS-BERRÍOS et al., 2003; MISSAL et al., 2004; WAGER et al., 2015). De fato, não detectamos redução na viabilidade da levedura dormente frente ao desafio com macrófagos produtores de robustas quantidades dessa molécula microbicida, evidenciando a capacidade de resistência e/ou tolerância dessa célula frente à resposta imune.

Outro mecanismo microbicida importante na resposta anti-criptocócica é a produção de ROS (SHAO et al., 2005). Constatamos uma capacidade do fungo dormente em regular, no macrófago, a expressão de mecanismos oxidativos por meio da indução de uma série de enzimas de função antioxidante. Juntamente com outras formas do fungo, D-Cn induziu a expressão dos genes *Hmox*, *Cat* e *Sod2*, sendo os últimos dois considerados antioxidantes-chave de primeira linha (IGHODARO & AKINLOVE, 2018). Além disso, foi a única forma que não reprimiu *Gpx1*, outro integrante desse grupo, mas sim *Nox1*, de função oposta (XU et al., 2016). Assim como em mamíferos, a defesa antioxidante produzida pelo fungo também é realizada por meio da produção de enzimas como catalase e superóxido dismutase, além do sequestrador de radicais hidroxila, manitol (CHATUVERDI et al., 1996; COX et al., 2003). Além disso, a cápsula, estrutura mantida no fungo dormente, também possui propriedades antioxidantes (ZARAGOZA et al., 2008), o que poderia compensar uma provável perda de tais defesas com a redução global do metabolismo do fungo dormente (HOMMEL et al., 2019). Inclusive, dados prévios do nosso grupo, obtidos com o uso da sonda para detecção

de estresse oxidativo CellROX, combinada a citometria de fluxo, mostram uma ligeira capacidade de *C. neoformans* inativado por calor em inibir a produção de ROS (BASSO et al., 2019). A aplicação dessa técnica já está prevista a fim de confirmarmos o potencial do fungo dormente em modular a resposta oxidativa dos macrófagos.

O inflamassoma é um importante componente da resposta imune frente a uma diversidade de patógenos, incluindo fungos como *C. neoformans* (TAVARES et al., 2015). Estratégias de evasão à sua ativação são, portanto, desejáveis do ponto de vista do patógeno. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que *C. neoformans* é capaz de secretar pequenas moléculas capazes de inibir o inflamassoma NLRP3 em macrófagos (BÜRCEL et al., 2019). Não obstante, a cápsula polissacarídica é considerada o principal fator inibitório da ativação do inflamassoma NLRP3 pelo fungo, uma vez que obstrui o efetivo reconhecimento da parede celular por PRRs que sinalizam para a ativação do primeiro sinal do inflamassoma (VECCHIARELLI et al., 1995; GUO et al., 2014). Nossos resultados corroboram essa alta capacidade de *C. neoformans* em frustrar o *priming* em macrófagos, como também ajudam a elucidar os mecanismos moleculares subjacentes a ela (GUO et al., 2014). Observamos que todas as formas de *C. neoformans* reprimiram os genes *Nlrp3* e *Il1b*, cujos produtos proteicos, mais especificamente deste último, resumem a função da primeira etapa de ativação do inflamassoma, restringindo assim a sua etapa subsequente na inexistência de um estímulo adicional. Consistentemente, observamos que o fungo induz uma fraca modulação de genes codificadores de PRRs e transdutores de sinal, situados cascata acima da transcrição de *Nlrp3* e *Il1b*. O fungo dormente não só conservou esse perfil de modulação, como diferentemente dos inóculos não dormentes foi incapaz de induzir genes de CLRs como *Cd205* (homólogo ao gene receptor de manose), *Clec4d* e *Clec6a*, além daqueles envolvidos na transdução de sinais dessa família, como *Syk*, *Malt1* e *Raf1*.

Além disso, D-Cn foi a única forma do fungo que não induziu o gene *Il1a*, codificador da citocina IL-1 $\alpha$ . Essa citocina é co-secretada com IL-1 $\beta$  *in vivo* no desafio por *C. neoformans* (MAFFEI et al., 2004; WORMLEY et al., 2007; WANG et al., 2011) ou outros agentes ativadores do inflamassoma, porém independe – embora sofra influência – do processamento por esse complexo para sua secreção ou atividade biológica (GROSS et al., 2012). Ademais, apresenta efeito sobre a produção de IL-1 $\beta$  e vice-versa sendo que (HORAI et al., 1998), assim como esta, se liga a e sinaliza via IL-1RI, exercendo a princípio suas

mesmas funções biológicas (MOSLEY et al., 1987). Um estudo recente com animais deficientes de IL-1RI demonstrou a importância desse receptor na infecção por *C. neoformans* (SHOURIAN et al., 2018). Estudos adicionais que clarifiquem a importância relativa de cada uma dessas citocinas no contexto da infecção criptocócica podem contribuir para que compreendamos a relevância biológica do fungo dormente perder a capacidade de induzir IL-1 $\alpha$ . A confirmação da produção e secreção de IL-1 $\alpha$  também se faz necessária e já está prevista.

O inflamassoma NLRP3 é capaz de detectar uma miríade de sinais indicativos de dano ao hospedeiro, como o estresse metabólico e dano celular, frequentemente associados à infecção. Esses sinais convergem para a sua ativação por mecanismos que incluem essencialmente o efluxo de potássio, produção de ROS e liberação de catepsina B derivada de dano fagolisossomal, resultando na maturação e secreção de IL-1 $\beta$  (LEEMANS et al., 2011). Embora não tenhamos demonstrado aqui o porquê de *C. neoformans* dormente não ser capaz de ativar esse inflamassoma, sabe-se que *C. neoformans* o faz por meio de todos os mecanismos mencionados acima (LEI et al., 2013; GUO et al., 2014; CHEN et al., 2015), presumivelmente não acionados pelo fungo dormente.

O fato da inativação de *C. neoformans* não dormente resultar na redução de sua capacidade de induzir a secreção de IL-1 $\beta$ , consistentemente com outros estudos (GUO et al., 2014; CHEN et al., 2015), para níveis semelhantes aos induzidos por D-Cn, pode sugerir que o último é incapaz de ativar o inflamassoma como reflexo de seu metabolismo reduzido e estado não proliferativo, que atenuam sua habilidade de causar dano. Além disso, a incapacidade do fungo dormente em frustrar não só a primeira, como as duas etapas necessárias à ativação do inflamassoma ganha ainda mais relevância ao considerarmos que essas células residem no hospedeiro em granulomas, sítios sujeitos à hipóxia (DUBOIS et al., 2016; QUALLS et al., 2016; SERSHEN et al., 2016). Esta condição é capaz de potencializar tanto o *priming* quanto a ativação do inflamassoma NLRP3 (PANCHANATHAN et al., 2016; SNODGRASS et al., 2016; GUPTA et al., 2017; DOKTOR et al., 2018) e, portanto, possivelmente também a capacidade de eliminação dessas leveduras pelo hospedeiro.

Resultados similares aos nossos foram observados em outros modelos. Bactérias dormentes de *M. tuberculosis* apresentaram reduzida capacidade de induzir a secreção de IL-

I $\beta$  em macrófagos diferenciados da linhagem de monócitos humana THP-1 ou de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) (IONA et al., 2012; MARIOTTI et al., 2013). Em adição, BMMs murinos cocultivados com biofilmes contendo grande proporção de células VBNC da bactéria oportunista *Staphylococcus epidermidis* apresentaram a secreção de níveis inferiores da citocina comparativamente a quando inoculados com biofilmes com menor proporção dessas células (CERCA et al., 2011). Em fungos, esporos de *A. fumigatus*, demonstrados um fenótipo de dormência (LELEU et al., 2013), falham na ativação do inflamassoma NLRP3 em monócitos THP-1, diferentemente de fragmentos de hifa (SAÏD-SADIER et al., 2010). Tomados em conjunto com os nossos dados, sugerimos que o fenótipo de dormência em bactérias e fungos está associado a uma baixa capacidade de ativação do inflamassoma em macrófagos e, portanto, pode representar uma estratégia conservada de evasão da resposta imune em infecções latentes.

Segundo uma teoria elaborada por Pirofski e Casadevall (2017), a patologia da criptococose pode ser causada por ambas as partes da interação *C. neoformans*-hospedeiro. É sabido que a infecção ativa por *C. neoformans* e a produção de seus fatores de virulência está associada a danos ao hospedeiro em vários níveis (CASADEVALL et al., 2018). Parte dos danos, porém, são oriundos da própria resposta do hospedeiro na tentativa de combater a infecção, reduzindo a carga fúngica em detrimento da sua homeostasia (CASADEVALL & PIROFSKI, 2003; PIROFSKI & CASADEVALL, 2017). Nossos achados ganham ainda mais significado quando considerados nesse contexto. Observamos a nível transcricional que há uma grande disparidade entre a capacidade das formas do fungo em estados metabólicos opostos modularem o macrófago: enquanto leveduras na fase de crescimento exponencial estimulam fortemente um perfil pró-inflamatório no macrófago, células dormentes são fracamente capazes de modular para esse perfil, encontrando-se leveduras na fase estacionária nesse intermédio. O fato de *C. neoformans* dormente, no ambiente intracelular, apresentar a habilidade de induzir minimamente ou até suprimir genes da resposta imune no macrófago, bem como capacidade reduzida de infligir dano a ele, mostra-se como uma estratégia desse fenótipo que evita a ativação de mecanismos de resistência do hospedeiro. Em consequência, como estes mecanismos são muitas vezes deletérios ao próprio hospedeiro, este mantém a integridade e homeostasia do órgão colonizado. Dessa forma, a indução do fenótipo dormente da levedura, em meio intracelular, representaria vantagens aos

dois organismos, ao conciliar a persistência da infecção em um estado latente com um estado de homeostasia do hospedeiro, podendo explicar, inclusive, porque a infecção latente é o desfecho mais comum da primo-infecção (COELHO et al., 2014).

A subversão da resposta imune do hospedeiro na infecção por *C. neoformans* depende da expressão de um coquetel de enzimas pelo último (ALMEIDA et al., 2015). Hommel e colaboradores (2019) observaram uma queda significativa nos processos transcricionais e metabólicos de leveduras dormentes, o que pode sugerir que muitas dessas enzimas associadas à sua virulência tiveram a sua expressão reduzida, como constatamos para a urease. Assim, especulamos que a preservação da estrutura capsular na levedura dormente pode ter sido, neste trabalho, o seu principal fator responsável pela modulação do macrófago para um perfil permissível à sua persistência e sobrevivência, alimentando o consenso de que a estrutura representa o fator de virulência dominante em *C. neoformans* (CASADEVALL et al., 2018). Com isso, colocamos em xeque a capacidade do esporo de *C. neoformans*, outro fenótipo de dormência, entretanto desprovido de cápsula, ser o morfotipo diretamente responsável pela infecção latente. De fato, esses esporos são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo e nitrosativo a que são sujeitas no interior de macrófagos (GILES et al., 2009). Isso é suportado pelo fato de inexistirem na literatura relatos da presença de esporos de *C. neoformans* em cortes histológicos ou outras amostras. Isso não exclui, entretanto, a vinculação dos esporos com a primo-infecção do hospedeiro, no qual essas células apresentam alta capacidade de penetração tecidual e prontamente germinam formando leveduras no interior dos macrófagos (GILES et al., 2009; WALSH et al., 2019), processo que poderia inclusive representar um passo anterior à entrada na dormência já na forma leveduriforme.

Macrófagos são essenciais na resposta imune frente à infecção criptocócica, embora exerçam papéis paradoxais. A capacidade de exercerem papéis positivos ou negativos reside na sua permissividade à regulação pelo patógeno e no seu contexto de ativação pela imunidade adaptativa. Nesse sentido, tanto a integridade da imunidade mediada por células quanto o seu tipo, se Th1 ou Th2, são consideradas críticas para o estabelecimento e reativação da infecção latente, bem como para o prognóstico da criptococose (MCQUISTON & WILLIAMSON, 2012). Inicialmente, hipotizávamos que o tratamento dos macrófagos para o perfil alternativo ou mesmo um estado não ativado, com o uso do corticoide



dexametasona, condições supostamente associadas à reativação da doença, pudessem levar à reativação do fungo dormente. Para a nossa surpresa, observamos uma progressiva perda de culturabilidade combinada à manutenção da viabilidade da levedura, independentemente do perfil fenotípico do macrófago infectado. Consistentemente, Hommel e colaboradores (2019) não observaram a reativação, ou qualquer alteração na culturabilidade dessas leveduras na interação por 2 horas com macrófagos de linhagem J774. A breve duração do cocultivo utilizado nesse trabalho pode explicar por que não detectaram diminuição na culturabilidade, uma vez que, como demonstramos, ocorre de forma tempo-dependente. Além disso, fizeram o uso de leveduras dormentes após 8 dias de indução, o que está associado a uma maior pureza da população de leveduras VBNC e, portanto, um inóculo com estado mais profundo de dormência e possivelmente menos propenso à reativação.

Adotamos aqui um período inferior de incubação, de 7 dias, porque acreditamos que nesse tempo as leveduras apresentariam um menor engajamento no processo de dormência, maior capacidade de reativação e superior viabilidade. Além disso, uma vantagem do uso desse inóculo constituído de maior quantidade residual de células cultiváveis foi nos permitir a avaliação tanto da reativação quanto o aprofundamento da dormência. Embora não tenhamos a certeza se essa população cultivável (cerca de 1%) seja composta por células persistentes e/ou células ativas, que não ingressaram em nenhum dos fenótipos de dormência, nossos resultados poderiam ser interpretados, no primeiro caso, à luz da hipótese da dormência contínua: sob condições de estresse prolongado, células persistentes poderiam gradualmente atingir um estado mais profundo de dormência e tornarem-se células VBNC, perdendo assim a capacidade de crescimento, como foi observado. Uma possível explicação para o fenômeno observado é que o ambiente fagolisossomal do macrófago recapitula condições indutoras de dormência, como baixo pH e limitação da disponibilidade de oxigênio e nutrientes (GLOCKNER et al., 1989; JAMES et al., 1995; URIBE-QUEROL et al., 2017). Nossos resultados corroboram o estudo realizado por Alanio e colaboradores (2015) que, ao infectarem macrófagos J774 com leveduras metabolicamente ativas de *C. neoformans*, identificaram a indução crescente de uma subpopulação do fungo que atendia aos critérios de dormência.

