

STEFÂNIA DE OLIVEIRA FRAZÃO

AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE EXOCITOSE NÃO-LÍTICA EM  
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans*.

Orientadora: Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola

Coorientador: André Moraes Nicola

Brasília,

Fevereiro de 2018

# Avaliação da ocorrência de exocitose não-lítica em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*

STEFÂNIA DE OLIVEIRA FRAZÃO

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

Orientadora: Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola

Coorientador: André Moraes Nicola

Brasília,

Fevereiro de 2018

## COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Stefânia de Oliveira Frazão

Avaliação da ocorrência de exocitose não-lítica em isolados clínicos de  
*Cryptococcus neoformans*

Universidade de Brasília

Medicina Tropical: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

Data da defesa da dissertação

07 de fevereiro de 2018

Banca Examinadora

Profa. Dr<sup>a</sup> Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola - Universidade de Brasília (Presidente)

Dr<sup>a</sup>. Calliandra Maria de Souza Silva – Universidade de Brasília (Banca Interna)

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

Dr<sup>a</sup>. Fabiana Brandão Alves Silva – Universidade de Brasília (Suplente)

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu Deus, por ser meu guia e fortaleza e pelas oportunidades que tem colocado em minha vida. Obrigada por eu ter chegado até aqui.

Mamãe e Papai. Me ensinaram a determinação e a ser forte, também por todo o amor e o carinho, mesmo o papai com esse jeitinho Paraibano de ser. Hahaha. Aprendi a colocar amor e carinho em tudo que eu faço, até nas coisas simples. Tem dado super certo, e as coisas estão ficando melhores. É tão maravilhoso o cuidado de vocês. Quantas vezes no desespero eu só queria correr pro cantinho de vocês para vê-los conversando coisas aleatórias e sentir aquele aconchego de lar que vocês sabem dar mais que ninguém. Obrigada por tudo que fazem por mim.

Príncipee! Tenho muito a te agradecer, obrigada pelo apoio emocional, por aceitar que eu sou chorona e esperar eu desidratar primeiro pra depois contar o que estava sentindo. Obrigada pelos abraços que me devolviam a calma. Obrigada pelas madrugadas que dormiu no sofá do laboratório para que eu não ficasse sozinha. Pelas horas e horas me ajudando contar macrófagos. Por entender que em vários momentos eu não pude te dar atenção porque tinha que estudar, escrever, fazer trabalhos... enfim. Obrigada por ser assim mega companheiro e por todo amor que me dedicas.

Patty, melhor orientadora, obrigada por antes de ser orientadora, ser amiga. Amo trabalhar com você. Acho que as pessoas passam em nossa vida para ser exemplo ou de como ser ou de como não ser. Você é meu exemplo de como ser profissional. Quando eu tiver meu emprego, quero ser essa profissional que faz seu serviço com brilho nos olhos, achando as coisas fantásticas. Você consegue misturar todo o peso de ser responsável com a doçura de ser mãe, do cuidado.

André, obrigada pela oportunidade que me deu lá atrás quando eu ainda era uma graduanda, por cobrar resultados sem dar as coisas de mão beijada. Cresci muito nesses anos. Obrigada também pelas conversas que me ajudaram a tomar decisões importantes.

Querida Lenise, obrigada pela amizade. Confiei cegamente no seu trabalho e você não me decepcionou. Melhor companheira de experimento. Você me ajudou muito nessa reta final. Aplauso de pé para você.

Meninas minhas (Sol, Yarinha, Lalá, Lorrany, Andressa e Thais), quero agradecer pelo carinho, por terem torcido por mim, pelo apoio moral e por trazerem alegria a minha vida em todos os momentos. Obrigada pelos abraços de urso.

Meninos (Andrézinho, Fabian e Jhones), obrigada pela amizade e pelas boas risadas que demos juntos. Dhyonnyes, obrigada também por todas as vezes que me salvou desligando microscópio, tirando placas da estufa, me emprestando ponteiras, meios ou tirando dúvidas.

Hugo, obrigada pelas células J774. E Calli, obrigada pelas consultorias de como cuidar delas.

Aos colegas do Lab (MoA e Genética), obrigada pelo coleguismo de estarem sempre que possível ajudando uns ao outro e tornando o ambiente um pouco melhor para se trabalhar.

Professora Ildinete, obrigada por me acolher no laboratório e também por fornecer meios para que eu pudesse realizar o meu trabalho.

A todos os professores que passaram em minha vida nessa etapa, todos contribuíram para o meu crescimento, obrigada pelos ensinamentos.

Aos professores que compõe a banca por terem disponibilizado seus tempos para avaliar esse trabalho.

A FAP-DF pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para o meu crescimento acadêmico e para que esse trabalho acontecesse.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do Processo de Infecção <i>C. gatti</i> (esquerda) X <i>C. neoformans</i> (direita). .....	17
Figura 2: PRRs presentes nas células imunes do hospedeiro e seus respectivos PAMPs fúngicos.....	21
Figura 3: Ativação de macrófagos.....	23
Figura 4: Esquema de parasitismo do <i>Cryptococcus neoformans</i> em macrófago. ....	24
Figura 5: Esquema dos possíveis desfechos da interação macrófago-fungo que foram avaliados nos experimentos de videomicroscopia.....	34
Figura 6: Evento de exocitose não-lítica completa de células de <i>C. neoformans</i> após sua internalização por macrófagos J774. ....	37
Figura 7: Evento de exocitose não-lítica parcial de células de <i>C. neoformans</i> após sua internalização por macrófagos J774. ....	37
Figura 8: : Evento de exocitose lítica de células de <i>C. neoformans</i> após sua internalização por macrófagos J774. ....	38
Figura 14: Correlação entre a melanização dos isolados e o percentual de exocitose não- lítica.....	44
Figura 15: Correlação entre a espessura de cápsulas dos isolados e a exocitose não-lítica. .....	45
Figura 16: Correlação entre a taxa de exocitose não-lítica e a sobrevivência dos isolados em macrófagos. ....	46
Figura 17: Correlação entre o crescimento do <i>C. neoformans</i> e exocitose não-lítica. ....	46

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1: Percentual de Exocitose dos diferentes isolados. ....</b>	<b>39</b>
<b>Tabela 2: Avaliação da divisão celular de macrófagos após a interação com os diferentes isolados de C. neoformans. ....</b>	<b>42</b>

## **LISTA DE ABREVIACÕES.**

AIDS : Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

App1: Proteína Antifagocítica 1

°C: Graus Celsius

DAMP: Padrões Moleculares Associados ao Perigo

DF: Distrito Federal

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

g: Grama

GXM: Glucoronoxilomanana

GXMGal: Glucoranogalactoxilomanana

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HSP70: Heat shock Protein 70

IL: Interleucina

INF- $\gamma$ : Interferon Gama

iNOS: Oxido Nítrico Sintase induzível

L-DOPA: 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine

M1: Macrófago da via Clássica

M2: Macrófago da via Alternativa

mM: milimolar

$\mu$ M: micromolar

mg: miligrama

mL: Mililitro

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

MOPS: Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico

MP: Manoproteína

NK: Células Natural Killer

NO: Oxido Nítrico

PAMP: Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PBS: Tampão Salina Fosfato

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

PRR: Receptor de Reconhecimento de Padrão

RCB: Rede Criptococose Brasil

ROS: Espécies reativas de Oxigênio

RPM: Rotações Por Minuto

SNC: Sistema Nervoso Central

TLR: Receptores do tipo Toll

UCB: Universidade Católica de Brasília

UnB: Universidade de Brasília

%: por cento

## **ORGÃOS FINANCIADORES**

Projeto financiado pelo Edital Auxílio à Pesquisa DPP-UnB Nº 02/2017 - Auxílio Financeiro a Estudantes para o Desenvolvimento de Pesquisas de Natureza Científica

FAP-DF -bolsa

# SUMÁRIO

RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUÇÃO.....	14
Criptococose .....	14
Cryptococcus spp.....	15
Breve histórico.....	15
Taxonomia e nomenclatura .....	15
Biologia .....	16
Forma de Infecção .....	17
Fatores de Virulência.....	18
Cápsula .....	18
Crescimento a 37°C .....	19
Produção de melanina.....	19
Produção de enzimas hidrolíticas .....	20
Interação com o Hospedeiro .....	21
Imunidade .....	21
Macrófagos .....	22
Exocitose não-lítica .....	25
Rede Criptococose Brasil .....	27
OBJETIVOS.....	28
Geral .....	28
Objetivos Específicos: .....	28
METODOLOGIA.....	29
Meios de Cultura e Soluções .....	29
Meio Sabouraud.....	29
DMEM.....	29
Meio Mínimo.....	29
MOPS .....	30
PBS .....	30
Células .....	30
J774.A1.....	30
Células Fúngicas.....	31