Seguindo a hipótese de que os macrófagos são a residência intracelular de persistência e da infecção latente, é razoável estipular que também sejam o local a partir do qual *C.*

*neoformans* abandona a dormência. Para retomar a infecção e se disseminar no hospedeiro, é imperativo que as leveduras sejam capazes de desertar o macrófago em algum momento. *C. neoformans* usufrui de diferentes estratégias para tal, como a exocitose lítica e não lítica. Nessa linha de raciocínio, hipotetizamos que as leveduras que abandonassem o macrófago fossem células reativadas. De fato, a exocitose depende até certa extensão de um estado metabolicamente ativo da levedura (ALVAREZ et al., 2006; NICOLA et al., 2011). Dessa forma, avaliamos a culturabilidade de leveduras encontradas fora dos macrófagos após a interação, presumidamente exocitadas, uma vez que raríssimas células foram observadas após sucessivas lavagens da monocamada de macrófagos (dado não mostrado).

Interessantemente, observamos na população de leveduras extracelulares uma taxa de culturabilidade no mínimo 4 vezes superior ao controle na maioria das condições testadas. Foi, ainda, duas vezes maior ao relatado por Hommel e colaboradores (2019) ao utilizarem PA. Mesmo que nesse estudo o PA não tenha incrementado fortemente a baixa culturabilidade das células dormentes, serviu como prova de conceito da capacidade de reativação dessas células induzidas *in vitro*. Da mesma forma, embora a quadruplicação da culturabilidade verificada na interação com macrófagos signifique que apenas uma pequena parcela da população tenha sido capaz de reativar, é a prova da capacidade do macrófago em permitir e facilitar a reativação dessas células. O papel do macrófago e outras células de mamíferos na reativação de células VBNC já foi demonstrado anteriormente para *Vibrio cholerae* e *Legionella sp.* (SENOH et al., 2010; DIETERSDORFER et al., 2018), dando suporte aos nossos resultados. Ademais, o nosso estudo é pioneiro em modelos de infecções latentes causadas por fungos, abrindo a possibilidade para a ocorrência desse fenômeno em infecções latentes causadas por outras espécies como *H. capsulatum* (BRUNET et al., 2018)

Hommel e colaboradores (2019) sugeriram que múltiplos fatores, ainda desconhecidos, sejam necessários à ativação das leveduras dormentes de *C. neoformans*. Além disso, especularam que as leveduras dormentes obtidas através do protocolo que descreveram (adotado aqui) possam estar muito comprometidas com o processo de dormência e danificadas em uma certa extensão – embora viáveis –, tornando-se incapazes de proliferar (BLACKBURN & MCCARTHY, 2000; PINTO et al., 2013). Outra possibilidade, não associada a uma limitação do modelo, é a de que a reativação seja um fenômeno estocástico. Segundo essa teoria, alguns indivíduos da população de células

dormentes, denominados vigilantes (do inglês “*scouts*”), reativariam de forma aleatória, permitindo-os sondar o ambiente. No caso de encontrarem situações adversas, seriam eliminados. Alternativamente, ao reconhecerem ambientes favoráveis ao crescimento, alertariam as demais células para reativarem (EPSTEIN et al., 2009; BUERGER et al., 2012). Não rejeitamos, contudo, a possibilidade da coexistência de ambos fenômenos, estocástico e induzido, no nosso modelo.

Nesse contexto, um próximo passo importante é determinarmos qual o fator do macrófago (ou fatores) foi o gatilho para a reativação verificada no nosso estudo. O fato intrigante de as leveduras extracelulares e intracelulares terem passado praticamente pelo mesmo estresse da internalização, embora diferentes em duração, mas apresentando resultados opostos de culturabilidade, torna essa tarefa ainda mais complexa. Uma hipótese é a de que a ativação tenha ocorrido não devido à passagem nos macrófagos, mas à exposição da célula a fatores secretados por eles no sobrenadante de cultura. Hommel e colaboradores (2019) testaram o lisado de células J774 na reativação dessas células e obtiveram o mesmo sucesso que fazendo o uso do PA – o que é esperado, uma vez que o extrato celular também é composto por essa vitamina –, desencorajando essa hipótese. Ensaios de interação na presença de inibidores de fagocitose, na ausência de opsoninas, com o isolamento físico entre macrófagos e leveduras (ensaios *transwell*), ou simplesmente a cultura na presença do sobrenadante filtrado de macrófagos poderão ser úteis nesse sentido.

Certamente, a hipótese mais atraente é a de que, assumindo que as leveduras sofreram exocitose não lítica, este próprio processo esteja envolvido na sua reativação. Embora a exocitose não lítica seja um evento de baixa frequência *in vitro*, em torno de 10%, já foi demonstrado que, *in vivo*, pode atingir até incríveis 44% (NICOLA et al., 2011), tornando a hipótese ainda mais factível e relevante no contexto da doença. Ainda, o fato de parte da população intracelular de *C. neoformans* não experimentar a exocitose pode representar uma estratégia da infecção latente em preservar um banco reservatório de leveduras. Deste modo, caso a parcela de células excitadas encontre resistência do hospedeiro e seja eliminada, uma subpopulação intracelular remanescente manteria a infecção para tentativas subsequentes.

Essa hipótese vai, em certo grau, de encontro ao resultado de Voelz e colaboradores (2009) de que macrófagos M2 exibem menos eventos de exocitose em comparação a macrófagos M1. Entretanto, deve se considerar que a dinâmica de exocitose de células

dormentes pode ser diferente das células metabolicamente ativas e proliferantes utilizadas no estudo citado. Além disso, ensaios adicionais para a confirmação que as leveduras extracelulares são de fato resultado de exocitose são indispensáveis para vincular os processos de exocitose e reativação do fungo. Um grande obstáculo, porém, é a falta de refringência celular que leveduras dormentes apresentam. Isso nos impediu a identificação dessas leveduras no interior do macrófago e o monitoramento de processos de exocitose por lapso de tempo apenas baseado em microscopia de campo claro ou contraste de fase.

O desenvolvimento de linhagens fluorescentes de *C. neoformans* capazes de adquirir o fenótipo de dormência, realizado pelo nosso grupo, pode ser uma ferramenta importante nesse sentido. Neste trabalho, tentamos implementar a microscopia de fluorescência para a análise de exocitose dessas células dormentes, porém, observamos que os macrófagos interceptados pelo foco de luz por longos períodos apresentaram sintomas de fototoxicidade severa, comprometendo os resultados. A transposição desse entrave técnico será fundamental para confirmarmos o vínculo entre a exocitose celular e a reativação da infecção latente.

Por último, fomos capazes de demonstrar que a reativação pode ser frustrada por macrófagos modulados para um perfil que normalmente exibe capacidade microbicida, corroborando o papel desses macrófagos no controle da infecção criptocócica (DAVIS et al., 2013; WAGER et al., 2018). Curiosamente, macrófagos M1 obtidos apenas com o tratamento com IFN- $\gamma$ , mas não LPS, exibiram o mesmo comportamento de macrófagos M2 ou não ativados. Acreditamos que esses macrófagos não tenham adquirido o máximo potencial fenotípico e funcional de macrófagos M1. De fato, o tratamento celular mais indicado para gerar macrófagos desse perfil é por meio do uso desses dois estímulos concomitantemente (MARTINEZ & GORDON et al., 2014; MÜLLER et al., 2017). Embora assumamos a natureza exógena do LPS e fora do contexto da criptococose, moléculas endógenas, como TNF- $\alpha$ , poderiam substituí-lo para uma função anti-criptocócica ótima de macrófagos M1 (MARTINEZ & GORDON et al., 2014; DAVIS et al., 2015; FA et al., 2019).

Outra exclusividade que os macrófagos estimulados com a combinação de IFN- $\gamma$  e LPS apresentaram foi a capacidade de produzir NO. Isso nos levou a hipotetizar que esta molécula poderia ser a responsável pelo efeito inibitório dessas células sobre a reativação do fungo. De fato, já havíamos observado que a infecção com leveduras dormentes não é capaz de interferir na produção da molécula. Para confirmar nossa hipótese, empregamos um

inibidor da enzima INOS, o que não só reconstituiu a reativação, corroborando a nossa hipótese, como permitiu um índice de culturabilidade ainda superior ao do macrófago controle. Esse resultado indica que o inibidor utilizado – relativamente específico para INOS -, ou mesmo a ausência da atividade de INOS, podem ter interferido em outros mecanismos importantes para o controle da reativação em macrófagos, como a produção de ROS.

Consistentemente com os nossos resultados, Voskuil e colaboradores (2013) demonstraram que a exposição de *M. tuberculosis* a NO, fornecido por meio de seu doador dietilenotriamina (DETA), induz um estado de dormência na bactéria. Ademais, mostraram que o mecanismo envolvido consiste na capacidade do NO em inibir irreversivelmente a cadeia respiratória da bactéria que, à semelhança de *C. neoformans*, é um microrganismo aeróbio obrigatório. Consistentemente, a dose de NO produzida (50  $\mu$ M) foi semelhante à encontrada nos nossos sobrenadantes, na forma de nitrito, e próxima dos níveis produzidos por macrófagos pulmonares na interação *ex vivo* com *C. neoformans* (VOSKUIL et al., 2003; WAGER et al., 2015). Uma vez que o nosso próprio protocolo de obtenção de *C. neoformans* é baseado na indução de hipóxia, acreditamos que esse mecanismo seja o mesmo envolvido na inibição da reativação observada no nosso modelo de interação *C. neoformans* dormente-macrófago.

Ensaio *in vivo* em camundongos serão necessários para confirmar não só a capacidade das leveduras dormentes reativarem no hospedeiro, como também, por meio da infecção de animais deficientes para INOS, receptor de IFN- $\gamma$ , ou animais selvagens tratados com imunossupressores, determinarmos o papel da produção de NO no curso da infecção latente causada por *C. neoformans*. Ainda, esses estudos *in vitro* e *in vivo* com o modelo de camundongos devem ser interpretados com certa cautela, e exigem ensaios com macrófagos humanos para confirmar a sua relevância clínica. Isto porque macrófagos murinos e humanos produzem quantidades desproporcionais de óxido nítrico, devido ao silenciamento epigenético à que INOS humana está sujeita (WEINBERG et al., 2005; GROSS et al., 2014). Não obstante, vários estudos têm apontado não só a expressão de INOS em macrófagos encontrados em granulomas pulmonares humanos, como também vinculando a sua expressão ao controle de infecções como a paracoccidiodomicose (FACCHETTI et al., 1999; BATISTA et al., 2005; MATTILA et al., 2013; WAGER et al., 2016).

Em conclusão, nossos resultados suportam a hipótese de que macrófagos são os sítios de indução e persistência de células dormentes na infecção criptocócica latente, além de que o fenótipo de polarização dessas células, reflexo do status da resposta imune do hospedeiro, é determinante para a manutenção ou reativação dessa infecção.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Nossos experimentos e achados abordam diferentes aspectos da infecção criptocócica latente, incluindo o sítio tecidual e celular envolvido, seus mecanismos de manutenção e reativação, bem como a biologia da levedura dormente de *C. neoformans*. No nosso estudo, validamos o uso de linhagens fluorescentes de *C. neoformans* como ferramentas para o estudo da interação deste com células do hospedeiro, ou mesmo para a compreensão da própria biologia do fungo, mais especificamente no seu processo de dormência. Além disso, nos permitiu evidenciar a presença de características morfológicas e mecanismos regulatórios pós-transcricionais atrelados ao fenótipo dormente desse fungo. Com isso, também pavimentamos o caminho para o uso do GFP e/ou outras moléculas fluorescentes para a investigação da biologia dessas células dormentes.

Embora não tenhamos conseguido empregar essas linhagens fluorescentes na análise da disseminação do fungo no hospedeiro, outras técnicas nos permitiram fazê-la. Dessa forma, demonstramos a capacidade do fungo em disseminar para uma variedade de sítios anatômicos no hospedeiro murino, corroborando especulações da literatura sobre o envolvimento de alguns sítios relevantes para a infecção latente, como o trato urogenital, além de sugerir a ocorrência de outros potenciais sítios, como a medula óssea.

Além disso, nós nos aproveitamos de uma metodologia recém-descrita de geração de leveduras dormentes, e nunca descrita em estudos com células do hospedeiro, para investigar a dinâmica de interação entre essas células e macrófagos. Isso nos permitiu concluir que tais leveduras não só apresentam características fenotípicas específicas que as distinguem de leveduras não dormentes, como essas características refletem na sua capacidade de modular diferentemente o macrófago, de forma a permitir a sua persistência intracelular e, em um contexto mais abrangente, no hospedeiro. Por fim, confirmamos o papel paradoxal do macrófago em promover tanto o controle da infecção latente, quanto a sua reativação, reflexo do tipo da resposta imune coordenada pelo hospedeiro.