Experimentos .....	31
Avaliação do tamanho das cápsulas dos isolados.....	31
Avaliação da exocitose não-lítica por videomicroscopia .....	32
Ensaio de melanina.....	32
Ensaio de sobrevivência dos isolados pós interação com macrófagos.....	33
Análise das imagens .....	33
Imagens de Cápsula .....	33
Análise dos Vídeos de Exocitose não-lítica .....	33
Análises estatísticas. ....	35
RESULTADOS .....	36
Eventos de exocitose durante a interação dos diferentes isolados de <i>C. neoformans</i> com macrófagos J774.....	36
Momento de Exocitose .....	40
Divisão celular de macrófagos que fizeram fagocitose .....	41
Transferência de fungos entre macrófagos .....	43
A produção de melanina afeta os percentuais de exocitose não-lítica dos isolados clínicos por macrófagos.....	43
Diâmetro da cápsula em meios indutores não interferem no percentual de exocitose não-lítica dos isolados clínicos .....	44
Melhor sobrevivência dos isolados clínicos pós interação com macrófagos podem levar a maior percentual de exocitose não-lítica .....	45
Correlação entre Crescimento do fungo e Exocitose não-lítica .....	46
DISCUSSÃO .....	47
CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica adquirida por inalação de propágulos de fungos do complexo *Cryptococcus neoformans* e do complexo *Cryptococcus gattii*. *C. neoformans* genotipo VNI é cosmopolita, e causa doença oportunista em indivíduos com imunossupressão, sendo importante causa de meningoencefalites e morte em indivíduos com AIDS. Esta micose apresenta altos índices de letalidade, que podem chegar até 55% mesmo na presença de terapia. Isso pode ser explicado pelo diagnóstico tardio, pela gravidade da infecção quando atinge o sistema nervoso central, principalmente na forma de meningoencefalite, e as dificuldades do tratamento. No ano de 2014 foram registrados 223.100 casos de criptococose, com 181.100 mortes. A África sub-saariana registrou 73% dos casos de criptococose. Na América Latina como um todo se estima 5.300 casos e 2.400 mortes por ano. O descaso observado pela dificuldade de aquisição de fármacos antifúngicos, a não-disponibilização de teste rápidos já existentes no mercado para diagnóstico da criptococose, a ausência de notificação obrigatória, mostram como a criptococose é negligenciada a nível da saúde pública. Vários fatores de virulência desses agentes já foram descritos e caracterizados, como a produção da complexa cápsula polissacarídica, de melanina, e a capacidade de crescer no interior de macrófagos. Além desses, há também fatores relacionados ao hospedeiro que serão importantes em determinar-se o resultado dessa interação, como a capacidade dos macrófagos de fagocitar ou eliminar o *Cryptococcus* spp. A relação fungo-hospedeiro é dinâmica e determina a sobrevivência do fungo, a contenção da infecção, a disseminação fúngica, os diferentes estágios de progressão da doença e a sua gravidade. A exocitose não-lítica é um mecanismo em que um microrganismo previamente fagocitando pode sair do interior do macrófago sem que haja ruptura da célula hospedeira, em um processo em que ambas células continuam vivas. Ainda não é totalmente claro se os benefícios desse processo são maiores para o hospedeiro ou para o patógeno. Nesse trabalho avaliamos por videomicroscopia o processo de exocitose não-lítica após a interação de macrófagos com oito isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e duas linhagens controle. Observamos diferentes percentuais de exocitose não-lítica entre as diferentes linhagens clínicas e que esse processo acontece continuamente durante as 24h de interação macrófago-fungo. Com a finalidade de avaliarmos a possível relação entre a expressão desses fatores de virulência por essas linhagens e a exocitose não-lítica correlacionamos esses resultados com a expressão de fatores de virulência *in vitro* por esses isolados, tais como a produção de melanina, o tamanho da cápsula, a sobrevivência do fungo após a interação com macrófagos murinos e o crescimento fúngico. Identificamos uma possível correlação entre a exocitose não-lítica e a produção de melanina pelo fungo e também com a capacidade do fungo em sobreviver a interação com macrófagos. Não observamos uma correlação entre o tamanho da cápsula em meio Sabouraud e a exocitose não-lítica. Pretendemos continuar esse estudo utilizando um número maior de linhagens e futuramente correlacionar esses dados com informações clínicas dos pacientes dos quais tais isolados foram obtidos, a fim de caracterizarmos melhor o perfil de isolados clínicos brasileiros desse fungo.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis acquired by inhalation of propagules of fungal species of the complex *Cryptococcus neoformans* and complex *Cryptococcus gattii*. *C. neoformans* VNI genotype is cosmopolitan, and cause opportunistic disease in individuals with immune suppression, being a major cause of meningoencephalitis and death in individuals with AIDS. This Mycosis present high mortality levels, reaching up to 55%, even with antifungal therapy (Park et al. 2009), This can be explained by the late diagnosis, the severity of the disease when it reaches the central nervous system causing meningoencephalitis, and by the difficulties of treatment. In the year 2014 there were 223,100 cases of cryptococcosis and 181,100 deaths. Sub-Saharan Africa holds 73% of the cases of cryptococcosis. In Latin America, it is estimated 5,300 cases and 2,400 deaths per year. This mycosis can be considered a neglected disease by the public health systems if we considered the poor attention dedicated to it, such is the struggle to acquire antifungal drugs, the low availability of rapid tests for diagnosis in health institutions regardless of an efficient test already in the market, and the absence of compulsory notification of cryptococcosis. Several virulence factors of these fungal agents have already been characterized, such as the production of a complex polysaccharide capsule, melanin, and their ability to grow inside macrophages. In addition to these, there are also factors related to the host to determine the results of their interaction, such as the ability of macrophages to phagocytize and kill *Cryptococcus* spp. The host-fungus relationship is dynamic and determines fungal survival, limitation of infection control, fungal dispersion, the different stages of disease progression and its severity. Non-lytic exocytosis is a mechanism in which microbes previously phagocytosed are released from macrophages without macrophage lysis, in which both cells continue alive. It is not completely clear if this process produces more benefits to the host or to the microbe. In this work, we evaluated non-lytic exocytosis by videomicroscopy of the interaction of macrophages with eight clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* and two control lineages. We observed different percentages of non-lytic exocytosis among the different clinical strains and that this process occurs along the whole 24h of fungal-macrophage interaction. To evaluate a possible relationship between the in vitro expression of virulence factors by these lineages and the non-lytic exocytosis we compared these results with the expression of virulence factors, such as melanin production, capsule size, fungal survival after macrophage interaction and fungal growth. We observed a possible correlation between non-lytic exocytosis and fungal melanin production and fungal survival after macrophage interaction. We did not observe any relationship between fungal capsule size in Sabouraud and non-lytic exocytosis. We intend to continue this analysis using a larger number of fungal isolates and in the future to correlated these data with clinical information of the patients from which such isolates were obtained, to better characterize the profile of Brazilian clinical isolates of *Cryptococcus* spp.

# INTRODUÇÃO

## Criptococose

É uma enfermidade cujos agentes etiológicos são fungos do gênero *Cryptococcus*. O espectro dessa doença varia desde inflamações cutâneas autolimitadas até infecções graves do sistema nervoso, que podem ser fatais. Dados mostram que, as duas espécies mais comumente associadas a doenças são o *C. neoformans* e o *C. gattii* (May et al. 2016).

A Criptococose está mundialmente distribuída, embora a maior porcentagem de casos se concentre na África subsaariana e em países subdesenvolvidos. Dados de 2014 mostram que são aproximadamente 223.100 casos de criptococose por ano, com 181.100 mortes. Na África subsaariana ocorreram 73% dos casos de criptococose. Na América Latina se estima 5.300 casos e 2.400 mortes por ano (Rajasingham et al. 2017). A estrutura para o diagnóstico e tratamento dessa doença em muitos países é limitada, e os pacientes passam muito tempo percorrendo hospitais sem ter um diagnóstico definitivo e quando o recebem a enfermidade já está em grau bastante avançado. Com isso o tratamento que já é difícil se torna ainda mais limitado, de forma que mesmo usando os medicamentos, que por sua vez são bastante tóxicos, acabam não alcançando os resultados desejados e o paciente pode vir a óbito (Coelho, Bocca, and Casadevall 2014).

*C. neoformans* e *C. gattii* produzem doenças com características próprias. Em sua maioria os pacientes sintomáticos infectados com *C. neoformans* apresentam alguma imunossupressão, geralmente devida à infecção pelo HIV (Speed and Dunt 1995). Nesse caso a doença geralmente evolui para complicações do sistema nervoso central como meningites e meningoencefalites (Srikanta, Santiago-Tirado, and Doering 2014). Por outro lado a doença causada pelo *C. gattii* é mais comum em pacientes aparentemente saudáveis e com boas condições imunológicas e danos pulmonares são mais comuns (Bielska and May 2016). Apesar de ser uma doença relativamente rara, testes sorológicos mostraram que a infecção pelo *Cryptococcus* é prevalente na população em geral (Goldman et al. 2001). Depois que o agente entra em contato com o hospedeiro ele é capaz de permanecer em latência por anos. E a hipótese mais aceita é que a infecção ocorra na infância e a doença só se desenvolva quando o hospedeiro apresente uma imunossupressão mais significativa (Goldman et al. 2001). Entre os sintomas mais frequentemente associados a infecção pelo *Cryptococcus* estão dor torácica, sudorese noturna, fadiga, emagrecimento, febre, tosse, vômito, cefaleia e rigidez de nuca (Bielska and May 2016).

# **Cryptococcus spp**

## ***Breve histórico***

Em 1894, Otto Busse e Abraham Buschke isolaram um fungo de uma infecção óssea de uma mulher e o descreveram como um tipo de *Saccharomyces*. Nesse mesmo ano Francesco Sanfelice também isolou um fungo de suco de pêssigo e o chamou de *Saccharomyces neoformans*. Devido a versatilidade em sobreviver em diferentes nichos, desde o começo da sua história o *Cryptococcus* é considerado um fungo saprofita e não um patógeno humano obrigatório (Barnett 2010; Srikanta, Santiago-Tirado, and Doering 2014).

Uma característica definidora do gênero *Saccharomyces* é a produção de ascósporos. Jean-Paul Vuillemin observou que o *S. neoformans* não apresentava essa estrutura e em 1901 o renomeou como *Cryptococcus neoformans* (Barnett 2010; Srikanta, Santiago-Tirado, and Doering 2014). Ao decorrer dos anos vários pesquisadores descreveram leveduras semelhantes ao *C. neoformans*, mas davam a eles nomes diferentes. Em 1952 Lodder e Kreger-van Rij realizaram o primeiro estudo taxonômico das leveduras conhecidas onde viram que existiam aproximadamente 49 sinônimos para esse mesmo patógeno. Baseado nesse estudo, adotaram a recomendação de Benham e padronizaram que apenas uma espécie era a causadora da criptococose, o *Cryptococcus* (Barnett 2010; Steenbergen and Casadevall 2003a).

## ***Taxonomia e nomenclatura***

Com o auxílio de antissoro de coelho, em meados do século 20, o *C. neoformans* foi classificado quanto ao sorotipo da cápsula, que variava de A à D. Posteriormente, com advento da biologia molecular houve uma nova classificação baseada em sequencias de DNA, epidemiologia e ecologia (Kyung J Kwon-Chung et al. 2014).

Durante muito tempo os diferentes sorotipos *Cryptococcus* eram classificados como duas variedades, *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo A e D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipo B e C) baseados em testes de aglutinação em soro pela presença de antígenos da cápsula do *Cryptococcus*. Com o advento da filogenia molecular, foi possível classificar melhor essas leveduras que foram reclassificadas em *C. neoformans* var. *grubii*, o sorotipo A, e *C. neoformans* var. *neoformans*, o sorotipo D e *C. neoformans* var. *gattii* os sorotipos B e C. Em 2000, o *C. neoformans* var. *gattii* foi elevado a espécie passando a ser chamado de *C. gattii*. Mais para frente, novos estudos mostraram que dentro de uma mesma espécie existe bastante variabilidade genética, e cada uma das espécies foi classificada em tipos moleculares. *C.*

*neoformans* var. *grubii* se divide em VNI, VNII e VNB, os híbridos do sorotipo AD representam o grupo molecular VNIII, *C. neoformans* var. *neoformans* compreende o grupo VNIV e *C. gattii* apresenta os grupos moleculares VGI e VGII (sorotipo B) e VGIII e VGIV (sorotipo C) (Kyung J Kwon-Chung et al. 2014). Mais recentemente alguns grupos sugerem a divisão das duas espécies em 7 diferentes espécies, com base nas suas divergências genéticas (Hagen et al. 2015). Contudo não há um consenso, tendo em vista que ainda não foram estudadas ou observadas diferenças clínicas significativas entre os diferentes tipos moleculares.

## **Biologia**

*C. neoformans* e *C. gattii* são leveduras do filo *Basidiomycota*, de forma esférica com diâmetro que em geral varia de 2-8µm. A característica mais marcante é a presença de uma capsula polissacarídica cujo o diâmetro pode variar de 5-30 µm, e que pode ser vista facilmente com auxílio de microscópio e coloração de exclusão com tinta nanquim.

Esses fungos estão distribuídos em diversos nichos ecológicos, e são considerados um saprófito. É facilmente encontrado em fezes de pombo (*Columba livia*) e outras aves (Emmons 1955), e restos de vegetais em decomposição. É considerado um micro-organismo intracelular facultativo, podendo ser encontrado tanto com vida livre como dentro de Amebas de solo ou macrófagos dos hospedeiros. Acredita-se que a interação desse fungo com as amebas e outros organismos do solo e no meio ambiente tenham fornecido pressão seletiva para o desenvolvimento dos fatores de virulência do fungo (Steenbergen and Casadevall 2003b). O *Cryptococcus* é considerado um patógeno oportunista, pois acomete na maioria das vezes pacientes com sistema imunológico comprometido, como é o caso de pacientes sob o uso prolongado de corticoides. Porém o principal grupo de risco para criptococose são os de indivíduos com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Srikanta, Santiago-Tirado, and Doering 2014; Bielska and May 2016; Cogliati 2013; Grupo de Consenso de Criptococose 2008; Lima, Klafke, and Xavier 2015). Quando um paciente HIV positivo é diagnosticado com criptococose, ele passa a ser classificado como portador de AIDS (Cogliati 2013). No Brasil, 4,4% dos pacientes HIV positivos apresentam a criptococose como a primeira enfermidade oportunista (Cogliati 2013; Grupo de Consenso de Criptococose 2008).

## Forma de Infecção

A forma de infecção mais comum para ambas as espécies é a inalação de propágulos do agente disperso no ar, como esporos ou leveduras desidratadas. Ao chegar no pulmão o fungo vai se instalar podendo ou não levar ao desenvolvimento da doença (Srikanta, Santiago-Tirado, and Doering 2014; Bielska and May 2016; Cogliati 2013; Pappalardo and Melhem 2003). O pulmão é o órgão primário de infecção, mas o fungo pode se espalhar para outros sítios anatômicos por via hematogênica (Srikanta, Santiago-Tirado, and Doering 2014; Grupo de Consenso de Criptococose 2008). Neste ponto reside uma das principais diferenças entre *C. neoformans* e *C. gatti*. O primeiro tem uma preferência pelo sistema nervoso central levando a meningites e meningoencefalites, enquanto o segundo, em geral, se estabelece no pulmão, levando a pneumonias, embora possa também causar lesões cerebrais (Bielska and May 2016).

Para que o *Cryptococcus* possa se estabelecer no organismo há fatores tanto do sistema imunitário do hospedeiro, quanto da maquinaria que o fungo utiliza para se esconder do sistema imunológico e proliferar, além do inóculo de infecção. A depender desses fatores o agente pode: 1. Ser eliminado do hospedeiro; 2. Permanecer latente no hospedeiro, contido em granulomas ou 3. Ficar na forma reativa causando infecção local e/ou sistêmica (Sabiiti et al. 2014). Os quadros clínicos mais comuns são: pneumonia (criptococose pulmonar), meningoencefalites (neurocriptococose) e criptococose disseminada com fungemia (Bielska and May 2016; Lima, Klafke, and Xavier 2015; Pappalardo and Melhem 2003).

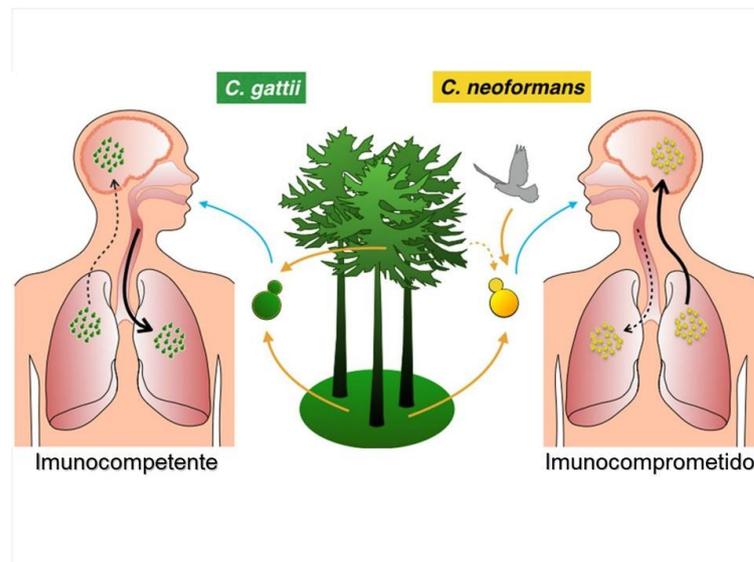


Figura 1: **Esquema do Processo de Infecção *C. gattii* (esquerda) X *C. neoformans* (direita).** A infecção por ambos se dá pela inalação de propágulos do agente permitindo que o fungo se instale no pulmão. Observe as diferenças entre as origens ambientais, sítio anatômico de preferência e condição imunológica do hospedeiro.

Fonte: (Adaptada a partir de Bielska and May 2016)

## ***Fatores de Virulência***

A capacidade do sistema imunológico do hospedeiro de reconhecer a presença de células fúngicas no organismo é fundamental para que haja uma resposta imunológica protetora antifúngica. Da mesma forma que o sistema imunológico possui estratégias para reconhecer e proteger o indivíduo da colonização desses agentes, os patógenos também possuem mecanismos para evadir tais estratégias e assim se instalarem no organismo, bem como outros fatores que podem levar a danos ao hospedeiro. Entre os fatores de virulência desenvolvidos por patógenos fúngicos estão a produção de cápsula, o dimorfismo celular, a capacidade de sobreviver e proliferar a 37°C, a produção de enzimas hidrolíticas a formação de células titãs, entre outras. (Hernández-Chávez et al. 2017). Abaixo são descritos brevemente os principais fatores de virulência *Cryptococcus spp.*

### **Cápsula**

A cápsula do *Cryptococcus spp* é amplamente estudada. No meio ambiente, ela desempenha uma importante função na proteção contra estresse hídrico e oxidativo, no hospedeiro ela tem um papel importante na virulência do fungo, visto que em experimentos de infecção de murinos com mutantes acapsulados, estes se mostraram significativamente menos virulentos em comparação com as linhagens selvagens. Com isso pode se perceber que a cápsula tem um importante papel na virulência desse patógeno. No entanto, outros estudos também demonstraram que certos mutantes acapsulares ou hipocapsulares são capazes de causar danos em organismos imunocomprometidos severos ou em determinadas condições (Zaragoza et al. 2009).

A cápsula criptococcica é composta de polissacarídeos e 99% do seu peso é devido a presença de água. Essa característica faz com que a cápsula seja hidrofílica (Maxson et al. 2007). E facilita que a levedura seja vista tranquilamente em microscópio óptico regular. Os polissacarídeos capsulares possuem resíduos de ácido glucurônico que conferem uma carga negativa para essa estrutura (Nosanchuk and Casadevall 1997). O polissacarídeos capsulares podem ser encontrados na capsula ou são liberados no meio circundante durante o crescimento fúngico. Os principais polissacarídeos presentes no *C. neoformans* são glucoxilomannano (GXM) e glucoronogalactoxilomannano (GXMGal). GXM equivale cerca de 90% da massa e GXMGal 5%. Além desses dois componentes, a cápsula apresenta também manoproteínas (MP) que equivalem 1% da sua massa (Zaragoza et al. 2009). James e Cherniak demonstraram que tanto a GXMGal quanto as MP não são ligados covalentemente aos glucanos da parede celular (James and Cherniak 1992). Enquanto a GXM está amplamente distribuída na capsula a GXMGal em células acapsulares está localizada na parede celular do fungo e em células capsuladas em regiões discretas mais próximas a superfície da cápsula (De Jesus et al. 2009).

Bryan et al demonstrou que GXM e GXMGal tem um papel importante na proteção da levedura contra radiações (Bryan et al. 2005).

A cápsula do *Cryptococcus* spp é uma estrutura bastante versátil. Durante a interação com o hospedeiro, o fungo consegue alterar o tamanho da cápsula, o que é considerado uma resposta morfológica do patógeno, além de alterar propriedades imunogênicas durante essa adaptação ao hospedeiro. Em ensaios com camundongos foi observado que durante as primeiras 0 horas de infecção ocorre um aumento da cápsula (Feldmesser, Kress, and Casadevall 2001).

A indução de cápsula também pode ser induzida *in vitro*. Em 1958, Littman descreveu meios que induziam o tamanho da capsula *in vitro*, desde então vários estudos têm mostrado diversos fatores como importantes para o aumento de tamanho de capsula, como por exemplo a presença de CO<sub>2</sub>, soro de mamífero, concentração de ferro, pH e outros fatores físicos. No entanto, esse processo de modulação é bastante complexo e ainda não são bem conhecidos todos os fatores relacionados com a modulação do tamanho da cápsula *in vivo* (Zaragoza et al. 2009).

### **Crescimento a 37°C**

Um dos mecanismos de imunidade inata de hospedeiros mamíferos é a alta temperatura corporal. Ter a temperatura a 37°C faz com que diversos microrganismos, que poderiam causar danos a estes hospedeiros, não consigam se estabelecer ou causar doenças (Abbas et al. 2015). Por esse motivo ter a capacidade de crescer a 37°C é um dos fatores de virulência para patógenos humanos responsáveis por infecções sistêmicas. O *Cryptococcus* spp além de poder crescer a temperatura ambiente também consegue se estabelecer a 37°C. Assim ampliando a quantidade de sítios em que o fungo pode sobreviver. O fungo é capaz de crescer bem no meio ambiente – em fezes de algumas aves, restos de vegetais em decomposição-, e também em mamíferos- Homem, murinos, gatos (Kraus et al. 2004; Buchanan and Murphy 1998).