Haja vista que *C. neoformans* é ubíquo na natureza e a contaminação do hospedeiro frequente, a expansão de terapias baseadas no uso de imunossuppressores e dos casos de pacientes HIV+ nas últimas décadas tem aumentado a relevância da necessidade do estudo da infecção latente e seus mecanismos subjacentes, como o presente estudo. O conjunto do conhecimento derivado desses estudos poderia ser útil no desenvolvimento e emprego de

vacinas para prevenir a reativação da infecção, ou mesmo na elaboração de tratamentos que coordenem a indução da reativação da doença combinada ao uso de antifúngicos, de forma a combater a infecção latente em condições mais controladas e em um estado menos vulnerável do hospedeiro.

Nosso trabalho foi capaz de responder algumas questões importantes acerca da patofisiologia da infecção criptocócica latente e, como consequência, levantou outras questões relevantes a serem respondidas experimentalmente:

- A reativação das leveduras dormentes de *C. neoformans* depende da dissolução dos grânulos de estresse?
- A população de leveduras encontrada nos sítios extrapulmonares está/estava dormente? Em caso afirmativo, seriam elas capazes de reativar a infecção no hospedeiro murino?
- Qual o fator ou processo do macrófago responsável pela reativação das leveduras dormentes?
- Há um vínculo entre a exocitose não lítica e a reativação?
- As leveduras dormentes seriam capazes de reativar *in vivo*, mediante a inoculação de camundongos?
- O óxido nítrico frustra a reativação das leveduras via inibição da cadeia respiratória?
- Macrófagos de origem humana seriam capazes de exercer esse mesmo mecanismo?
- Haveria outro mecanismo envolvido na inibição da reativação verificada no nosso modelo, como a produção de ROS ou acidificação do fagolisossomo?

A resolução dessas questões listadas pode promover um avanço significativo na compreensão da gênese da infecção latente e/ou sua reativação, bem como no desenvolvimento de terapias para prevenir o desenvolvimento da infecção ativa e fatal.



## 7. REFERÊNCIAS

AIDAR, M. T.; CASTRO, R. J.; BRANDÃO, F. S.; BOCCA, A. L.; FERNANDES L., Construção de linhagens repórteres de *Cryptococcus neoformans* contendo proteínas fluorescentes mCherry e GFP para estudos de interação patógeno-hospedeiro. In: Congresso de Iniciação Científica da UnB, 23, 2017, Brasília. **Anais do 23º Congresso de Iniciação Científica da Unb e 14º Congresso de Iniciação Científica do DF**. Brasília: 2017. Disponível em: <https://conferencias.unb.br/index.php/iniciacaocientifica/23cicunb14df/paper/view/8914>

AJELLO, L., & POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **European journal of epidemiology**, v. 1, n. 3, p. 160-165, 1985.

ALANIO, A., DESNOS-OLLIVIER, M., & DROMER, F. Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-macrophage interactions reveal that fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in humans. **MBio**, v. 2, n. 4, p. e00158-11, 2011.

ALANIO, A., VERNEL-PAUILLAC, F., STURNY-LECLÈRE, A., & DROMER, F. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. **MBio**, v. 6, n. 2, p. e02580-14, 2015.

ALBUQUERQUE, P., NICOLA, A. M., NIEVES, E., PAES, H. C., WILLIAMSON, P. R., SILVA-PEREIRA, I., & CASADEVALL, A. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 5, n. 1, p. e00986-13, 2014.

ALMEIDA, F., WOLF, J. M., & CASADEVALL, A. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-1185, 2015.

ALP, S. Melanin and its role on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Mikrobiyoloji bulteni**, v. 44, n. 3, p. 519-526, 2010.

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

ANDERS, S., PYL, P. T., & HUBER, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166-169, 2015.

ANDERSON, P., & KEDERSHA, N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 6, p. 430, 2009.

ARAUJO, G. D. S., FONSECA, F. L., PONTES, B., TORRES, A., CORDERO, R. J., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M., ... & GARCIA, E. S. Capsules from pathogenic and non-

pathogenic *Cryptococcus spp.* manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e29561, 2012.

ARAÚJO, G. R. D. S., FREITAS, G. J., FONSECA, F. L., LEITE, P. E. C., ROCHA, G. M., DE SOUZA, W., ... & FRASES, S. The environmental yeast *Cryptococcus liquefaciens* produces capsular and secreted polysaccharides with similar pathogenic properties to those of *C. neoformans*. **Scientific reports**, v. 7, p. 46768, 2017.

ARORA, S., OLSZEWSKI, M. A., TSANG, T. M., MCDONALD, R. A., TOEWS, G. B., & HUFFNAGLE, G. B. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 79, n. 5, p. 1915-1926, 2011.

ARRAS, S. D., CHITTY, J. L., BLAKE, K. L., SCHULZ, B. L., & FRASER, J. A. A genomic safe haven for mutant complementation in *Cryptococcus neoformans*. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122916, 2015.

ASAKURA, T., ARAI, D., ISHII, M., TAKEI, H., SUGIURA, H., TAKEUCHI, T., & BETSUYAKU, T. Pulmonary cryptococcosis developed from a nodule after treatment with infliximab for arthritis associated with ulcerative colitis. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 14, n. 4, p. 603-605, 2017.

ATLURI, S., RAGKOUSI, K., CORTEZZO, D. E., & SETLOW, P. Cooperativity between different nutrient receptors in germination of spores of *Bacillus subtilis* and reduction of this cooperativity by alterations in the GerB receptor. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 1, p. 28-36, 2006.

AYRAPETYAN, M., WILLIAMS, T., & OLIVER, J. D. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells. **Journal of bacteriology**, v. 200, n. 20, p. e00249-18, 2018.

BAILLY, M. P., BOIBIEUX, A., BIRON, F., DURIEU, I., PIENS, M. A., PEYRAMOND, D., & BERTRAND, J. L. Persistence of *Cryptococcus neoformans* in the prostate: failure of fluconazole despite high doses. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, n. 2, p. 435-436, 1991.

BAKER, R. D. Resectable mycotic lesions and acutely fatal mycoses. **Journal of the American Medical Association**, v. 150, n. 16, p. 1579-1581, 1952.

BAKER, R. D. The primary pulmonary lymph node complex of cryptococcosis. **American journal of clinical pathology**, v. 65, n. 1, p. 83-92, 1976.

BAKER, R. D., & HAUGEN, R. K. Tissue changes and tissue diagnosis in cryptococcosis. A study of 26 cases. **American journal of clinical pathology**, v. 25, n. 1, 1955.

BALABAN, N. Q., MERRIN, J., CHAIT, R., KOWALIK, L., & LEIBLER, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1622-1625, 2004.

BALLOU, E. R., SELVIG, K., NARLOCH, J. L., NICHOLS, C. B., & ALSPAUGH, J. A. Two Rac paralogs regulate polarized growth in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Fungal genetics and biology**, v. 57, p. 58-75, 2013.

BASSO, A. M. M., DE CASTRO, R. J. A., DE CASTRO, T. B., GUIMARÃES, H. I., POLEZ, V. L. P., CARBONERO, E. R., ... & BOCCA, A. L. Immunomodulatory activity of  $\beta$ -glucan-containing exopolysaccharides from *Auricularia auricular* in phagocytes and mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology**, 2019.

BATISTA, A. C., SOARES, C. T., & LARA, V. S. Failure of nitric oxide production by macrophages and decrease in CD4<sup>+</sup> T cells in oral paracoccidioidomycosis: possible mechanisms that permit local fungal multiplication. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 267-273, 2005.

BEN-ABDALLAH, M., STURNY-LECLÈRE, A., AVÉ, P., LOUISE, A., MOYRAND, F., WEIH, F., ... & MÉMET, S. Fungal-induced cell cycle impairment, chromosome instability and apoptosis via differential activation of NF- $\kappa$ B. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002555, 2012.

BERNSTEIN, B. W., CHEN, H., BOYLE, J. A., & BAMBURG, J. R. Formation of actin-ADF/cofilin rods transiently retards decline of mitochondrial potential and ATP in stressed neurons. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 291, n. 5, p. C828-C839, 2006.

BICANIC, T., MEINTJES, G., REBE, K., WILLIAMS, A., LOYSE, A., WOOD, R., ... & HARRISON, T. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-associated cryptococcal meningitis: a prospective study. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 51, n. 2, p. 130-134, 2009.

BIELSKA, E., SISQUELLA, M. A., ALDEIEG, M., BIRCH, C., O'DONOGHUE, E. J., & MAY, R. C. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1556, 2018.

BIGGER, J. W. Treatment of Staphylococcal Infections with Penicillin by Intermittent Sterilisation. **Lancet**, p. 497-500, 1944.

BIONDO, C., MIDIRI, A., MESSINA, L., TOMASELLO, F., GARUFI, G., CATANIA, M. R., ... & MANCUSO, G. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. **European journal of immunology**, v. 35, n. 3, p. 870-878, 2005.

BLACKBURN, C. D. W., & MCCARTHY, J. D. Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157: H7 in foods. **International journal of food microbiology**, v. 55, n. 1-3, p. 285-290, 2000.

BOJARCZUK, A., MILLER, K. A., HOTHAM, R., LEWIS, A., OGRYZKO, N. V., KAMUYANGO, A. A., ... & RENSHAW, S. A. *Cryptococcus neoformans* intracellular proliferation and capsule size determines early macrophage control of infection. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2016.

BOJARCZUK, A., MILLER, K. A., HOTHAM, R., LEWIS, A., OGRYZKO, N. V., KAMUYANGO, A. A., ... & RENSHAW, S. A. *Cryptococcus neoformans* intracellular proliferation and capsule size determines early macrophage control of infection. **Scientific reports**, v. 6, p. 21489, 2016.

BOLAÑOS, B., & MITCHELL, T. G. Phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages in the absence of serum. **Journal of leukocyte biology**, v. 46, n. 6, p. 521-528, 1989.

BOUKLAS, T., DIAGO-NAVARRO, E., WANG, X., FENSTER, M., & FRIES, B. C. Characterization of the virulence of *Cryptococcus neoformans* strains in an insect model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 809-813, 2015.

BRAMBILLA, M., MARTANI, F., BERTACCHI, S., VITANGELI, I., & BRANDUARDI, P. The *Saccharomyces cerevisiae* poly (A) binding protein (Pab1): Master regulator of mRNA metabolism and cell physiology. **Yeast**, v. 36, n. 1, p. 23-34, 2019.

BRUNE, C., MUNCHEL, S. E., FISCHER, N., PODTELEJNIKOV, A. V., & WEIS, K. Yeast poly (A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. **Rna**, v. 11, n. 4, p. 517-531, 2005.

BRUNET, K., ALANIO, A., LORTHOLARY, O., & RAMMAERT, B. Reactivation of dormant/latent fungal infection. **Journal of Infection**, v. 77, n. 6, p. 463-468, 2018.

BUCHAN, J. R., & PARKER, R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. **Molecular cell**, v. 36, n. 6, p. 932-941, 2009.

BUCHAN, J. R., KOLAITIS, R. M., TAYLOR, J. P., & PARKER, R. Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. **Cell**, v. 153, n. 7, p. 1461-1474, 2013.

BUCHAN, J. R., YOON, J. H., & PARKER, R. Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Sci**, v. 124, n. 2, p. 228-239, 2011.

BUERGER, S., SPOERING, A., GAVRISH, E., LESLIN, C., LING, L., & EPSTEIN, S. S. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 9, p. 3221-3228, 2012.

BÜRGEL, P. H., MARINA, C. L., SAAVEDRA, P. H., ALBUQUERQUE, P., HOLANDA, P. H., CASTRO, R. J. A. DE, ... & NOSANCHUK, J. *Cryptococcus neoformans* secretes

small molecules that inhibit IL-1 $\beta$  inflammasome-dependent secretion. **BioRxiv**, p. 554048, 2019.

BURGESS, H. M., RICHARDSON, W. A., ANDERSON, R. C., SALAUN, C., GRAHAM, S. V., & GRAY, N. K. Nuclear relocalisation of cytoplasmic poly (A)-binding proteins PABP1 and PABP4 in response to UV irradiation reveals mRNA-dependent export of metazoan PABPs. **J Cell Sci**, v. 124, n. 19, p. 3344-3355, 2011.

CALCOTT, P. H.; POSTGATE, J. R. On substrate-accelerated death in *Klebsiella aerogenes*. **Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 115-122, 1972.

CAMPUZANO, A., & WORMLEY, F. Innate immunity against *Cryptococcus*, from recognition to elimination. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 33, 2018.

CAMPUZANO, A., CASTRO-LOPEZ, N., WOZNIAK, K. L., WAGER, C. M. L., & WORMLEY Jr, F. L. Dectin-3 is not required for protection against *Cryptococcus neoformans* infection. **PLoS One**, v. 12, n. 1, 2017.

CANO, R. J., & BORUCKI, M. K. Revival and identification of bacterial spores in 25-to 40-million-year-old Dominican amber. **Science**, v. 268, n. 5213, p. 1060-1064, 1995.

CAPPELIER, J. M., MAGRAS, C., JOUVE, J. L., & FEDERIGHI, M. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models. **Food Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 375-383, 1999.

CARLSON M. org.Mm.eg.db: Genome wide annotation for Mouse. 2016.

CARTER, C. C., ONAFUWA-NUGA, A., MCNAMARA, L. A., RIDDELL IV, J., BIXBY, D., SAVONA, M. R., & COLLINS, K. L. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. **Nature medicine**, v. 16, n. 4, p. 446-451, 2010.

CASADEVALL, A., & PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: ASM press, 1998.

CASADEVALL, A., & PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **The Journal of infectious diseases**, v. 184, n. 3, p. 337-344, 2001.

CASADEVALL, A., & PIROFSKI, L. A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-24, 2003.

CASADEVALL, A., & PIROFSKI, L. A. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 12, p. 2169-2174, 2007.

CASADEVALL, A., COELHO, C., & ALANIO, A. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-mediated host damage. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 855, 2018.

CASADEVALL, A., COELHO, C., CORDERO, R. J., DRAGOTAKES, Q., JUNG, E., VIJ, R., & WEAR, M. P. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822-831, 2019a.

CASADEVALL, A., FU, M. S., GUIMARAES, A. J., & ALBUQUERQUE, P. The 'amoeboid predator-fungal animal virulence' hypothesis. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 10, 2019b.

CASADEVALL, A., KONTOYIANNIS, D. P., & ROBERT, V. On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. **mBio** 10: e01397-19. 2019c.

CASADEVALL, A., ROSAS, A. L., & NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354-358, 2000.

CASADEVALL, A., STEENBERGEN, J. N., & NOSANCHUK, J. D. 'Ready made'virulence and 'dual use'virulence factors in pathogenic environmental fungi—the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 4, p. 332-337, 2003.

CASTRO, R. J. A., SIQUEIRA, I. M., JERÔNIMO, M. S., BASSO, A. M. M., JUNIOR, P. H. D. H. V., MAGALHÃES, K. G., ... & BOCCA, A. L. The Major chromoblastomycosis etiologic agent *Fonsecaea pedrosoi* activates the NLRP3 inflammasome. **Frontiers in immunology**, v. 8, 2017.

CERCA, F., ANDRADE, F., FRANÇA, Â., ANDRADE, E. B., RIBEIRO, A., ALMEIDA, A. A., ... & VILANOVA, M. *Staphylococcus epidermidis* biofilms with higher proportions of dormant bacteria induce a lower activation of murine macrophages. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 12, p. 1717-1724, 2011.

CHAKA, W., SCHARRINGA, J., VERHEUL, A. F., VERHOEF, J., VAN STRIJP, A. G., & HOEPELMAN, I. M. Quantitative analysis of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 2, n. 6, p. 753-759, 1995.

CHANG, Y. C., STINS, M. F., MCCAFFERY, M. J., MILLER, G. F., PARE, D. R., DAM, T., ... & KWON-CHUNG, K. J. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 4985-4995, 2004.

CHARLIER, C., NIELSEN, K., DAOU, S., BRIGITTE, M., CHRETIEN, F., & DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 1, p. 120-127, 2009.

CHARPENTIER, E., ANTON, A. I., BARRY, P., ALFONSO, B., FANG, Y., & NOVICK, R. P. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 10, p. 6076-6085, 2004.

CHATURVEDI, V., WONG, B., & NEWMAN, S. L. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 10, p. 3836-3840, 1996.

CHAYAKULKEEREE, M., JOHNSTON, S. A., OEI, J. B., LEV, S., WILLIAMSON, P. R., WILSON, C. F., ... & SORRELL, T. C. SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1088-1101, 2011.

CHE, Y. M., ZHANG, Y., LI, M., LI, X. P., & ZHANG, L. L. *In vitro* and *in vivo* effect of PD-1/PD-L1 blockade on microglia/macrophage activation and T cell subset balance in cryptococcal meningitis. **Journal of cellular biochemistry**, v. 119, n. 4, p. 3044-3057, 2018.

CHEN, A. K., CHENG, Z., BEHLKE, M. A., & TSOURKAS, A. Assessing the sensitivity of commercially available fluorophores to the intracellular environment. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 19, p. 7437-7444, 2008.

CHEN, G. H., MCDONALD, R. A., WELLS, J. C., HUFFNAGLE, G. B., LUKACS, N. W., & TOEWS, G. B. The gamma interferon receptor is required for the protective pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 3, p. 1788-1796, 2005.

CHEN, G. Y., & NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826-837, 2010.

CHEN, L. C., BLANK, E. S., & CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 3, n. 5, p. 570-574, 1996.

CHEN, L. C., GOLDMAN, D. L., DOERING, T. L., PIROFSKI, L. A., & CASADEVALL, A. Antibody response to *Cryptococcus neoformans* proteins in rodents and humans. **Infection and immunity**, v. 67, n. 5, p. 2218-2224, 1999.

CHRÉTIEN, F., LORTHOLARY, O., KANSAU, I., NEUVILLE, S., GRAY, F., & DROMER, F. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 4, p. 522-530, 2002.

CLANCY, C. J., NGUYEN, M. H., ALANDOERFFER, R., CHENG, S., ICZKOWSKI, K., RICHARDSON, M., & GRAYBILL, J. R. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors. **Microbiology**, v. 152, n. 8, p. 2247-2255, 2006.

COELHO, C., BOCCA, A. L., & CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 219-238, 2014.

COLWELL, R. R., BRAYTON, P., HERRINGTON, D., TALL, B., HUQ, A., & LEVINE, M. M. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. **World Journal of Microbiology and biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 28-31, 1996.

COPELAND, A. M., ALTAMURA, L. A., VAN DEUSEN, N. M., & SCHMALJOHN, C. S. Nuclear relocalization of polyadenylate binding protein during rift valley fever virus infection involves expression of the NSs gene. **Journal of virology**, v. 87, n. 21, p. 11659-11669, 2013.

CORALLI, C., CEMAZAR, M., KANTHOU, C., TOZER, G. M., & DACHS, G. U. Limitations of the reporter green fluorescent protein under simulated tumor conditions. **Cancer research**, v. 61, n. 12, p. 4784-4790, 2001.

COX, G. M., HARRISON, T. S., MCDADE, H. C., TABORDA, C. P., HEINRICH, G., CASADEVALL, A., & PERFECT, J. R. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 173-180, 2003.

COX, G. M., MCDADE, H. C., CHEN, S. C., TUCKER, S. C., GOTTFREDSSON, M., WRIGHT, L. C., ... & PERFECT, J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 1, p. 166-175, 2001.  
CROSS, A. S. What is a virulence factor? **Critical Care**, v. 12, n. 6, p. 196, 2008.

DAN, J. M., KELLY, R. M., LEE, C. K., & LEVITZ, S. M. Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. **Infection and immunity**, v. 76, n. 6, p. 2362-2367, 2008.

DAS, B., ANTOON, R., TSUCHIDA, R., LOTFI, S., MOROZOVA, O., FARHAT, W., ... & BARUCHEL, S. Squalene selectively protects mouse bone marrow progenitors against cisplatin and carboplatin-induced cytotoxicity in vivo without protecting tumor growth. **Neoplasia**, v. 10, n. 10, p. 1105-IN4, 2008.

DAS, B., KASHINO, S. S., PULU, I., KALITA, D., SWAMI, V., YEGER, H., ... & CAMPOS-NETO, A. CD271+ bone marrow mesenchymal stem cells may provide a niche for dormant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science translational medicine**, v. 5, 170ra13, 2013.

DAVIS, M. J., EASTMAN, A. J., QIU, Y., GREGORKA, B., KOZEL, T. R., OSTERHOLZER, J. J., ... & OLSZEWSKI, M. A. *Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 5, p. 2219-2231, 2015.

DAVIS, M. J., TSANG, T. M., QIU, Y., DAYRIT, J. K., FREIJ, J. B., HUFFNAGLE, G. B., & OLSZEWSKI, M. A. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00264-13, 2013.



DAVIS, M. J., TSANG, T. M., QIU, Y., DAYRIT, J. K., FREIJ, J. B., HUFFNAGLE, G. B., & OLSZEWSKI, M. A. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00264-13, 2013.

DE JESÚS-BERRÍOS, M., LIU, L., NUSSBAUM, J. C., COX, G. M., STAMLER, J. S., & HEITMAN, J. Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. **Current Biology**, v. 13, n. 22, p. 1963-1968, 2003.

DE JESÚS-BERRÍOS, M., LIU, L., NUSSBAUM, J. C., COX, G. M., STAMLER, J. S., & HEITMAN, J. Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. **Current Biology**, v. 13, n. 22, p. 1963-1968, 2003.

DE LEON-RODRIGUEZ, C. M., FU, M. S., CORBALI, M. O., CORDERO, R. J., & CASADEVALL, A. The capsule of *Cryptococcus neoformans* modulates phagosomal pH through its acid-base properties. **mSphere**, v. 3, n. 5, p. e00437-18, 2018.

DE VIRGILIO, C. The essence of yeast quiescence. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 306-339, 2012.

DECKEN, K., KÖHLER, G., PALMER-LEHMANN, K., WUNDERLIN, A., MATTNER, F., MAGRAM, J., ... & ALBER, G. Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 10, p. 4994-5000, 1998.

DECOTE-RICARDO, D., LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F., ROCHA, J. D. B., NASCIMENTO, D. O., NUNES, M. P., MORROT, A., ... & FREIRE-DE-LIMA, C. G. Immunomodulatory role of capsular polysaccharides constituents of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in medicine**, v. 6, 2019.

DEL POETA, M., TOFFALETTI, D. L., RUDE, T. H., SPARKS, S. D., HEITMAN, J., & PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans* differential gene expression detected in vitro and in vivo with green fluorescent protein. **Infection and immunity**, v. 67, n. 4, p. 1812-1820, 1999.

DERENGOWSKI, L. D. S., PAES, H. C., ALBUQUERQUE, P., TAVARES, A. H. F., FERNANDES, L., SILVA-PEREIRA, I., & CASADEVALL, A. The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 5, p. 761-774, 2013.

DESHAW, M., & PIROFSKI, L. A. Antibodies to the *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan are ubiquitous in serum from HIV+ and HIV- individuals. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 99, n. 3, p. 425-432, 1995.

DHARWADKAR, A., VIMAL, S., BUCH, A. C., & PANICKER, N. K. HIV infection presenting as bone marrow cryptococcosis. **Advanced biomedical research**, v. 3, 2014.

DIETERSDORFER, E., KIRSCHNER, A., SCHRAMMEL, B., OHRADANOVA-REPIC, A., STOCKINGER, H., SOMMER, R., ... & CERVERO-ARAGÓ, S. Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. **Water research**, v. 141, p. 428-438, 2018.

DINARELLO, C. A., IKEJIMA, T., WARNER, S. J., ORENCOLE, S. F., LONNEMANN, G., CANNON, J. G., & LIBBY, P. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits *in vivo* and in human mononuclear cells *in vitro*. **The Journal of Immunology**, v. 139, n. 6, p. 1902-1910, 1987.

DIVOL, B., & LONVAUD-FUNEL, A. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 85-93, 2005.

DOERING, T. L., NOSANCHUK, J. D., ROBERTS, W. K., & CASADEVALL, A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. **Medical Mycology**, v. 37, n. 3, p. 175-181, 1999.

DOKTOR, F., PRAGER, P., WIEDEMANN, P., KOHEN, L., BRINGMANN, A., & HOLLBORN, M. Hypoxic expression of NLRP3 and VEGF in cultured retinal pigment epithelial cells: contribution of P2Y 2 receptor signaling. **Purinergic signalling**, v. 14, n. 4, p. 471-484, 2018.

DRAGOTAKES, Q., FU, M. S., & CASADEVALL, A. Dragotcytosis: elucidation of the mechanism for *Cryptococcus neoformans* macrophage-to-macrophage transfer. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 9, p. 2661-2670, 2019.

DROMER, F., AUCOUTURIER, P., CLAUVEL, J. P., SAIMOT, G., & YENI, P. *Cryptococcus neoformans* antibody levels in patients with AIDS. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 20, n. 3, p. 283-285, 1988.

DROMER, F., CASADEVALL, A., PERFECT, J., & SORRELL, T., *Cryptococcus neoformans*: latency and disease. In: **Cryptococcus. American Society of Microbiology**, p. 431-439, 2011.

DROMER, F., RONIN, O., & DUPONT, B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an Asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, n. 5, p. 395-397, 1992.

DUBOIS, J. C., PASULA, R., DADE, J. E., & SMULIAN, A. G. Yeast transcriptome and *in vivo* hypoxia detection reveals *Histoplasma capsulatum* response to low oxygen tension. **Medical mycology**, v. 54, n. 1, p. 40-58, 2016.

DWIDJOSISWOJO, Z., RICHARD, J., MORITZ, M. M., DOPP, E., FLEMMING, H. C., & WINGENDER, J. Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 214, n. 6, p. 485-492, 2011.

DWORKIN, J., & SHAH, I. M. Exit from dormancy in microbial organisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 890, 2010.

EISENMAN, H. C., DUONG, R., CHAN, H., TSUE, R., & MCCLELLAND, E. E. Reduced virulence of melanized *Cryptococcus neoformans* in *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 5, n. 5, p. 611-618, 2014.

ELSEGEINY, W., MARR, K. A., & WILLIAMSON, P. R. Immunology of cryptococcal infections: developing a rational approach to patient therapy. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 651, 2018.

ENGELHARDT, B., VAJKOCZY, P., & WELLER, R. O. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. **Nature immunology**, v. 18, n. 2, p. 123, 2017.

EPSTEIN, S. S. Microbial awakenings. **Nature**, v. 457, n. 7233, p. 1083-1083, 2009.

ESCHKE, M., PIEHLER, D., SCHULZE, B., RICHTER, T., GRAHNERT, A., PROTSCHKA, M., ... & ALBER, G. A novel experimental model of *Cryptococcus neoformans*-related immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) provides insights into pathogenesis. **European journal of immunology**, v. 45, n. 12, p. 3339-3350, 2015.

FA, Z., XU, J., YI, J., SANG, J., PAN, W., XIE, Q., ... & OLSZEWSKI, M. A. (2019). TNF- $\alpha$ -producing *Cryptococcus neoformans* exerts protective effects on host defenses in murine pulmonary cryptococcosis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1725, 2019.

FACCHETTI, F., VERMI, W., FIORENTINI, S., CHILOSI, M., CARUSO, A., DUSE, M., ... & BADOLATO, R. Expression of inducible nitric oxide synthase in human granulomas and histiocytic reactions. **The American journal of pathology**, v. 154, n. 1, p. 145-152, 1999.