### **Produção de melanina**

A melanina é um pigmento de coloração negra sintetizada a partir de substratos de 2,3 ou 3,4-difenol por uma fenoloxidase, a lacase (R Ikeda et al. 1993). Esse pigmento se acumula na parede celular do *Cryptococcus* e tem como principal papel a proteção do fungo a danos oxidativos (K J Kwon-Chung, Tom, and Costa 1983). Além de ser considerada um poderoso antioxidante protegendo o *Cryptococcus* da ação de oxidantes nitrogenados e oxigenados ela também contribui para a resistência aos antifúngicos anfotericina B e caspofungina (van Duin, Casadevall, and Nosanchuk 2002; Reiko Ikeda et al. 2003; Wang and Casadevall 1994). O *Cryptococcus* não produz naturalmente substratos para a síntese de melanina, necessitando de substratos exógenos. Entre esses substrato, estão L-dopa, monofenóis e várias catecolaminas

(R Ikeda et al. 1993; Chaskes and Tyndall 1975; K J Kwon-Chung, Tom, and Costa 1983; Polacheck, Hearing, and Kwon-Chung 1982).

A produção de lacase em *Cryptococcus neoformans* é codificada por dois genes, *LAC1* e *LAC2*. *LAC1* localiza-se na parede celular enquanto *LAC2* é localizada no citoplasma (Missall et al. 2005; Pukkila-Worley et al. 2005; Zhu et al. 2001; Zhu and Williamson 2004; Eastman et al. 2015). A deleção de *LAC1* é suficiente para que não haja produção de melanina e o fungo apresenta colônias brancas na presença do substrato para melanização (Missall et al. 2005). Um estudo com coelhos mostrou que linhagens mutante *lac1Δ* tinha a virulência atenuada, corroborando que a melanina desempenha um papel importante para a virulência do agente (Missall et al. 2005; R Ikeda et al. 1993). Jacobson e Compton demonstraram em seus estudos que o ferro influencia significativamente a atividade da lacase (Jacobson and Compton 1996).

## **Produção de enzimas hidrolíticas**

As Fosfolipases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações ester dos glicofosfolipídeos. Essas hidrolises causam instabilidade na membrana levando à lise celular. Elas são classificadas em 5 grupos: A1, A2, B, C e D (Ma and May 2009; Cox et al. 2001).

A fosfolipase B tem um papel importante na virulência criptocócica. Ela é uma enzima que tem a capacidade de modificar os fosfolipídios da superfície celular, que pode auxiliar o patógeno na invasão celular e saída dos macrófagos (Djordjevic et al. 2005), tem uma atividade ótima em ambientes ácidos a 37°C. Outras atividade da fosfolipase é a incorporação de ácido araquidônico derivado de macrófagos nos lipídios do fungo quando está dentro do fagossomo, o Ácido araquidônico serve como reservatório para produção de eicosanoides levando a supressão da atividade dos macrófagos (Wright et al. 2007; Noverr et al. 2003). O *Cryptococcus* deficientes em Fosfolipase B1 demonstram diminuição do crescimento do fungo no interior do macrófago, redução da virulência, diminuição da capacidade do fungo a crescer a 37°C, diminuição na produção de melanina, inabilidade em induzir o aumento no tamanho da cápsula durante a interação com macrófagos e amebas (Chrisman et al. 2011), e redução na taxa de Exocitose não-lítica (Johnston and May 2013; Cox et al. 2001; Chen et al. 1997).

A urease secretada pelo *C. neoformans* é uma enzima que catalisa a hidrólise de amônia com a finalidade de alcalinizar o meio. Favorecendo com que o fungo sobreviva e posteriormente saia das células do hospedeiro possibilitando que ele infecte novos sítios anatômicos (Feder et al. 2015; Singh et al. 2013). A urease já foi descrita como importante em bactérias e em outros fungos além do *C. neoformans* (Eaton et al. 1991). Levitz demonstrou que a presença ou ausência da urease não alterava na interação com macrófagos (Levitz et al. 1999), porém Cox et al, demonstrou que em testes com camundongos observaram que quando os animais era infectados com mutantes deficientes de urease demonstravam uma maior sobrevivência em relação aos que forma infectados com a linhagem selvagem (Cox et al. 2000). Posteriormente Olszewski demonstrou que quando infetava murinos via endovenosa com

mutantes sem o gene da uréase, esses apresentavam menor disseminação para o sistema nervoso central, sugerindo que a urease tem um papel importante na disseminação do fungo para esse sítio anatómico (Olszewski et al. 2004).

## Interação com o Hospedeiro

### *Imunidade*

A maior parte das pessoas que se infectam não desenvolvem a doença. Goldman e colaboradores realizam um estudo que mostrou que a maioria das crianças com mais de 2 anos de idade já haviam entrado em contato com o *Cryptococcus neoformans* e tinha sorologia positiva para ele, embora a maioria não desenvolva a doença (Goldman et al. 2001). Quando as células de *Cryptococcus ssp* entram em contato com o hospedeiro elas são reconhecidas por células do sistema imunológico e induzem vários sinais para o sistema imunológico a fim de que se monte uma resposta protetora contra o fungo. Na superfície e/ou dentro das células imunes dos hospedeiros existem Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRR) que reconhecem os Padrões moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Entre as diversas funções da cápsula, uma delas é esconder os PAMPs mais clássicos de células fúngicas, que são os componentes da parede celular. A GXM de *Cryptococcus spp* é reconhecida por TLR2 e TLR4 –receptores do tipo Toll. Já os resíduos de manana, presentes na cápsula, pelos receptores de lectina de tipo C, Dectina-2, DC-SIGN e CD206 ou receptores de manose. Os  $\beta$ -glucanos presentes na parede celular do fungo são reconhecidos pelos receptores Dectina-1 e o DNA fúngico principalmente pelo receptor endossomal TLR9 (Leopold Wager et al. 2016).

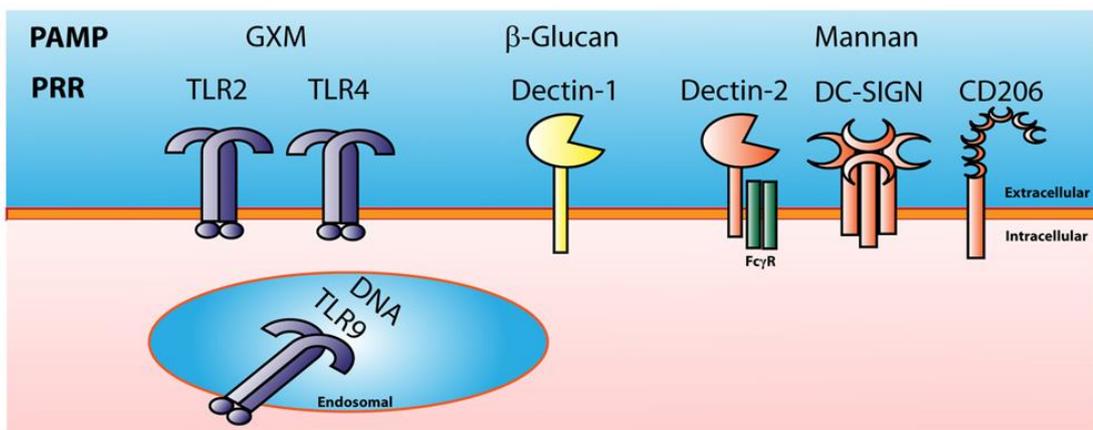


Figura 2: PRRs presentes nas células imunes do hospedeiro e seus respectivos PAMPs fúngicos.  
Fonte:(Leopold Wager et al. 2016)

As células dendríticas são células sentinelas do sistema imunológico, essas células ao reconhecerem as células de *Cryptococcus* spp, através dos PRRs, os fagocitam e apresentam antígenos para as células T virgens, para que essas sejam ativadas e uma resposta imune adaptativa seja montada. São consideradas as profissionais em apresentarem antígenos. Em células dendríticas os receptores TLR2 e TLR4 tem grande importância no reconhecimento de *Cryptococcus* spp (Nakamura et al. 2006). O reconhecimento de *Cryptococcus* spp pelas células dendríticas é aumentado significativamente quando as células do fungo estão opsonizadas. Devido a presença da capsula a maioria dos PAMPs de parede celular fúngica ficam escondidos, por isso quando anticorpos anti-capsulares e as proteínas do sistema complemento recobrem as leveduras facilitam a sua fagocitose pela interação dessas moléculas com receptores presentes na superfície das células dendríticas (Kelly et al. 2005). Após a fagocitose as leveduras podem ser eliminadas através de mecanismos oxidativos e não oxidativos no lisossomo e as células dendríticas apresentam os fragmentos peptídicos de manoproteínas do patógeno via MHC II. Há também o aumento de expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 na superfície das células dendríticas (Wozniak et al. 2009).

Com o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, os macrófagos desenvolvem um importante papel na contenção da infecção e na resposta imune a esse fungo. Em infecções pulmonares em geral, os macrófagos alveolares são as principais células de defesa do hospedeiro, incluindo-se na criptococose. (Fels and Cohn 1986).

## ***Macrófagos***

Os macrófagos são as principais células imunes na resposta a infecção por *Cryptococcus* spp. Quando o patógeno é reconhecido por essas células ele é fagocitado. Os macrófagos alveolares conseguem apresentar antígenos para linfócitos T e ativa-los para que ocorra a resposta adaptativa a essa infecção fúngica. Sendo uma resposta protetora caracterizada por uma polarização para uma resposta do tipo Th1 (Decken et al. 1998).

Macrófagos em geral, respondem a estímulos do microambiente em que estão inseridos sendo então ativados. Existem dois perfis de ativação de macrófagos, os macrófagos ativados classicamente (M1) e o macrófagos ativados alternativamente (M2). Esses fenótipos se diferem pelo estímulo que recebem para que sejam ativados, pelas citocinas produzidas, pelos produtos secretados, e pelas moléculas e receptores expressos na superfície dessas células.