FELDMESSER, M., KRESS, Y., NOVIKOFF, P., & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4225-4237, 2000.

FRAGER, S. Z., CHRISMAN, C. J., SHAKKED, R., & CASADEVALL, A. Paramecium species ingest and kill the cells of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology**, v. 48, n. 5, p. 775-779, 2010.

FROGER, A., & HALL, J. E. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 6, 2007.

FU, M. S., COELHO, C., DE LEON-RODRIGUEZ, C. M., ROSSI, D. C., CAMACHO, E., JUNG, E. H., ... & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007144, 2018.

GADEBUSCH, H. H., & GIKAS, P. W. The effect of cortisone upon experimental pulmonary cryptococcosis. **American Review of Respiratory Disease**, v. 92, n. 1, p. 64-74, 1965.

GARCÍA, M. T., JONES, S., PELAZ, C., MILLAR, R. D., & ABU KWAIK, Y. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1267-1277, 2007.

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

GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 147-161, 2012.

GERIK, K. J., DONLIN, M. J., SOTO, C. E., BANKS, A. M., BANKS, I. R., MALIGIE, M. A., ... & LODGE, J. K. Cell wall integrity is dependent on the PKC1 signal transduction pathway in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 58, n. 2, p. 393-408, 2005.

GIBSON, J., EVANS, R., BOJARCZUK, A., HOTHAM, R., LAGENDIJK, A., HOGAN, B., ... & JOHNSTON, S. Dissemination of *Cryptococcus neoformans* via localised proliferation and blockage of blood vessels. **bioRxiv**, p. 184200, 2017.

GILES, S. S., DAGENAIS, T. R., BOTTS, M. R., KELLER, N. P., & HULL, C. M. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 8, p. 3491-3500, 2009.

GLOCKNER, J. F., SWARTZ, H. M., & PALS, M. A. Oxygen gradients in CHO cells: measurement and characterization by electron spin resonance. **Journal of cellular physiology**, v. 140, n. 3, p. 505-511, 1989.

GOLDMAN, D. L., KHINE, H., ABADI, J., LINDENBERG, D. J., PIROFSKI, L. A., NIANG, R., & CASADEVALL, A. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. e66-e66, 2001.

GOLDMAN, D. L., LEE, S. C., MEDNICK, A. J., MONTELLA, L., & CASADEVALL, A. Persistent *Cryptococcus neoformans* Pulmonary Infection in the Rat Is Associated with Intracellular Parasitism, Decreased Inducible Nitric Oxide Synthase Expression, and Altered Antibody Responsiveness to Cryptococcal Polysaccharide. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 832-838, 2000.

GORGONI, B., & GRAY, N. K. The roles of cytoplasmic poly (A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. **Briefings in Functional Genomics**, v. 3, n. 2, p. 125-141, 2004.

GRAHNERT, A., RICHTER, T., PIEHLER, D., ESCHKE, M., SCHULZE, B., MÜLLER, U., ... & ALBER, G. IL-4 receptor-alpha-dependent control of *Cryptococcus neoformans* in the early phase of pulmonary infection. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87341, 2014.

GROSS, O., YAZDI, A. S., THOMAS, C. J., MASIN, M., HEINZ, L. X., GUARDA, G., ... & TSCHOPP, J. Inflammasome activators induce interleukin-1 $\alpha$  secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 388-400, 2012.

GROSS, T. J., KREMENS, K., POWERS, L. S., BRINK, B., KNUTSON, T., DOMANN, F. E., ... & MONICK, M. M. Epigenetic silencing of the human NOS2 gene: rethinking the role of nitric oxide in human macrophage inflammatory responses. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 5, p. 2326-2338, 2014.

GUO, C., CHEN, M., FA, Z., LU, A., FANG, W., SUN, B., ... & MENG, G. Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. **Microbes and infection**, v. 16, n. 10, p. 845-854, 2014.

GUPTA, N., SAHU, A., PRABHAKAR, A., CHATTERJEE, T., TYAGI, T., KUMARI, B., ... & ASHRAF, M. Z. Activation of NLRP3 inflammasome complex potentiates venous thrombosis in response to hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 18, p. 4763-4768, 2017.

GUPTA, R. K., SRIVASTAVA, B. S., & SRIVASTAVA, R. Comparative expression analysis of rpf-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under different physiological stress and growth conditions. **Microbiology**, v. 156, n. 9, p. 2714-2722, 2010.  
GYAWALI, R., UPADHYAY, S., WAY, J., & LIN, X. A family of secretory proteins is associated with different morphotypes in *Cryptococcus neoformans*. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 5, p. e02967-16, 2017.

HAGEN, F., COLOM, M. F., SWINNE, D., TINTELNOT, K., IATTA, R., MONTAGNA, M. T., ... & KAMERMANS, A. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 10, p. 1618, 2012.

HANSEN, M. C., PALMER JR, R. J., UDSEN, C., WHITE, D. C., & MOLIN, S. Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. **Microbiology**, v. 147, n. 5, p. 1383-1391, 2001.

HAUCEN, R., & BAKER, R. D. The pulmonary lesions in cryptococcosis with special reference to subpleural nodules. **American journal of clinical pathology**, v. 24, n. 12, p. 1381-90, 1954.

HEBERLE, H., MEIRELLES, G. V., DA SILVA, F. R., TELLES, G. P., & MINGHIM, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 169, 2015.

HEIM, S., LLEO, M. D. M., BONATO, B., GUZMAN, C. A., & CANEPARI, P. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6739-6745, 2002.

HEIMLICHER, M. B., BÄCHLER, M., LIU, M., IBENECHÉ-NNEWIHE, C., FLORIN, E. L., HOENGER, A., & BRUNNER, D. Reversible solidification of fission yeast cytoplasm after prolonged nutrient starvation. **Journal of cell science**, v. 132, n. 21, 2019.

HOAG, K. A., LIPSCOMB, M. F., IZZO, A. A., & STREET, N. E. IL-12 and IFN- $\gamma$  are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant CB-17 mice. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 17, n. 6, p. 733-739, 1997.

HOBBY, G. L., MEYER, K., & CHAFFEE, E. Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 50, n. 2, p. 281-285, 1942.

HOCHBERG-LAUFER, H., SCHWED-GROSS, A., NEUGEBAUER, K. M., & SHAV-TAL, Y. Uncoupling of nucleo-cytoplasmic RNA export and localization during stress. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 9, p. 4778-4797, 2019.

HOLE, C. R., BUI, H., WORMLEY, F. L., & WOZNIAK, K. L. Mechanisms of dendritic cell lysosomal killing of *Cryptococcus*. **Scientific reports**, v. 2, p. 739, 2012.

HOMMEL, B., STURNY-LECLERE, A., VOLANT, S., VELUPPILLAI, N., DUCHATEAU, M., YU, C. H., ... & ALANIO, A. *Cryptococcus neoformans* resist to drastic conditions by switching to viable but non-culturable cell phenotype. **PLOS Pathogens**, V. 15, n 9, e1008070, 2019.

HORAI, R., ASANO, M., SUDO, K., KANUKA, H., SUZUKI, M., NISHIHARA, M., ... & IWAKURA, Y. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 $\beta$  is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. **The Journal of experimental medicine**, v. 187, n. 9, p. 1463-1475, 1998.

HU, Y., & COATES, A. Nonmultiplying bacteria are profoundly tolerant to antibiotics. In: **Antibiotic Resistance**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 99-119.

HUANG, M.; HULL, C. M. Sporulation: how to survive on planet Earth (and beyond). **Current genetics**, v. 63, n. 5, p. 831-838, 2017.

HUANG, S. H., WU, C. H., CHANG, Y. C., KWON-CHUNG, K. J., BROWN, R. J., & JONG, A. *Cryptococcus neoformans*-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e48570, 2012.

IDNURM, A., BAHN, Y. S., NIELSEN, K., LIN, X., FRASER, J. A., & HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753, 2005.

IGHODARO, O. M., & AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

IONA, E., PARDINI, M., GAGLIARDI, M. C., COLONE, M., STRINGARO, A. R., TELONI, R., ... & GIANNONI, F. Infection of human THP-1 cells with dormant *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and infection**, v. 14, n. 11, p. 959-967, 2012.

JACOBS, S. A., ROOBROUCK, V. D., VERFAILLIE, C. M., & VAN GOOL, S. W. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. **Immunology & Cell Biology**, v. 91, n. 1, p. 32-39, 2013.

JAMES, P. E., GRINBERG, O. Y., MICHAELS, G., & SWARTZ, H. M. Intraphagosomal oxygen in stimulated macrophages. **Journal of cellular physiology**, v. 163, n. 2, p. 241-247, 1995.

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

KASUGA, T., TOWNSEND, J. P., TIAN, C., GILBERT, L. B., MANNHAUPT, G., TAYLOR, J. W., & GLASS, N. L. Long-oligomer microarray profiling in *Neurospora crassa* reveals the transcriptional program underlying biochemical and physiological events of conidial germination. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 20, p. 6469-6485, 2005.

KAWAKAMI, K., ZHANG, T., QURESHI, M. H., & SAITO, A. *Cryptococcus neoformans* Inhibits Nitric Oxide Production by Murine Peritoneal Macrophages Stimulated with Interferon- $\gamma$  and Lipopolysaccharide. **Cellular immunology**, v. 180, n. 1, p. 47-54, 1997.

KECHICHIAN, T. B., SHEA, J., & DEL POETA, M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. **Infection and immunity**, v. 75, n. 10, p. 4792-4798, 2007.

KELLEY, N., JELTEMA, D., DUAN, Y., & HE, Y. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3328, 2019.

KOGUCHI, Y., & KAWAKAMI, K. Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. **International reviews of immunology**, v. 21, n. 4-5, p. 423-428, 2002.

KONG, Y., YANG, D., CIRILLO, S. L., LI, S., AKIN, A., FRANCIS, K. P., ... & CIRILLO, J. D. Application of fluorescent protein expressing strains to evaluation of anti-tuberculosis therapeutic efficacy in vitro and in vivo. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0149972, 2016.

KOPECKÁ, M., & GABRIEL, M. The influence of Congo red on the cell wall and (1→3)- $\beta$ -d-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of microbiology**, v. 158, n. 2, p. 115-126, 1992.

KROSCHWALD, S., MUNDER, M. C., MAHARANA, S., FRANZMANN, T. M., RICHTER, D., RUER, M., ... & ALBERTI, S. Different material states of Pub1 condensates define distinct modes of stress adaptation and recovery. **Cell reports**, v. 23, n. 11, p. 3327-3339, 2018.

KWON-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E. Distribution of  $\alpha$  and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am. J. Epidemiol.* 108, 337–340, 1978.

KWON-CHUNG, K. J., POLACHECK, I., & POPKIN, T. J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **Journal of bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1414-1421, 1982.

LAFLEUR, M. D., QI, Q., & LEWIS, K. Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 39-44, 2010.

LAI, C. J., CHEN, S. Y., LIN, I. H., CHANG, C. H., & WONG, H. C. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. **International journal of food microbiology**, v. 135, n. 2, p. 118-124, 2009.

LAMARRE, C., SOKOL, S., DEBEAUPUIS, J. P., HENRY, C., LACROIX, C., GLASER, P., ... & LATGÉ, J. P. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 417, 2008.

LANGE, A., BEIER, S., HUSON, D. H., PARUSEL, R., IGLAUER, F., & FRICK, J. S. Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). **Genome announcements**, v. 6, n. 2, p. e01220-17, 2018.

LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F., ROCHA, J. D. B., NUNES, M. P., OLIVEIRA, P. A. V., DE OLIVEIRA NASCIMENTO, D., FREIRE-DE-LIMA, L., ... & DOSREIS, G. A. Involvement of the capsular GalXM-induced IL-17 cytokine in the control of *Cryptococcus neoformans* infection. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 16378, 2018.

LARSEN, R. A., BOZZETTE, S., MCCUTCHAN, J. A., CHIU, J., LEAL, M. A., & RICHMAN, D. D. Persistent *Cryptococcus neoformans* infection of the prostate after successful treatment of meningitis. **Annals of internal medicine**, v. 111, n. 2, p. 125-128, 1989.



LEE, K. T., SO, Y. S., YANG, D. H., JUNG, K. W., CHOI, J., LEE, D. G., ... & MEYERS, G. L. Systematic functional analysis of kinases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Nature communications**, v. 7, p. 12766, 2016.

LEEMANS, J. C., CASSEL, S. L., & SUTTERWALA, F. S. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. **Immunological reviews**, v. 243, n. 1, p. 152-162, 2011.

LEI, G., CHEN, M., LI, H., NIU, J. L., WU, S., MAO, L., ... & LENG, Q. Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. **Cell research**, v. 23, n. 7, p. 965-968, 2013.

LELEU, C., MENOTTI, J., MENECEUR, P., CHOUKRI, F., SULAHIAN, A., GARIN, Y. J. F., & DEROUIN, F. Efficacy of liposomal amphotericin B for prophylaxis of acute or reactivation models of invasive pulmonary aspergillosis. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 241-249, 2013.

LEPECQ, J. B., & PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical-chemical characterization. **Journal of molecular biology**, v. 27, n. 1, p. 87-106, 1967.

LEV, S., DESMARINI, D., CHAYAKULKEEREE, M., SORRELL, T. C., & DJORDJEVIC, J. T. The Crz1/Sp1 transcription factor of *Cryptococcus neoformans* is activated by calcineurin and regulates cell wall integrity. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51403, 2012.

LEVITZ, S. M., & SPECHT, C. A. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 513-524, 2006.

LEVITZ, S. M., NONG, S. H., SEETOO, K. F., HARRISON, T. S., SPEIZER, R. A., & SIMONS, E. R. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p. 885-890, 1999.