Quando os macrófagos recebem um estímulo de citocinas inflamatórias, como Interferon- $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ) há uma polarização para o fenótipo M1. O INF-  $\gamma$  é produzido por células Th1, Células Natural Killer (NK) e células apresentadoras de antígenos. Os macrófagos M1 possuem uma atividade microbicida devido, principalmente, a ação da enzima oxido nítrico sintase induzível (iNOS) sobre o substrato-arginina para produção de Oxido Nítrico (NO) em resposta ao reconhecimento de PAMPs. O NO tem uma importante atividade anti-criptocócica. Camundongos deficientes em iNOS ou tratados com inibidores de iNOS não são capazes de

inibir o crescimento intracelular de *C. neoformans*, mesmo que a produção de ROS esteja intacta. Isso demonstra que NO e não ROS é o principal mecanismo utilizado por macrófagos M1 para o controle da infecção por *Cryptococcus* (Wager et al. 2015).

Por outro lado, quando macrófagos são estimulados pelas Interleucinas 4 e 13 (IL-4 e IL-13) os macrófagos gerados apresentam um perfil M2. Os macrófagos M2 têm uma resposta imunológica voltada para cicatrização e regulação da resposta imune, um perfil mais anti-inflamatório. Por isso não tem ação antimicrobiana contra o *Cryptococcus* spp e serve como nicho para o crescimento do fungo. Eastman estudou a Ssa 1, Proteína homóloga a HSP70 (0) expressa pelo *Cryptococcus neoformans* sorotipo A, e viu que ela consegue interferir nos macrófagos na fase inata e induzir uma formação precoce de macrófagos M2 além de ajudar no crescimento do fungo (Eastman et al. 2015). Outro achado é de que a quitina presente na parede do *Cryptococcus* spp consegue estimular a produção de IL-5, IL-13 e IL-4 e levar a ativação alternativa de macrófagos (Van Dyken et al. 2014).

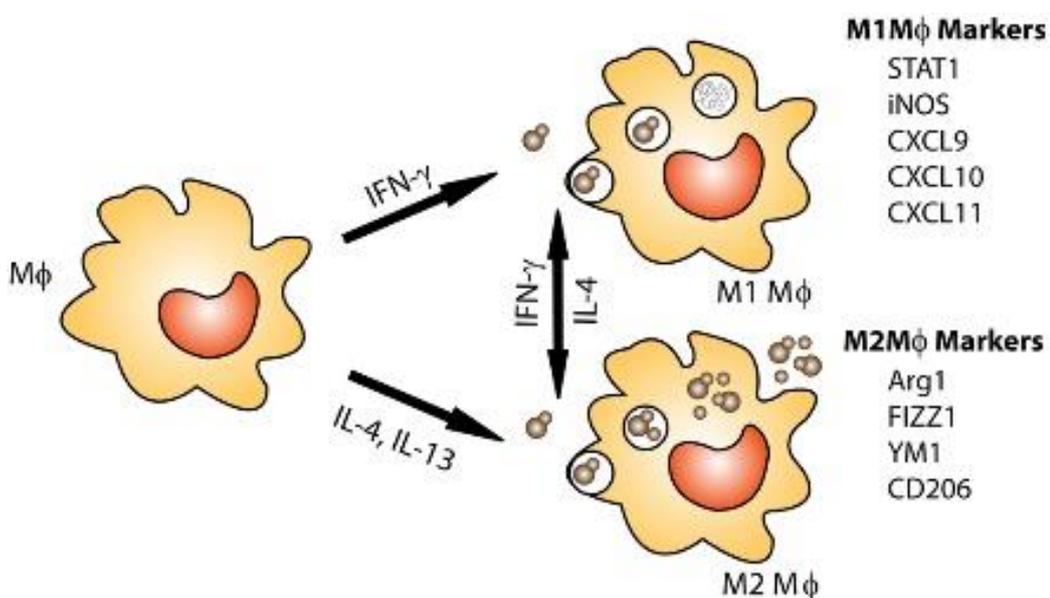
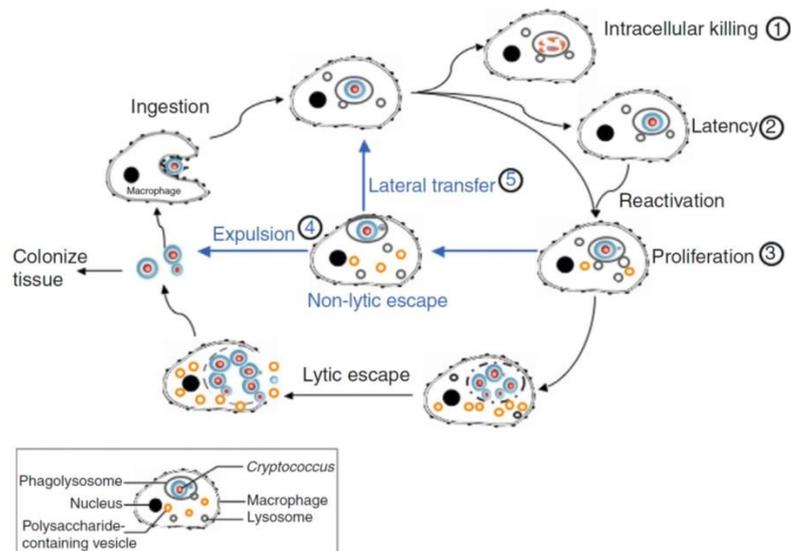


Figura 3: **Ativação de macrófagos.** Macrófagos ativados classicamente são capazes de destruir os fungos, enquanto macrófagos alternativamente ativados não são fungicidas e os *Cryptococcus* conseguem se reproduzir dentro deles. Há uma plasticidade no fenotipo dos macrófagos de modo que eles podem alterar o fenotipo de acordo com as citocinas que estão presentes no meio. (Fonte: Leopold-Wagner et al., 2016)

Apesar de que para *C. neoformans* pode se instalar no hospedeiro é necessário que ocorra a fagocitose e o fungo tem diversos mecanismos para impedir a fagocitose ocorra, como a Capsula de polissacarídeo capaz de absorver e reter ROS, a Proteína antifagocítica 1 (App1) – é uma proteína secretada que boqueia a fagocitose via complemento-, produção de células Titãs (Leopold Wager et al. 2016). Embora possa ocorrer a fagocitose de *Cryptococcus* spp por reconhecimento de PAMPS, para que ocorra a fagocitose de maneira eficiente do agente pelo macrófago, o *C. neoformans* precisa ser opsonizado por proteínas do complemento ou anticorpos específico para a cápsula criptocócica. Os macrófagos possuem receptores Fc que reconhecem os anticorpos, e receptores para moléculas do sistema complemento. Assim que

ocorre esse reconhecimento o fagócito recebe estímulos para rearranjar o citoesqueleto e englobar e internalizar o patógeno. Após a fagocitose, é formado um fagossoma, uma vesícula de membrana única. Diferentes tipos de vesículas endocíticas se fundem ao fagossoma durante a maturação dessas vesículas para que o seu microambiente se torne antimicrobiano (Leopold Wager et al. 2016).



2009. Virulence in *Cryptococcus* Species. Hansong Ma and Robin C. May

Figura 4: **Esquema de parasitismo do *Cryptococcus neoformans* em macrófago.** Após a internalização das células do fungo pelo macrófago podem acontecer: 1) a morte do fungo pelo macrófago, 2) o fungo pode permanecer latente no interior dessa célula podendo posteriormente reativar seu crescimento intracelular, 3) o fungo pode proliferar no interior do macrófago levando à lise do macrófago, ou 4) ser expulso do macrófago para o meio extracelular sem que ocorra morte de nenhuma das células pelo mecanismo de Exocitose não-lítica, ou 5) ser transferido lateralmente para outro macrófago. Fonte: (Ma and May 2009)

Para que o *Cryptococcus* consiga sobreviver dentro do macrófago ele precisa sobreviver a esse microambiente antimicrobiano e obter nutrientes suficientes para proliferarem. Para ajudar nessa adaptação, a capsula e a melanina protegem contra os ROS, e a melanina auxilia na neutralização de peptídeos microbianos. Dentro do fagossoma o pH é ácido, e anteriormente se acreditava que *Cryptococcus* não evitaria a acidificação do fagossoma, conseguindo se proliferar mesmo quando o meio ambiente está ácido (Diamond and Bennett 1973; Levitz et al. 1999). No entanto, estudos mais recentes mostraram que leveduras vivas de *Cryptococcus* são capazes de dificultar a acidificação, alterar o fluxo de cálcio e atividade de protease do fagossomo, tornando essas células mais permissivas para a proliferação intracelular do fungo (Smith, Dixon, and May 2015).

## ***Exocitose não-lítica***

Na interação do *Cryptococcus* com os macrófagos pode ocorrer a destruição do fungo ou a ruptura do macrófago e liberação dos fungos que se replicaram no seu interior, ou o fenômeno mais recentemente descrito de exocitose não-lítica ou vomocitose (Charlier et al. 2009; Voelz, Lammas, and May 2009; Nicola and Robertson 2011; Ma et al. 2006; Alvarez and Casadevall 2006; Tucker and Casadevall 2002). A exocitose não-lítica é um processo em que as células do patógeno conseguem sair de dentro dos macrófagos infectados de forma que ambas as células continuam vivas (Alvarez and Casadevall 2006; Ma et al. 2006). Observada inicialmente na interação do fungo com macrófagos, essa forma de evasão também foi observada na interação do *C. neoformans* com a ameba *Acanthamoeba castellanii* (Chrisman, Alvarez, and Casadevall 2010). Já foi observado Exocitose não-lítica em outros microrganismos, como *Candida albicans* (Bain et al. 2012) e *C. krusei* (García-Rodas et al. 2011). Esse processo ocorre por um mecanismo exocítico em que o fagossoma se funde com a membrana plasmática e as células do fungo são liberadas para o exterior do macrófago (Johnston and May 2010). Esse processo é altamente regulado, porém ainda não são conhecidos todos os mecanismos que envolvem sua ocorrência, ou a contribuição exata do fungo ou dos fagócitos para seu desencadeamento (Nicola and Robertson 2011).

Acredita-se que a exocitose não-lítica é favorável ao *Cryptococcus* spp, por exemplo evitando a liberação de fatores pró-inflamatórios produzidos pela ruptura de macrófagos. Quando ocorre a lise dos macrófagos o sistema imunológico reconhece Padrões Moleculares Associados ao Perigo (DAMPs) que são reconhecidos por Receptores de Padrões (PRR) e assim o desencadeamento de uma resposta inflamatória. Na exocitose não-lítica, não há a exposição desses padrões e as células fúngicas se mantêm viáveis fora dos macrófagos podendo infectar outras células ou invadir outros nichos (Alvarez and Casadevall 2006; Nicola and Casadevall 2011; Ma et al. 2006).

O principal método descrito para avaliar a exocitose não-lítica é a videomicroscopia, porém Nicola e Robertson propuseram utilizar a citometria de fluxo e em seus resultados sugeriram que as percentuais de exocitose não-lítica *in vivo* é mais alta do que *in vitro* (Nicola and Robertson 2011).

Acredita-se que o escape não lítico do *Cryptococcus* seja importante na progressão da criptococose, sendo um possível mecanismos contribuindo para que o fungo possa atravessar a barreira hematocefálica (Dromer and Levitz 2011). Por exemplo, esse escape poderia contribuir com a teoria do cavalo de Tróia, na qual a invasão do SNC pelo fungo ocorreria pela entrada dentro de macrófagos infectados os quais atravessariam a barreira hematocefálica e depois poderiam liberar os fungos viáveis nesse ambiente (Charlier et al. 2009).

Como ainda não se sabe muito a respeito dos fatores que regulam esse processo, vários grupos de pesquisa tem focado no estudo de possíveis papéis do fungo ou das células do hospedeiro para o desencadeamento desse processo. Em relação ao *Cryptococcus*, observou-se que linhagens deficientes em fosfolipase B1 (Plb1) possuem exocitose não-lítica reduzida

em 60% comparando com a cepa selvagem levando a crer que a Plb1 possa ser necessária para que a exocitose não-lítica ocorra (Chayakulkeeree et al. 2011). Sabe-se que Plb1 é necessária para a produção de eicosanoides de *Cryptococcus* spp. E eicosanoides atuam como modulador da resposta imunológica (Noverr et al. 2003). Corroborando com essa hipótese, foi demonstrado que quando os macrófagos são tratados com citocinas do perfil Th1 ou Th2 as percentuais de exocitose são alteradas (Voelz, Lammas, and May 2009). A Exocitose não-lítica depende também do citoesqueleto celular, mas não sabem se os microtúbulos fornecem a força motriz diretamente para que ocorra a expulsão do fungo (Alvarez and Casadevall 2006; Ma et al. 2006).

Supõem-se que o processo de exocitose não-lítica seja demasiadamente complexo e por isso é pouco provável que o fungo forneça maquinaria para tal, por ser um organismo menos complexo (Johnston and May 2013). Devido a falta de um mecanismo já descritos, alguns grupos de pesquisa continuam a procurar os mecanismos biológicos que possam estar controlando a exocitose não-lítica, incluindo mecanismos associados à própria célula hospedeira.

Em relação ao hospedeiro, o ERK5 (regula atividades celulares como expressão genica, mitose, diferenciação, apoptose) é um componente de sinalização celular que regula a vomocitose. Quando essa proteína quinase é inibida no hospedeiro, há um aumento de vomocitose (Gilbert et al. 2017). Ainda em relação ao hospedeiro, foi demonstrado que a anexina 2 é importante para o reparo de membrana da célula hospedeira. Macrófagos com deficiência de Anexina 2 apresentaram um menor taxa de exocitose não-lítica e um aumento de exocitose lítica, comparado com células selvagens, demonstrando que a anexina por desempenhar um importante papel no processo de exocitose não-lítica, provavelmente na manutenção da membrana celular dos macrófagos (Stukes et al. 2016).

Também foi demonstrado que as proteínas WASH (homólogo da proteína WASP e SCAR), que foram descritas como importantes componentes da exocitose de material indigesto por *Dictyostelium discoideum* estão presentes nas vesículas que levam a exocitose não-lítica de *C. neoformans*. Mutantes para essas proteínas não apresentaram problemas em internalizar as células desse fungo, no entanto, apresentaram um bloqueio na exocitose não-lítica do fungo (Carnell et al. 2011).

Diversos autores demonstraram que apesar da exocitose não-lítica ser bastante variável entre diferentes linhagens, que esse processo é raro ou ausente quando o fungo internalizado está morto (Voelz, Lammas, and May 2009; Alvarez and Casadevall 2006; Ma et al. 2006; Johnston and May 2010; Voelz et al. 2010).

## Rede Criptococose Brasil

A Rede Criptococose Brasil (RCB) abrange vários grupos de pesquisadores e profissionais da área da saúde que trabalham para a caracterização dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp de todo o Brasil. É uma equipe multidisciplinar onde diversos profissionais trabalham com o objetivo de reunir dados, tanto clínicos como experimentais, para finalmente poder traçar o perfil de *Cryptococcus* spp e da criptococose no Brasil. Essa equipe surgiu a partir da necessidade de ter mais informações sobre essa enfermidade e assim poder oferecer uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Visto que essa é uma doença em que os doentes têm uma demora no diagnóstico e quando finalmente recebem tratamento, muitas vezes não obtêm sucesso por já estarem em um estágio avançado da infecção.

A RCB está presente em vários estados brasileiros tais como: Rio de Janeiro, Paraná, São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Bahia, Ceará, Piauí, Pará, Roraima, Minas Gerais e Distrito Federal. A RCB foi implantada no Brasil em 2009 e no Distrito Federal (DF) em 2014. No DF foi coordenada inicialmente pelo Dr. Vitor Laerte que é Professor da Universidade Católica de Brasília (UCB) e pesquisador da Fiocruz Brasília, atualmente é coordenada pelo Dr. André Nicola professor e pesquisador da Universidade de Brasília (UnB). Integram a Rede Universidade, Institutos de pesquisa, Laboratórios e hospitais públicos.

A nossa equipe é coordenada pelos professores André Nicola e Patricia Albuquerque e atualmente conta com mais de 10 pesquisadores entre alunos de PIBIC, mestrado, doutorado, pós-doutores e professores que se dividem em realizar experimentos no Laboratório de Imunidade Celular da Faculdade de Saúde da UnB e no Laboratório 3 do Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da UnB. Nos últimos anos temos feito a coleta e caracterização de isolados clínicos de *Cryptococcus* que estão sendo submetidos a análises experimentais e coleta de informações clínicas dos pacientes dos quais foram isolados. As análises experimentais envolvem a avaliação fenotípica de diferentes fatores de virulência do fungo, bem como da sua interação com hospedeiros realizadas por diferentes colaboradores. E o objetivo maior é que possamos avaliar possíveis correlações entre esses fatores com os perfis clínicos da criptococose no Brasil.

Esse projeto, mais especificamente envolveu a avaliação do processo de exocitose não-lítica de isolados clínicos por macrófagos e sua correlação com possíveis fenótipos de virulência do fungo, tais como a capacidade desses isolados em modular o tamanho de sua cápsula ou os resultantes de sua interação com o modelo alternativo *Galleria mellonella* ou com macrófagos murinos. Dessa forma objetivamos identificar possíveis fatores ligados ao fungo que possam contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na regulação desse processo.

# OBJETIVOS

## Geral

Avaliar a ocorrência e as características do processo de exocitose não-lítica de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans in vitro* e correlacionar esses dados com a expressão de fatores de virulência por isolados.

## Objetivos Específicos:

- Observar a interação fungo-macrófagos utilizando videomicroscopia para determinar a porcentagem de células fúngicas de cada isolado liberadas por exocitose não-lítica;
- Caracterizar o processo de exocitose não-lítica de 8 isolados clínicos e duas linhagens controles de *Cryptococcus neoformans*;
- Correlacionar os dados obtidos com a análise exocitose não-lítica dos diferentes isolados com resultados prévios referentes a análise da expressão de fatores de virulência desses isolados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa.

## **METODOLOGIA**

### **Meios de Cultura e Soluções**

#### ***Meio Sabouraud***

Para o crescimento fúngico, em geral utilizamos o Meio Sabourand Dextrose. Para o preparo do Caldo dissolvíamos 40 g de Dextrose (Vetec: V000221) e 10 g de Peptona Bacteriologia (Kasvi: K25-611701) em água destilada para um volume final de 1000 ml. O pH era ajustado para 5.4. Após isso o caldo era autoclavado por 20 minutos a 121°C e armazenado em temperatura ambiente por no máximo 1 mês. Para o meio solido, Caldo dissolvíamos 40 g de Dextrose (Vetec: V000221), 10 g de Peptona Bacteriologia (Kasvi: K25-611701) e 18 g de Ágar Bacteriológico (Vetec: V000006) em água destilada para um volume final de 1000 mL. O pH era ajustado para 5,4. Após autoclavado por 20 minutos a 121°C, o meio foi vertido em placas onde solidificava. As placas eram vedadas com plástico filme e armazenadas em temperatura entre 2-8°C por no máximo 1 mês.

#### ***DMEM***

Utilizamos Meio DMEM suplementado com 1x de Aminoácidos não-essenciais e 10% de Soro Fetal Bovino. Usamos o Meio DMEM da Sigma (D5796), Aminoácidos não essenciais 100x da Sigma (M7145) e Soro Fetal Bovino da Gibco (12657). Em geral, preparávamos um volume de 50 ml de meio que era utilizado em até 2 semanas.

#### ***Meio Mínimo***

Para o preparo do Meio Mínimo, dissolvemos 15mM de glicose, 29 Mm de Fosfato de Potássio Monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 10mM de Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado (MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O) e 13mM de Glicina. O pH era ajustado para 5.4 e a solução era autoclavada por 20 minutos a 121°C e armazenada em temperatura ambiente. No momento do uso acrescentamos Tiamina filtrada 3µM.

## ***MOPS***

Preparamos uma solução 50mM de MOPS, cujo pH era ajustado para 7.4.

## ***PBS***

Preparamos uma solução estoque de PBS 5X, a qual era autoclave e diluída para o uso com água estéril, logo antes de cada experimento. Para a produção do estoque era usado 40g de Cloreto de Sódio (NaCl), 1 g de Cloreto de Potássio (KCl), 1 g de Fosfato de Potássio Monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 6 g Fosfato Dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) em 1000 ml de Água Destilada. O pH era ajustado para 7.4 e a solução era autoclavada por 20 minutos a 121°C e armazenada em temperatura ambiente.

## **Células**

### ***J774.A1***

Essas células são macrófagos imortalizados derivados de sarcoma de células reticulares de fêmea de camundongo BALB/cN. Tem grande aplicação em estudos para avaliar a resposta biológica e também para estudos de transfecção gênica. Elas foram cedidas gentilmente pelo professor Hugo Costa Paes da Universidade de Brasília. As células foram cultivadas em meio DMEM em placas para cultivo de células não tratadas da marca Corning (#430591). Os repiques eram realizados duas vezes por semana (terça-feira e sexta-feira).