LEVITZ, S. M., NONG, S. H., SEETOO, K. F., HARRISON, T. S., SPEIZER, R. A., & SIMONS, E. R. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p. 885-890, 1999.

LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNELL, T., RUAN, J., HOMER, N., ... & DURBIN, R. The sequence alignment/map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078-2079, 2009.

LI, L., MENDIS, N., TRIGUI, H., OLIVER, J. D., & FAUCHER, S. P. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 258, 2014.

LIM, J., COATES, C. J., SEOANE, P. I., GARELNABI, M., TAYLOR-SMITH, L. M., MONTEITH, P., ... & MAY, R. C. Characterizing the mechanisms of nonopsonic uptake of cryptococci by macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 10, p. 3539-3546, 2018.

LIN, W., MATHYS, V., ANG, E. L. Y., KOH, V. H. Q., GÓMEZ, J. M. M., ANG, M. L. T., ... & ALONSO, S. Urease activity represents an alternative pathway for *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen metabolism. **Infection and immunity**, v. 80, n. 8, p. 2771-2779, 2012.

LINDELL, D. M., BALLINGER, M. N., MCDONALD, R. A., TOEWS, G. B., & HUFFNAGLE, G. B. Immunologic homeostasis during infection: coexistence of strong pulmonary cell-mediated immunity to secondary *Cryptococcus neoformans* infection while the primary infection still persists at low levels in the lungs. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4652-4661, 2006.

LOHMANN-MATTHES, M. L., STEINMULLER, C., & FRANKE-ULLMANN, G. Pulmonary macrophages. **European Respiratory Journal**, v. 7, n. 9, p. 1678-1689, 1994.  
LOPES, C. S., DAIFALLA, N., DAS, B., DA SILVA, V. D., & CAMPOS-NETO, A. CD271+ Mesenchymal Stem Cells as a Possible Infectious Niche for *Leishmania infantum*. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162927, 2016.

LORANG, J. M., TUORI, R. P., MARTINEZ, J. P., SAWYER, T. L., REDMAN, R. S., ROLLINS, J. A., ... & CIUFFETTI, L. M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1987-1994, 2001.

LORTHOLARY, O., IMPROVISI, L., NICOLAS, M., PROVOST, F., DUPONT, B., & DROMER, F. Fungemia during murine cryptococcosis sheds some light on pathophysiology. **Medical mycology**, v. 37, n. 3, p. 169-174, 1999.

LUZZATI, R., GATTI, G., LAZZARINI, L., LIMONTA, D., VENTO, S., & CONCIA, E. Fluconazole penetration into the prostatic fluid of patients with AIDS-associated cryptococcal meningitis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 423-424, 1998.

MAFFEI, C. M., MIRELS, L. F., SOBEL, R. A., CLEMONS, K. V., & STEVENS, D. A. Cytokine and inducible nitric oxide synthase mRNA expression during experimental murine cryptococcal meningoencephalitis. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 2338-2349, 2004.

MAMBULA, S. S., SIMONS, E. R., HASTEY, R., SELSTED, M. E., & LEVITZ, S. M. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 11, p. 6257-6264, 2000.

MARIM, F. M., SILVEIRA, T. N., LIMA JR, D. S., & ZAMBONI, D. S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e15263, 2010.

MARIOTTI, S., PARDINI, M., GAGLIARDI, M. C., TELONI, R., GIANNONI, F., FRAZIANO, M., ... & NISINI, R. Dormant *Mycobacterium tuberculosis* fails to block phagosome maturation and shows unexpected capacity to stimulate specific human T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 1, p. 274-282, 2013.

MARTANI, F., MARANO, F., BERTACCHI, S., PORRO, D., & BRANDUARDI, P. The *Saccharomyces cerevisiae* poly (A) binding protein Pab1 as a target for eliciting stress tolerant phenotypes. **Scientific reports**, v. 5, p. 18318, 2015.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from highthroughput sequencing reads. **EMBnet J** 17: 10–12. 2011.

MARTINEZ, F. O., & GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime reports**, v. 6, 2014.

MATTILA, J. T., OJO, O. O., KEPKA-LENHART, D., MARINO, S., KIM, J. H., EUM, S. Y., ... & MORRIS, S. M. Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 2, p. 773-784, 2013.

MCQUISTON, T. J., & WILLIAMSON, P. R. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2012.

MEDNICK, A. J., FELDMESSER, M., RIVERA, J., & CASADEVALL, A. Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis. **European journal of immunology**, v. 33, n. 6, p. 1744-1753, 2003.

MEYA, D. B., MANABE, Y. C., BOULWARE, D. R., & JANOFF, E. N. The Immunopathogenesis of Cryptococcal Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome-Understanding a Conundrum. **Current opinion in infectious diseases**, v. 29, n. 1, p. 10, 2016.

MEYA, D. B., OKURUT, S., ZZIWA, G., ROLFES, M. A., KELSEY, M., COSE, S., ... & MAYANJA-KIZZA, H. Cellular immune activation in cerebrospinal fluid from Ugandans with cryptococcal meningitis and immune reconstitution inflammatory syndrome. **The Journal of infectious diseases**, v. 211, n. 10, p. 1597-1606, 2015.

MISSALL, T. A., CHERRY-HARRIS, J. F., & LODGE, J. K. The *Cryptococcus neoformans* Rho-GDP dissociation inhibitor mediates intracellular survival and virulence. **Infection and immunity**, v. 76, n. 12, p. 5729-5737, 2008.

MISSALL, T. A., PUSATERI, M. E., & LODGE, J. K. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1447-1458, 2004.

MISSALL, Tricia A.; CHERRY-HARRIS, Jocie F.; LODGE, Jennifer K. Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2573-2581, 2005.

MONARI, C., BISTONI, F., CASADEVALL, A., PERICOLINI, E., PIETRELLA, D., KOZEL, T. R., & VECCHIARELLI, A. Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. **The Journal of infectious diseases**, v. 191, n. 1, p. 127-137, 2005.

MORANOVA, Z., KAWAMOTO, S., & RACLAVSKY, V. Hypoxia sensing in *Cryptococcus neoformans*: Biofilm-like adaptation for dormancy. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 153, n. 3, p. 189-193, 2009.

MOSLEY, B., URDAL, D. L., PRICKETT, K. S., LARSEN, A., COSMAN, D., CONLON, P. J., ... & DOWER, S. K. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. **Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 7, p. 2941-2944, 1987.

MUKAI, T., MAEDA, Y., TAMURA, T., MIYAMOTO, Y., & MAKINO, M. CD4<sup>+</sup> T-cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 96-106, 2008.

MUKAMOLOVA, G. V., KAPRELYANTS, A. S., KELL, D. B., & YOUNG, M. Adoption of the transiently non-culturable state – a bacterial survival strategy? **Adv. Microb. Physiol.**, v. 47, n. 65-129, 2003.

MÜLLER, E., CHRISTOPOULOS, P. F., HALDER, S., LUNDE, A., BERAKI, K., SPETH, M., ... & CORTHAY, A. Toll-like receptor ligands and interferon- $\gamma$  synergize for induction of antitumor M1 macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1383, 2017.

MUNDER, M. C., MIDTVEDT, D., FRANZMANN, T., NÜSKE, E., OTTO, O., HERBIG, M., ... & MALINOVSKA, L. A pH-driven transition of the cytoplasm from a fluid-to a solid-like state promotes entry into dormancy. **Elife**, v. 5, p. e09347, 2016.

MUSUBIRE, A. K., MEYA, D. B., RHEIN, J., MEINTJES, G., BOHJANEN, P. R., NUWAGIRA, E., ... & HULLSIEK, K. H. Blood neutrophil counts in HIV-infected patients with cryptococcal meningitis: Association with mortality. **PloS one**, v. 13, n. 12, p. e0209337, 2018.

MYLONAKIS, E., AUSUBEL, F. M., PERFECT, J. R., HEITMAN, J., & CALDERWOOD, S. B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15675-15680, 2002.

MYLONAKIS, E., MORENO, R., EL KHOURY, J. B., IDNURM, A., HEITMAN, J., CALDERWOOD, S. B., ... & DIENER, A. *Galleria mellonella* as a model system to study

*Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.

NAKAMURA, K., KINJO, T., SAIJO, S., MIYAZATO, A., ADACHI, Y., OHNO, N., ... & KAWAKAMI, K. Dectin-1 is not required for the host defense to *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology and immunology**, v. 51, n. 11, p. 1115-1119, 2007.

NAKAMURA, K., MIYAZATO, A., XIAO, G., HATTA, M., INDEN, K., AOYAGI, T., ... & IWAKURA, Y. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 6, p. 4067-4074, 2008.

NAKAMURA, Y., SATO, K., YAMAMOTO, H., MATSUMURA, K., MATSUMOTO, I., NOMURA, T., ... & YAMASAKI, S. Dectin-2 deficiency promotes Th2 response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 83, n. 2, p. 671-681, 2015.

NEAL, L. M., XING, E., XU, J., KOLBE, J. L., OSTERHOLZER, J. J., SEGAL, B. M., ... & OLSZEWSKI, M. A. CD4<sup>+</sup> T cells orchestrate lethal immune pathology despite fungal clearance during *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis. **MBio**, v. 8, n. 6, p. e01415-17, 2017.

NEAL, L. M., XING, E., XU, J., KOLBE, J. L., OSTERHOLZER, J. J., SEGAL, B. M., ... & OLSZEWSKI, M. A. CD4<sup>+</sup> T cells orchestrate lethal immune pathology despite fungal clearance during *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis. **MBio**, v. 8, n. 6, p. e01415-17, 2017.

NICHOLS, C. B., OST, K. S., GROGAN, D. P., PIANALTO, K., HASAN, S., & ALSPAUGH, J. A. Impact of protein palmitoylation on the virulence potential of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 14, n. 7, p. 626-635, 2015.

NICHOLSON, W. L., MUNAKATA, N., HORNECK, G., MELOSH, H. J., & SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

NICOLA, A. M., ROBERTSON, E. J., ALBUQUERQUE, P., DA SILVEIRA DERENGOWSKI, L., & CASADEVALL, A. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. **MBio**, v. 2, n. 4, p. e00167-11, 2011.

NIELSEN, K., COX, G. M., LITVINTSEVA, A. P., MYLONAKIS, E., MALLIARIS, S. D., BENJAMIN, D. K., ... & HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans*  $\alpha$  strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. **Infection and immunity**, v. 73, n. 8, p. 4922-4933, 2005.

NOSANCHUK, J. D., OVALLE, R., & CASADEVALL, A. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 7, p. 1093-1099, 2001.

OLIVEIRA, D. L., FREIRE-DE-LIMA, C. G., NOSANCHUK, J. D., CASADEVALL, A., RODRIGUES, M. L., & NIMRICHTER, L. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infection and immunity**, v. 78, n. 4, p. 1601-1609, 2010.

OLIVEIRA, D. S., DZINIC, S., BONFIL, A. I., SALIGANAN, A. D., SHENG, S., & BONFIL, R. D. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. **Bosnian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 1, p. 8, 2016.

OLIVER, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 4, p. 415-425, 2010.

OLSZEWSKI, M. A., NOVERR, M. C., CHEN, G. H., TOEWS, G. B., COX, G. M., PERFECT, J. R., & HUFFNAGLE, G. B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761-1771, 2004.

O'MEARA, T. R., NORTON, D., PRICE, M. S., HAY, C., CLEMENTS, M. F., NICHOLS, C. B., & ALSPAUGH, J. A. Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and protein kinase A regulates capsule. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 2, p. e1000776, 2010.

OST, K. S., O'MEARA, T. R., HUDA, N., ESHER, S. K., & ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* alkaline response pathway: identification of a novel rim pathway activator. **Plos genetics**, v. 11, n. 4, p. e1005159, 2015.

OSTERHOLZER, J. J., MILAM, J. E., CHEN, G. H., TOEWS, G. B., HUFFNAGLE, G. B., & OLSZEWSKI, M. A. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 9, p. 3749-3758, 2009.

OSTERHOLZER, J. J., SURANA, R., MILAM, J. E., MONTANO, G. T., CHEN, G. H., SONSTEIN, J., ... & OLSZEWSKI, M. A. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 3, p. 932-943, 2009.

PANACKAL, A. A., WUEST, S. C., LIN, Y. C., WU, T., ZHANG, N., KOSA, P., ... & HAGEN, F. Paradoxical immune responses in non-HIV cryptococcal meningitis. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 5, 2015.

PANCHANATHAN, R., LIU, H., & CHOUBEY, D. Hypoxia primes human normal prostate epithelial cells and cancer cell lines for the NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 28183, 2016.

PANTANOWITZ, L., OMAR, T., SONNENDECKER, H., & KARSTAEDT, A. S. Bone marrow cryptococcal infection in the acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of Infection**, v. 41, n. 1, p. 92-94, 2000.

PASQUAROLI, S., ZANDRI, G., VIGNAROLI, C., VUOTTO, C., DONELLI, G., & BIAVASCO, F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1812-1817, 2013.

PATERSON, D. L., SINGH, N., GAYOWSKI, T., & MARINO, I. R. Pulmonary nodules in liver transplant recipients. **Medicine**, v. 77, n. 1, p. 50-58, 1998.

PERICOLINI, E., GABRIELLI, E., CENCI, E., DE JESUS, M., BISTONI, F., CASADEVALL, A., & VECCHIARELLI, A. Involvement of glycoreceptors in galactoxylomannan-induced T cell death. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 10, p. 6003-6010, 2009.

PETROVSKA, I., NÜSKE, E., MUNDER, M. C., KULASEGARAN, G., MALINOVSKA, L., KROSCHWALD, S., ... & ALBERTI, S. Filament formation by metabolic enzymes is a specific adaptation to an advanced state of cellular starvation. **Elife**, v. 3, p. e02409, 2014.

PIETRELLA, D., CORBUCCI, C., PERITO, S., BISTONI, G., & VECCHIARELLI, A. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. **Infection and immunity**, v. 73, n. 2, p. 820-827, 2005.

PINTO, D., ALMEIDA, V., ALMEIDA SANTOS, M., & CHAMBEL, L. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. **Journal of applied microbiology**, v. 110, n. 6, p. 1601-1611, 2011.

PINTO, D., SANTOS, M. A., & CHAMBEL, L. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. **Critical reviews in microbiology**, v. 41, n. 1, p. 61-76, 2015.

PIROFSKI, L. A., & CASADEVALL, A. Immune-mediated damage completes the parabola: *Cryptococcus neoformans* pathogenesis can reflect the outcome of a weak or strong immune response. **MBio**, v. 8, n. 6, p. e02063-17, 2017.

POSTBERG, J.; Forcob, S., Chang, W. J., & Lipps, H. J. The evolutionary history of histone H3 suggests a deep eukaryotic root of chromatin modifying mechanisms. **BMC evolutionary biology**, v. 10, n. 1, p. 259, 2010.

PRICE, M. S., NICHOLS, C. B., & ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* Rho-GDP dissociation inhibitor mediates intracellular survival and virulence. **Infection and immunity**, v. 76, n. 12, p. 5729-5737, 2008.

QIU, Y., DAVIS, M. J., DAYRIT, J. K., HADD, Z., MEISTER, D. L., OSTERHOLZER, J. J., ... & OLSZEWSKI, M. A. Immune modulation mediated by cryptococcal laccase

promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47853, 2012.

QIU, Y., ZELTZER, S., ZHANG, Y., WANG, F., CHEN, G. H., DAYRIT, J., ... & STANDIFORD, T. J. Early induction of CCL7 downstream of TLR9 signaling promotes the development of robust immunity to cryptococcal infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 8, p. 3940-3948, 2012.

QUALLS, J. E., & MURRAY, P. J. Immunometabolism within the tuberculosis granuloma: amino acids, hypoxia, and cellular respiration. In: **Seminars in immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, 2016. p. 139-152.

RAHMAN, I., SHAHAMAT, M., KIRCHMAN, P. A., RUSSEK-COHEN, E., & COLWELL, R. R. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 10, p. 3573-3578, 1994.

RAJASINGHAM, R., SMITH, R. M., PARK, B. J., JARVIS, J. N., GOVENDER, N. P., CHILLER, T. M., ... & BOULWARE, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, 2017.

RATH, M., MÜLLER, I., KROPF, P., CLOSS, E. I., & MUNDER, M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 532, 2014.

RIBACK, J. A., KATANSKI, C. D., KEAR-SCOTT, J. L., PILIPENKO, E. V., ROJEK, A. E., SOSNICK, T. R., & DRUMMOND, D. A. Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 1028-1040. e19, 2017.

RICHTER, J., FRANKEN, G., HOLTFRETER, M. C., WALTER, S., LABISCH, A., & MEHLHORN, H. Clinical implications of a gradual dormancy concept in malaria. **Parasitology research**, v. 115, n. 6, p. 2139-2148, 2016.

RIZZO, J., ALBUQUERQUE, P. C., WOLF, J. M., NASCIMENTO, R., PEREIRA, M. D., NOSANCHUK, J. D., & RODRIGUES, M. L. Analysis of multiple components involved in the interaction between *Cryptococcus neoformans* and *Acanthamoeba castellanii*. **Fungal biology**, v. 121, n. 6-7, p. 602-614, 2017.

ROBERT, V. A., & CASADEVALL, A. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 10, p. 1623-1626, 2009.  
ROBINSON, M. D., MCCARTHY, D. J., & SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.

ROCHA, J. D., NASCIMENTO, M. T., DECOTE-RICARDO, D., CÔRTE-REAL, S., MORROT, A., HEISE, N., ... & SARAIVA, E. M. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. **Scientific reports**, v. 5, p. 8008, 2015.



RODRIGUES, J., FONSECA, F. L., SCHNEIDER, R. O., GODINHO, R. M. D. C., FIRACATIVE, C., MASZEWSKA, K., ... & VAINSTEIN, M. H. Pathogenic diversity amongst serotype C VGIII and VGIV *Cryptococcus gattii* isolates. **Scientific reports**, v. 5, p. 11717, 2015.

RODRIGUES, M. L., NAKAYASU, E. S., OLIVEIRA, D. L., NIMRICHTER, L., NOSANCHUK, J. D., ALMEIDA, I. C., & CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

RODRIGUES, M. L. Neglected disease, neglected populations: the fight against *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, 2018.

ROILIDES, E., DIMITRIADOU-GEORGIADOU, A., SEIN, T., KADILTSOGLU, I., AND WALSH, T.J. Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 5999–6003, 1998.

ROLLINS, M., HUARD, S., MORETTIN, A., TAKUSKI, J., PHAM, T. T., FULLERTON, M. D., ... & BAETZ, K. Lysine acetyltransferase NuA4 and acetyl-CoA regulate glucose-deprived stress granule formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS genetics**, v. 13, n. 2, p. e1006626, 2017.

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

ROUSSEY, J. A., VIGLIANTI, S. P., TEITZ-TENNENBAUM, S., OLSZEWSKI, M. A., & OSTERHOLZER, J. J. Anti-PD-1 Antibody Treatment Promotes Clearance of Persistent Cryptococcal Lung Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 10, p. 3535-3546, 2017.

SABIITI, W., MAY, R. C., & PURSALL, E. R. Experimental models of cryptococcosis. **International journal of microbiology**, 2012.

SAGOT, I., & LAPORTE, D. The cell biology of quiescent yeast—a diversity of individual scenarios. **J Cell Sci**, v. 132, n. 1, p. jcs213025, 2019.

SAHA, D. C., GOLDMAN, D. L., SHAO, X., CASADEVALL, A., HUSAIN, S., LIMAYE, A. P., ... & SINGH, N. Serologic evidence for reactivation of cryptococcosis in solid-organ transplant recipients. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 12, p. 1550-1554, 2007.

SAÏD-SADIER, N., PADILLA, E., LANGSLEY, G., & OJCIUS, D. M. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. **PLoS one**, v. 5, n. 4, 2010.

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

SALMA, M., ROUSSEAUX, S., SEQUEIRA-LE GRAND, A., DIVOL, B., & ALEXANDRE, H. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77600, 2013.

SALYER, W. R., SALYER, D. C., & BAKER, R. D. Primary complex of *Cryptococcus* and pulmonary lymph nodes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 130, n. 1, p. 74-77, 1974.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J., PADILLA, A., WANG, W., ORR, D., & TARLETON, R. L. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **Elife**, v. 7, p. e34039, 2018.

SARAVANA, R., BASU, D., CHANDRAKUMAR, S., LONGKUMER, B. S., & SWAMINATHAN, R. P. Bone marrow cryptococcosis: a case report. **The Malaysian journal of pathology**, v. 25, n. 1, p. 69-72, 2003.

SATO, K., YAMAMOTO, H., NOMURA, T., MATSUMOTO, I., MIYASAKA, T., ZONG, T., ... & KAWAKAMI, K. *Cryptococcus neoformans* infection in mice lacking type I interferon signaling leads to increased fungal clearance and IL-4-dependent mucin production in the lungs. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138291, 2015.

SEBASTIAN, N. T., ZAIKOS, T. D., TERRY, V., TASCHUK, F., MCNAMARA, L. A., ONAFUWA-NUGA, A., ... & MARKOWITZ, N. CD4 is expressed on a heterogeneous subset of hematopoietic progenitors, which persistently harbor CXCR4 and CCR5-tropic HIV proviral genomes in vivo. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 7, p. e1006509, 2017.

SELENICA, M. L. B., REID, P., PENA, G., ALVAREZ, J., HUNT, J. B., NASH, K. R., ... & LEE, D. C. Adeno associated viral-mediated intraosseous labeling of bone marrow derived cells for CNS tracking. **Journal of immunological methods**, v. 432, p. 51-56, 2016.

SENOH, M., GHOSH-BANERJEE, J., RAMAMURTHY, T., HAMABATA, T., KURAKAWA, T., TAKEDA, M., ... & TAKEDA, Y. Conversion of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to the culturable state by co-culture with eukaryotic cells. **Microbiology and immunology**, v. 54, n. 9, p. 502-507, 2010.

SERPAGGI, V., REMIZE, F., RECORBET, G., GAUDOT-DUMAS, E., SEQUEIRA-LE GRAND, A., & ALEXANDRE, H. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. **Food microbiology**, v. 30, n. 2, p. 438-447, 2012.

SERSHEN, C. L., PLIMPTON, S. J., & MAY, E. E. Oxygen modulates the effectiveness of granuloma mediated host response to mycobacterium tuberculosis: a multiscale computational biology approach. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 6, 2016.

SHAH, S. I., BUI, H., VELASCO, N., & RUNGTA, S. Incidental finding of cryptococcus on prostate biopsy for prostate adenocarcinoma following cardiac transplant: case report and review of the literature. **The American journal of case reports**, v. 18, p. 1171, 2017.

SHANER, N. C., STEINBACH, P. A., & TSIEN, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. **Nature methods**, v. 2, n. 12, p. 905, 2005.

SHAO, X., MEDNICK, A., ALVAREZ, M., VAN ROOIJEN, N., CASADEVALL, A., & GOLDMAN, D. L. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3244-3251, 2005.

SHAO, X., MEDNICK, A., ALVAREZ, M., VAN ROOIJEN, N., CASADEVALL, A., & GOLDMAN, D. L. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3244-3251, 2005.

SHIBUYA, K., HIRATA, A., OMUTA, J., SUGAMATA, M., KATORI, S., SAITO, N., ... & MITSUDA, A. Granuloma and cryptococcosis. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 11, n. 3, p. 115-122, 2005.

SHLEEVA, M., MUKAMOLOVA, G. V., YOUNG, M., WILLIAMS, H. D., & KAPRELYANTS, A. S. Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. **Microbiology**, v. 150, n. 6, p. 1687-1697, 2004.

SHOHAM, S., HUANG, C., CHEN, J. M., GOLENBOCK, D. T., & LEVITZ, S. M. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- $\alpha$  release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **The journal of immunology**, v. 166, n. 7, p. 4620-4626, 2001.

SHOURIAN, M., & QURESHI, S. T. Resistance and tolerance to cryptococcal infection: an intricate balance that controls the development of disease. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 66, 2019.

SHOURIAN, M., RALPH, B., ANGERS, I., SHEPPARD, D. C., & QURESHI, S. T. Contribution of IL-1RI Signaling to Protection against *Cryptococcus neoformans* 52D in a Mouse Model of Infection. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1987, 2018.

SIEGEMUND, S., & ALBER, G. *Cryptococcus neoformans* activates bone marrow-derived conventional dendritic cells rather than plasmacytoid dendritic cells and down-regulates macrophages. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 417-427, 2008.

SINGH, A., PANTING, R. J., VARMA, A., SAIJO, T., WALDRON, K. J., JONG, A., ... & KWON-CHUNG, K. J. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013.

SIQUEIRA, I. M., DE CASTRO, R. J. A., DE MIRANDA LEONHARDT, L. C., JERÔNIMO, M. S., SOARES, A. C., RAIOL, T., ... & BOCCA, A. L. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005461, 2017.

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

SNODGRASS, R. G., BOß, M., ZEZINA, E., WEIGERT, A., DEHNE, N., FLEMING, I., ... & NAMGALADZE, D. Hypoxia potentiates palmitate-induced pro-inflammatory activation of primary human macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 1, p. 413-424, 2016.

STAIB, F., SEIBOLD, M., & L'AGE, M. Persistence of *Cryptococcus neoformans* in seminal fluid and urine under itraconazole treatment. The urogenital tract (prostate) as a niche for *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**, v. 33, n. 7-8, p. 369-373, 1990.

STAIB, F., SEIBOLD, M., CAGE, M., HEISE, W., SKORDE, J., GROSSE, G., ... & BAUER, G. *Cryptococcus neoformans* in the Seminal Fluid of an AIDS Patient. A Contribution to the Clinical Course of Cryptococcosis: *Cryptococcus neoformans* im Sperma eines AIDS-Patienten. Ein Beitrag zum Mischigen Verlauf der Cryptococcosis. **Mycoses**, v. 32, n. 4, p. 171-180, 1989.

STEENBERGEN, J. N., SHUMAN, H. A., & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15245-15250, 2001.

STEINERT, M., EMÖDY, L., AMANN, R., & HACKER, J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 5, p. 2047-2053, 1997.

SWEENEY, D. A., CASERTA, M. T., KORONES, D. N., CASADEVALL, A., & GOLDMAN, D. L. A ten-year-old boy with a pulmonary nodule secondary to *Cryptococcus neoformans*: case report and review of the literature. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 22, n. 12, p. 1089-1093, 2003.

SWISHER, K. D., & PARKER, R. Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10006, 2010.

TAVARES, A. H., BÜRCEL, P. H., & BOCCA, A. L. Turning up the heat: inflammasome activation by fungal pathogens. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 7, 2015.

TEAM, R. Core. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.

TENFORDE, M. W., SCRIVEN, J. E., HARRISON, T. S., & JARVIS, J. N. Immune correlates of HIV-associated cryptococcal meningitis. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 3, 2017.

TENOR, J. L., OEHLERS, S. H., YANG, J. L., TOBIN, D. M., & PERFECT, J. R. Live imaging of host-parasite interactions in a zebrafish infection model reveals cryptococcal determinants of virulence and central nervous system invasion. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e01425-15, 2015.

TOBIN, D. M., MAY, R. C., & WHEELER, R. T. Zebrafish: a see-through host and a fluorescent toolbox to probe host–pathogen interaction. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002349, 2012.