Procedimento de repique: Foram colocados 9 ml de DMEM suplementado com 10% de SFB e Aminoácidos não-essenciais 1x, em uma placa para cultura de células nova e estéril, a seguir as células da placa mãe eram desgrudadas da superfície da placa, por pipetagem e dispensação do meio múltiplas vezes até que todas as células estivessem suspensas, em seguida foi transferido 1 ml dessa suspensão de células para placa nova contendo os 9 ml de meio já pré-aquecido. As placas eram então transferidas para uma estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

## ***Células Fúngicas***

Foram usadas como controle dos experimentos as linhagens padrão de *Cryptococcus neoformans*, H99 e B3501, por serem linhagens já bem caracterizadas, terem seus genomas sequenciados e serem amplamente utilizadas em experimentação científica. Os 8 isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* foram fornecidos pelas pesquisadoras Luciana Trilles e Márcia Lazéra da FioCruz do Rio de Janeiro. As células recebidas foram semeadas em Agar Sabouraud e colocadas em uma estufa a 30°C por 48 horas. A seguir, uma colônia isolada foi semeada em meio Sabouraud líquido, para crescimento por 24 horas sob agitação a 37° com rotação de 200 RPM. Após esse tempo o inóculo era centrifugado por 5 minutos a 1200G e o sobrenadante descartado. O sedimento de células era então ressuspensionado em 500µL de Sabouraud líquido e transferido para um criotubo estéril devidamente rotulado, já contendo 500µL de Glicerol 100% estéril. Após homogeneização os criotubos foram armazenados em freezer -80°C.

Para os experimentos, as placas eram semeadas a partir do estoque do -80° e colocadas na estufa a 30°C por 48 horas, três dias antes do experimento. Um dia antes do experimento, uma colônia isolada dessas placas era escolhida e inoculada em 3 ml de Sabouraud líquido em tubos cônicos de 50 ml. Os tubos eram levados para uma incubadora com agitação a 37°C com rotação de 200 RPM, onde ficavam por 24 horas. Após 24 horas as células passavam por uma etapa de 3-5 lavagens para remoção do meio de cultura. Para isso, as culturas eram centrifugadas por 5 minutos a 1200 g, o sobrenadante era descartado e o sedimento de células ressuspensionado em 5 ml de PBS e centrifugadas novamente. Depois da última centrifugação as células eram ressuspensionadas em 1 ml de PBS, contadas com auxílio de um hemocitômetro e posteriormente diluídas em densidades apropriadas para cada experimento.

## **Experimentos**

### ***Avaliação do tamanho das cápsulas dos isolados.***

Os isolados após crescidos em meio líquido e lavados eram contados em hemocitômetro e eram preparadas suspensões de 10<sup>6</sup> células/mL em 3 meios diferentes, Sabouraud (controle de cápsula não induzida), Sabouraud diluído de 1:10 em MOPS 50 Mm e Meio mínimo – sendo os dois últimos meios que induzem o crescimento da capsula. Colocamos 500µL de cada suspensão em poços de uma placa de 24 poços. As placas foram então incubadas em uma estufa a 37°C por 24 horas. Depois desse tempo as culturas foram então transferidas para um microtubo e centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos para concentração do número de células.

Descartávamos 200µL dos sobrenadante e resuspendíamos o sedimento de células no volume restante. Em uma lâmina devidamente identificada colocávamos 10µL da suspensão de células e uma gota de tinta nanquim (BD). Após misturarmos as células ao pigmento colocávamos uma lamínula sobre a lâmina e observávamos as células em um microscópio (Zeiss AxioObserver Z1). As lâminas eram coletadas com uma objetiva PlanNeoflour de 40x e abertura 0.75 depois medidas usando o programa ZEN. Esse experimento é o trabalho de PIBIC da aluna Camila Rosa. Nesses experimentos eu a auxiliei a obter as fotos dos fungos no microscópio.

### ***Avaliação da exocitose não-lítica por videomicroscopia***

Utilizamos o protocolo descrito por Stukes e Casadevall (Stukes and Casadevall 2014) com modificações. Utilizamos placas de 4 câmaras (Eppendorf Cell Imaging Coverglasses-0030742028). Preparávamos uma suspensão de J774.A1 de  $5 \times 10^5$  células por mL e colocávamos 250 µL em cada uma das câmaras que eram então incubadas a na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante a noite para adesão das células. No dia seguinte, eram preparadas suspensões dos isolados fúngicos em uma densidade de  $5 \times 10^6$  / mL em DMEM com 10µL/ML do anticorpo anti-capsular 18b7 para opsonização das células fúngicas. Células não aderidas de J774 eram removidas e a seguir eram adicionados 250 µL da suspensão de fungo em cada câmara. As células eram então coincubadas por 2 horas para a fagocitose. Após esse tempo eram levadas ao microscópio invertido para verificar a fagocitose. Confirmando-se a fagocitose, fazíamos a remoção de células fúngicas não fagocitadas, fazendo-se 3 lavagens de cada câmara com PBS, a seguir, acrescentávamos 1,5 mL de DMEM suplementado. A seguir as placas eram levadas ao Microscópio Invertido Zeiss AxioObserver Z1 e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Eram feitas imagens a cada 4 minutos durante o período de 24 horas utilizando-se a objetiva PlanNeoflour de 10x e abertura de 0.30.

### ***Ensaio de melanina***

O ensaio foi feito em placas de 24 poços. Em cada poço era adicionado 1mL de meio mínima contendo agar e 1 mM de L-DOPA. No meio já solidificado colocamos uma suspensão  $10^5$  células de células em um volume de 5µL. A placa era encubada a 37°C por 120 horas e tiramos fotos a cada 12 horas iniciando no tempo 0. Todos os isolados eram feitos em duplicata. As fotos foram analisadas através do software ImageJ, onde pigmentação das colônias eram calculadas através da quantificação dos pixels da colônia. Com os valores obtidos montamos uma curva de melanização dos isolados. E das curvas eram calculados os valores de EC50, Hill Slope e Top. Onde EC50 é o tempo em que a colônia demora para atingir 50% da sua coloração total, Hill Slope é a inclinação da curva e Top é o valor de pigmentação máxima. Essa análise foi baseada na quantificação de melanina em *C. neoformans* proposta por Brilhante e

colaboradores (Brilhante et al. 2017) . Esses experimentos foram realizados pelos alunos Kaio Gorgonha, Getúlio Junior e Herdson Sousa.

### ***Ensaio de sobrevivência dos isolados pós interação com macrófagos***

Semeamos macrófagos nos poços da placa em uma densidade de cinquenta mil células por poço em um volume de 200µL. Após 24 horas, coincubamos os macrófagos com 10<sup>5</sup> células do fungo previamente opsonizadas com anticorpo 18B7 na concentração de 10µg/mL. por poço (MOI de 2) em uma estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Depois desse tempo o sobrenadante da cultura contendo os fungos não internalizados foi recolhido e acondicionado em microtubos de 1,5 mL contendo 400 µL de PBS estéril. Em seguida os macrófagos de cada poço eram lisados com água estéril e o produto do lisado era recolhido e adicionados nos tubos previamente nomeados equivalentes a cada poço. Desses tubos forma feitas diluições de 1:10 e 1:100 e as amostras foram plaquedadas em Agar Sabouraud Dextrose. As placas eram deixadas na estufa a 30°C por 2 dias e as unidades formadoras de colônia eram contabilizadas.

### ***Análise das imagens***

#### **Imagens de Cápsula**

Para a análise escolhemos vinte células de cada isolado em cada uma das condições, seguindo os seguintes critérios: estar bem focada para que conseguíssemos determinar com exatidão os limites do corpo celular e da capsula, células que estivesse isoladas e sem brotamentos, células de tamanho adulto e não brotamentos. Além disso escolhemos células em diferentes campos da lâmina escolhidos de maneira aleatória. Após a escolha da célula, era medido o D1: diâmetro da célula completa (Corpo celular + cápsula) e o D2: diâmetro do corpo celular. Fazíamos o seguinte cálculo para obter o diâmetro da cápsula:  $D1 - D2$ . Com esses valores das 20 células contadas calculávamos a média.

#### **Análise dos Vídeos de Exocitose não-lítica**

Escolhíamos os macrófagos que haviam fagocitado células fúngicas e cuja imagem estivesse em foco, preferencialmente foram escolhidos macrófagos que estivessem mais isolados no início do vídeo e que pudéssemos acompanhar durante as 24 horas do experimento.

Escolhemos cem macrófagos de cada isolado e avaliamos a porcentagem dos seguintes critérios:

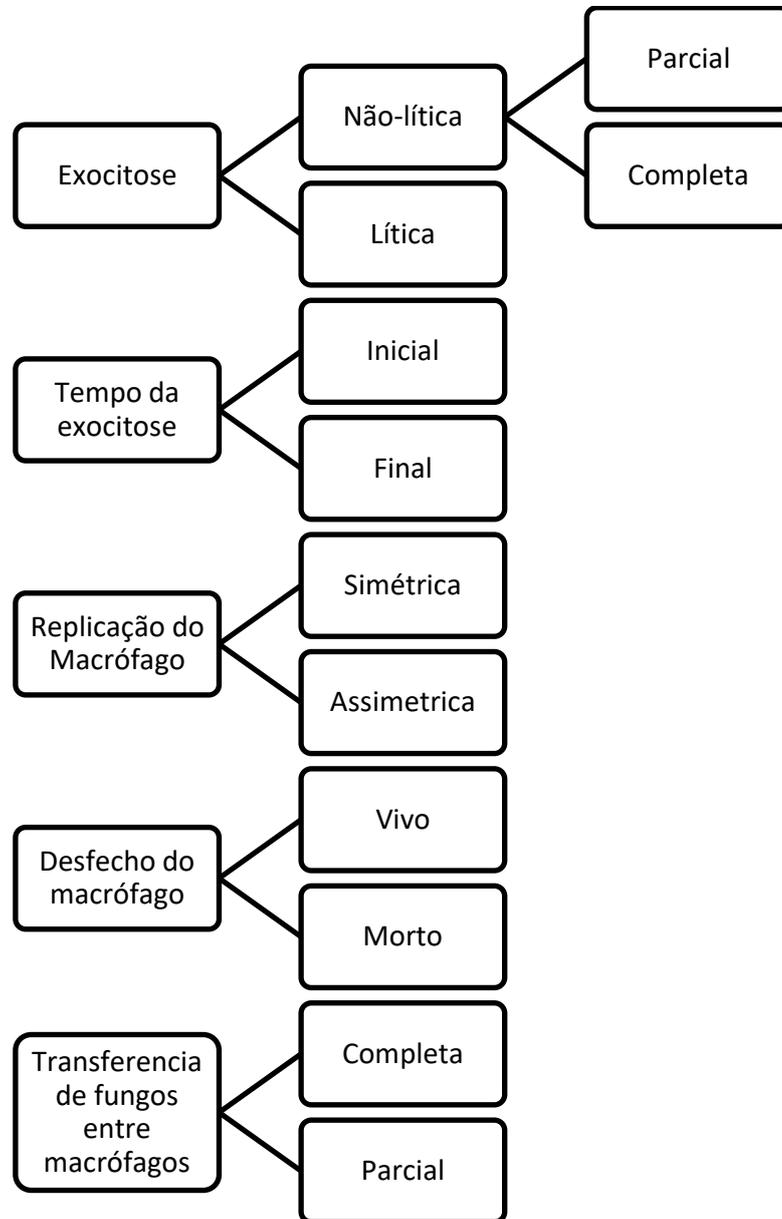


Figura 5: Esquema dos possíveis desfechos da interação macrófago-fungo que foram avaliados nos experimentos de videomicroscopia.