TORMIN, A., LI, O., BRUNE, J. C., WALSH, S., SCHÜTZ, B., EHINGER, M., ... & SCHEDING, S. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5067-5077, 2011.

TORNACK, J., REECE, S. T., BAUER, W. M., VOGELZANG, A., BANDERMANN, S., ZEDLER, U. ... & MELCHERS, F. Human and mouse hematopoietic stem cells are a depot for dormant *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS one**, v. 12, n. 1, p. e0169119, 2017.

TRAPNELL, C., PACHTER, L., & SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics** 25, 1105e1111. 2009.

TRAXLER, M. F., SUMMERS, S. M., NGUYEN, H. T., ZACHARIA, V. M., HIGHTOWER, G. A., SMITH, J. T., & CONWAY, T. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 5, p. 1128-1148, 2008.

TUCKER, S. C., & CASADEVALL, A. 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**, v. 99, n. 5, p. 3165-3170, 2002.

UPADHYA, R., LAM, W. C., MAYBRUCK, B. T., DONLIN, M. J., CHANG, A. L., KAYODE, S., ... & LODGE, J. K. A fluorogenic *C. neoformans* reporter strain with a robust expression of m-cherry expressed from a safe haven site in the genome. **Fungal Genetics and Biology**, v. 108, p. 13-25, 2017.

URIBE-QUEROL, E., & ROSALES, C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1368, 2017.

VALDOR, R., & MACIAN, F. Induction and stability of the anergic phenotype in T cells. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2013. p. 313-320.

VAN DUIN, D., CASADEVALL, A., & NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, 2002.

VANHERP, L., RISTANI, A., POELMANS, J., HILLEN, A., LAGROU, K., JANBON, G., ... & VELDE, G. V. Sensitive bioluminescence imaging of fungal dissemination to the brain in mouse models of cryptococcosis. **Disease models & mechanisms**, v. 12, n. 6, p. dmm039123, 2019.

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

VECCHIARELLI, A., RETINI, C., PIETRELLA, D., MONARI, C., TASCINI, C., BECCARI, T., & KOZEL, T. R. Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. **Infection and immunity**, v. 63, n. 8, p. 2919-2923, 1995.

VILLENA, S. N., PINHEIRO, R. O., PINHEIRO, C. S., NUNES, M. P., TAKIYA, C. M., DOSREIS, G. A., ... & FREIRE-DE-LIMA, C. G. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1274-1285, 2008.

VOELZ, K., JOHNSTON, S. A., RUTHERFORD, J. C., & MAY, R. C. Automated analysis of cryptococcal macrophage parasitism using GFP-tagged cryptococci. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e15968, 2010.

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

VOGEL, H., ALTINCICEK, B., GLÖCKNER, G., & VILCINSKAS, A. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 308, 2011.

VOSKUIL, M. I., SCHNAPPINGER, D., VISCONTI, K. C., HARRELL, M. I., DOLGANOV, G. M., SHERMAN, D. R., & SCHOOLNIK, G. K. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 5, p. 705-713, 2003.

VU, K., THAM, R., UHRIG, J. P., THOMPSON, G. R., POMBEJRA, S. N., JAMKLANG, M., ... & GELLI, A. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e01101-14, 2014.

WAGER, C. M. L., & WORMLEY JR, F. L. Is development of a vaccine against *Cryptococcus neoformans* feasible?. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004843, 2015.

WAGER, C. M. L., HOLE, C. R., CAMPUZANO, A., CASTRO-LOPEZ, N., CAI, H., VAN DYKE, M. C. C., ... & WORMLEY JR, F. L. IFN- $\gamma$  immune priming of macrophages in vivo induces prolonged STAT1 binding and protection against *Cryptococcus neoformans*. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 10, p. e1007358, 2018.

WAGER, C. M. L., HOLE, C. R., WOZNIAK, K. L., OLSZEWSKI, M. A., MUELLER, M., & WORMLEY, F. L. STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 83, n. 12, p. 4513-4527, 2015.

WAGER, C. M., HOLE, C. R., WOZNIAK, K. L., & WORMLEY JR, F. L. *Cryptococcus* and phagocytes: complex interactions that influence disease outcome. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 105, 2016.

WALSH, N. M., BOTTS, M. R., MCDERMOTT, A. J., ORTIZ, S. C., WÜTHRICH, M., KLEIN, B., & HULL, C. M. Infectious particle identity determines dissemination and disease outcome for the inhaled human fungal pathogen *Cryptococcus*. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 6, 2019.

WANG, J. P., LEE, C. K., AKALIN, A., FINBERG, R. W., & LEVITZ, S. M. Contributions of the MyD88-dependent receptors IL-18R, IL-1R, and TLR9 to host defenses following pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. **PloS one**, v. 6, n. 10, 2011.

WANG, J., ZENG, Y., LUO, W., XIE, X., & LI, S. The role of *Cryptococcus* in the immune system of pulmonary cryptococcosis patients. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0144427, 2015.

WANG, Y., & CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 10, p. 3864-3866, 1994.

WANG, Y., AISEN, P., & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, 1995.

WATERMAN, S. R., HACHAM, M., PANEPINTO, J., HU, G., SHIN, S., & WILLIAMSON, P. R. Cell wall targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. **Infection and immunity**, v. 75, n. 2, p. 714-722, 2007.

WATERMAN, S. R., PARK, Y. D., RAJA, M., QIU, J., HAMMOUD, D. A., O'HALLORAN, T. V., & WILLIAMSON, P. R. Role of CTR4 in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 3, n. 5, p. e00285-12, 2012.

WAWROCKI, S., & DRUSZCZYNSKA, M. Inflammasomes in *Mycobacterium tuberculosis*-driven immunity. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2017, 2017.

WEINBERG, J. B., MISUKONIS, M. A., SHAMI, P. J., MASON, S. N., SAULS, D. L., DITTMAN, W. A., ... & BACHUS, K. E. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. 1995.

WILLIAMSON, P. R. Post-infectious inflammatory response syndrome (PIIRS): Dissociation of T-cell-macrophage signaling in previously healthy individuals with cryptococcal fungal meningoencephalitis. **Macrophage**, v. 2, 2015.

WILSON, H. M. SOCS proteins in macrophage polarization and function. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 357, 2014.

WOOD, L., & MIEDZINSKI, L. Skeletal cryptococcosis: case report and review of the literature. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 125-132, 1996.

WORMLEY, F. L., PERFECT, J. R., STEELE, C., & COX, G. M. Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing *Cryptococcus neoformans* strain. **Infection and immunity**, v. 75, n. 3, p. 1453-1462, 2007.

WOZNIAK, K. Interactions of cryptococcus with dendritic cells. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 36, 2018.

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

WOZNIAK, K. L., HARDISON, S. E., KOLLS, J. K., & WORMLEY JR, F. L. Role of IL-17A on resolution of pulmonary *C. neoformans* infection. **PLoS one**, v. 6, n. 2, p. e17204, 2011.

WOZNIAK, K. L., KOLLS, J. K., & WORMLEY, F. L. Depletion of neutrophils in a protective model of pulmonary cryptococcosis results in increased IL-17A production by gamma/delta T cells. **BMC immunology**, v. 13, n. 1, p. 65, 2012.

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

XIAO, G., MIYAZATO, A., INDEN, K., NAKAMURA, K., SHIRATORI, K., NAKAGAWA, K., ... & KAWAKAMI, K. *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide synthesis caused by CpG-oligodeoxynucleotide-stimulated macrophages in a fashion independent of capsular polysaccharides. **Microbiology and immunology**, v. 52, n. 3, p. 171-179, 2008.

XU, H. S., ROBERTS, N., SINGLETON, F. L., ATTWELL, R. W., GRIMES, D. J., & COLWELL, R. R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio*



*cholerae* in the estuarine and marine environment. **Microbial ecology**, v. 8, n. 4, p. 313-323, 1982.

XU, Q., CHOKSI, S., QU, J., JANG, J., CHOE, M., BANFI, B., ... & LIU, Z. G. NADPH oxidases are essential for macrophage differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 38, p. 20030-20041, 2016.

YANG, X., SHEN, Y., GARRE, E., HAO, X., KRUMLINDE, D., CVIJOVIĆ, M., ... & SUNNERHAGEN, P. Stress granule-defective mutants deregulate stress responsive transcripts. **PLoS genetics**, v. 10, n. 11, p. e1004763, 2014.

YAUCH, L. E., MANSOUR, M. K., SHOHAM, S., ROTTMAN, J. B., & LEVITZ, S. M. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* *in vivo*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 5373-5382, 2004.

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

ZARAGOZA, O., ALVAREZ, M., TELZAK, A., RIVERA, J., & CASADEVALL, A. The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. **Infection and immunity**, v. 75, n. 6, p. 2729-2739, 2007.

Zaragoza, O., Chrisman, C. J., Castelli, M. V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. L., & Casadevall, A. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043-2057, 2008.

ZARAGOZA, O., CHRISMAN, C. J., CASTELLI, M. V., FRASES, S., CUENCA-ESTRELLA, M., RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L., & CASADEVALL, A. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043-2057, 2008.

ZHANG, T., KAWAKAMI, K., QURESHI, M. H., OKAMURA, H., KURIMOTO, M., & SAITO, A. Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3594-3599, 1997.

ZHANG, Y., WANG, F., TOMPKINS, K. C., MCNAMARA, A., JAIN, A. V., MOORE, B. B., ... & OLSZEWSKI, M. A. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. **The American journal of pathology**, v. 175, n. 6, p. 2489-2500, 2009.

## 8. APÊNDICE I – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO (2016-2019)

### Artigos publicados em revistas científicas

1. CHIABAI, M. J., ALMEIDA, J. F., DE AZEVEDO, M. G. D., FERNANDES, S. S., PEREIRA, V. B., **CASTRO, R. J. A.**, ... & BOCCA, A. L. Mucosal delivery of *Lactococcus lactis* carrying an anti-TNF scFv expression vector ameliorates experimental colitis in mice. **BMC biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 38, 2019.
2. JÚNIOR, P. H. D. H. V., SIMON, K. S., **CASTRO, R. J. A.**, COELHO, L. C., ERAZO, F. A. H., DE SOUZA, A. C. B., ... & MORTARI, M. R. Peptides ToAP3 and ToAP4 decrease release of inflammatory cytokines through TLR-4 blocking. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109152, 2019.
3. BASSO, A. M. M., **CASTRO, R. J. A.**, DE CASTRO, T. B., GUIMARÃES, H. I., POLEZ, V. L. P., CARBONERO, E. R., ... & BOCCA, A. L. Immunomodulatory activity of  $\beta$ -glucan-containing exopolysaccharides from *Auricularia auricular* in phagocytes and mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology**, 2019.
4. **CASTRO, R. J. A.**, SIQUEIRA, I. M., JERÔNIMO, M. S., BASSO, A. M. M., VELOSO JUNIOR, P. H. D. H., MAGALHÃES, K. G., ... & BOCCA, A. L. The Major chromoblastomycosis etiologic agent *Fonsecaea pedrosoi* activates the nlrP3 inflammasome. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1572, 2017.
5. VICENTE, V. A., WEISS, V. A., BOMBASSARO, A., MORENO, L. F., COSTA, F. F., RAITTZ, R. T., ... & **CASTRO, R. J. A.**, ... & DE HOOG, S. Comparative genomics of sibling species of *Fonsecaea* associated with human chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1924, 2017.
6. SIQUEIRA, I. M., **CASTRO, R. J. A.**, DE MIRANDA LEONHARDT, L. C., JERÔNIMO, M. S., SOARES, A. C., RAIOL, T., ... & BOCCA, A. L. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005461, 2017.

### Apresentações de Trabalho

1. **CASTRO, R. J. A.**; SIQUEIRA, I. M. ; JERÔNIMO, M. S.; BASSO, A. M. M.; VELOSO JUNIOR, P. H. de H.; MAGALHÃES, K. G.; LEONHARDT, L. C. M.; TAVARES, A. H. P.; BOCCA, A. L. Activation of the NLRP3 inflammasome by different *Fonsecaea pedrosoi* propagules. Em: XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology, Campos do Jordão, Brasil, 2016. Apresentação Oral.

### Resumos publicados em anais de Congressos

1. **CASTRO, R. J. A.**; REGO, M. T. A. M.; SILVA, F. B. A.; BOCCA, A. L.; MATOS, L. F. Construction of *Cryptococcus neoformans* reporter strains containing GFP or mCherry fluorescent proteins for pathogen-host interaction studies. In: 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Amsterdã, Holanda, 2018.
2. **CASTRO, R. J. A.**; BASSO, A. M. M.; VELOSO JUNIOR, P. H. de H.; GUIMARAES, H. I.; TAVARES, A. H. P.; Bocca, A. L. Activation of the NLRP3 inflammasome by polysaccharides extracted from submerged culture of *Ganoderma lucidum*. In: IX International Symposium on Mushrooms, São José dos Campos, Brasil, 2017. Resumo expandido.
3. **CASTRO, R. J. A.**; SIQUEIRA, I. M. ; JERÔNIMO, M. S.; BASSO, A. M. M.; VELOSO JUNIOR, P. H. de H.; MAGALHÃES, K. G.; LEONHARDT, L. C. M.; TAVARES, A. H. P.; BOCCA, A. L. Activation of the NLRP3 inflammasome by different *Fonsecaea pedrosoi* propagules. Em: XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology, Campos do Jordão, Brasil, 2016. Apresentação Oral.

### Premiações

O pôster intitulado “O papel dos macrófagos na dormência de *Cryptococcus neoformans*” foi premiado como um dos melhores trabalhos apresentados no IX Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular (2019) da Universidade de Brasília.