- Exocitose não-lítica: quando alguns ou os fungos que estavam dentro do macrófago foram excitados e os macrófagos continuavam vivos.
  - Completa: se todos os fungos internalizados eram excitados (Figura 6)
  - Parcial: quando apenas parte dos fungos eram excitados (Figura 7).

- Exocitose Lítica (Figura 8): quando os fungos internalizados eram liberados dos macrófagos e esse macrófago parava de se movimentar, observamos se o macrófago continuava imóvel por pelo menos mais 2 horas para certificar que ele estava morto.
- Divisão simétrica: o macrófago se dividia e as células filhas apresentavam tamanhos iguais e quantidade de células fúngicas internalizadas semelhante (Figura ).
- Divisão a assimétrica as células filhas apresentavam tamanho e quantidade de células internas significativamente diferentes (Figura ).
- Macrófago vivo quando ele continuava se movimentando até o final das 24 horas e morto quando ele parava de se mexer e não se mexia mais até o fim das 24 horas.
- Transferência de fungo completa quando um macrófago se aproximava da membrana celular do outro e transferia todas as células fúngicas de dentro dele para o outro macrófago adjacente.
- Transferência parcial (Figura 13) quando o macrófago transferia pelo menos um fungo para o outro macrófago, mas não todos os fungos internalizados.

### *Análises estatísticas.*

As análises estatísticas realizadas nesse estudo foram feitas no software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software). Dados considerados significativos quando  $p < 0,05$ . A análise de regressão linear ( $r$ ) através do coeficiente de Pearson foi utilizada para avaliar a correlação dos resultados obtidos entre:

- Exocitose não-lítica;
- Sobrevivência das linhagens fúngicas em macrófagos;
- Crescimento de Capsula;
- Produção de melanina;
- Crescimento dos Isolados.

## RESULTADOS

### **Eventos de exocitose durante a interação dos diferentes isolados de *C. neoformans* com macrófagos J774**

Nas análises das videomicroscopia, observamos a ocorrência de três tipos de exocitose: exocitose não-lítica completa, exocitose não-lítica incompleta e exocitose lítica. Os eventos de exocitose não-lítica foram os mais frequentes nas nossas análises conforme o demonstrado na tabela 1. Podemos observar na figura 9 que os dois controles, as linhagens laboratoriais H99 e B3501 foram as que apresentaram maiores percentual de exocitose não-lítica, 74% e 56% respectivamente. Dos isolados, os que apresentaram maiores percentuais de exocitose não-lítica foram CNF002, com 45%, e CNF003, com 59%. A maioria dos isolados apresentou percentuais de exocitose não-lítica inferior a 50%, em contraste às duas linhagens controle. Houve uma variabilidade considerável nas porcentagens de exocitose não-lítica dos diferentes isolados, semelhantemente ao observado por nosso grupo na análise fenotípica de outros fatores de virulência por esses isolados. A grande variação nos percentuais de exocitose não-lítica entre os isolados também corrobora com o resultados já descritos na literatura que descrevem uma alta variabilidade na exocitose não-lítica entre diferentes linhagens de *Cryptococcus* (Voelz, Lammas, and May 2009; Alvarez and Casadevall 2006; Ma et al. 2006; Johnston and May 2010; Voelz et al. 2010).

Na figura 6 é possível observar um evento de exocitose não-lítica completa, onde todas as células fúngicas internalizadas foram exocitadas e pudemos observar que o macrófago continuava vivo e sem nenhuma célula fúngica internalizada. Já na figura 7 podemos observar um evento de exocitose não-lítica parcial, parte das células internalizadas foram exocitadas e ambas células continuaram vivas.

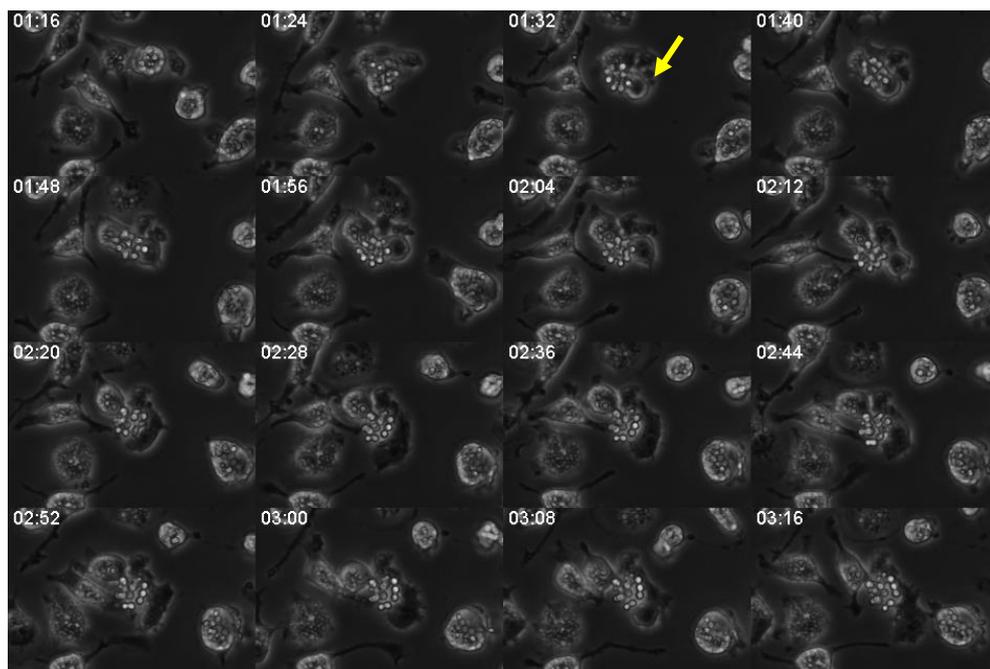


Figura 6: Evento de exocitose não-lítica completa de células de *C. neoformans* após sua internalização por macrófagos J774. As células foram incubadas por um período de 24 horas no Microscópio Invertido Zeiss AxioObserver Z1 e fotografadas a cada 4 minutos em um aumento de 10x para montagem dos vídeos. A seta amarela indica o momento em que o evento de exocitose não-lítica ocorre.

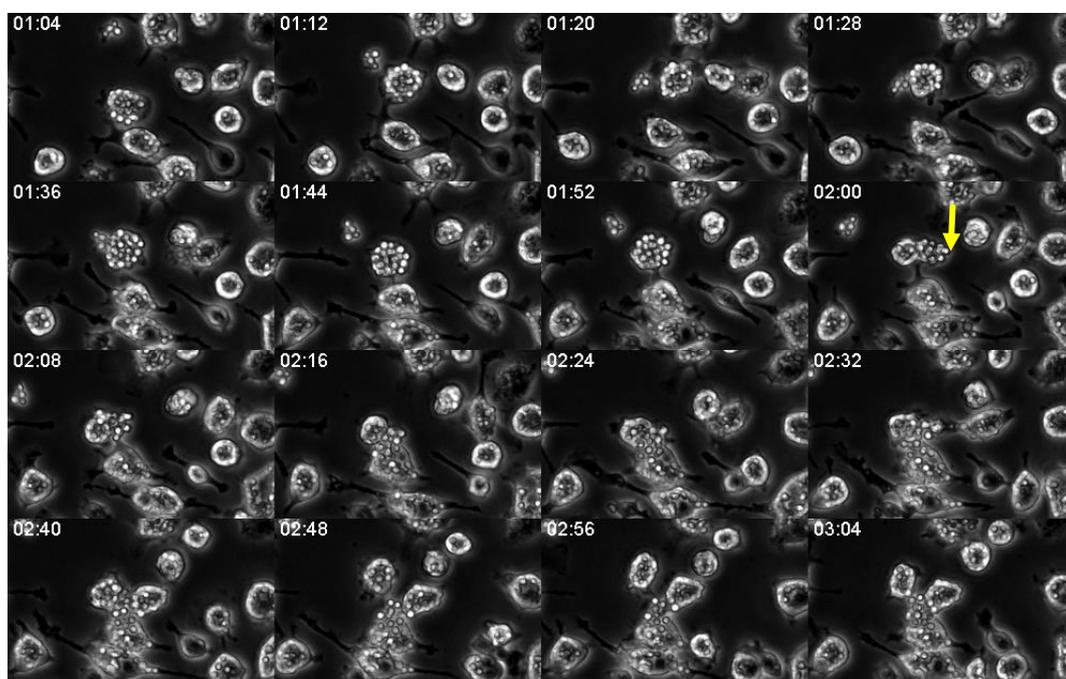


Figura 7: Evento de exocitose não-lítica parcial de células de *C. neoformans* após sua internalização por macrófagos J774. As células foram incubadas por um período de 24 horas no Microscópio Invertido Zeiss AxioObserver Z1 e fotografadas a cada 4 minutos em um aumento de 10x. A seta amarela indica o momento em que o evento de exocitose não-lítica parcial ocorre.

A ocorrência de exocitose lítica de macrófagos na sua interação com os diferentes isolados foi bem pouco frequente e um exemplo desse evento pode ser observado na figura 8. Nesses eventos observamos que os macrófagos paravam de se mexer e as células do fungo internalizadas começam a sair de dentro dele. Na tabela 1, podemos observar que o isolado que apresentou a maior porcentagem de exocitose lítica foi o CNF005, com 19%. A média de exocitose lítica foi de 5,1%, e em geral observamos uma baixa porcentagem baixa ou ausência de lise celular após a interação dos macrófagos com os diferentes isolados. Sendo os desfechos mais comuns a exocitose não-lítica ou a permanência do fungo dentro do macrófago durante as 24 horas de observação.

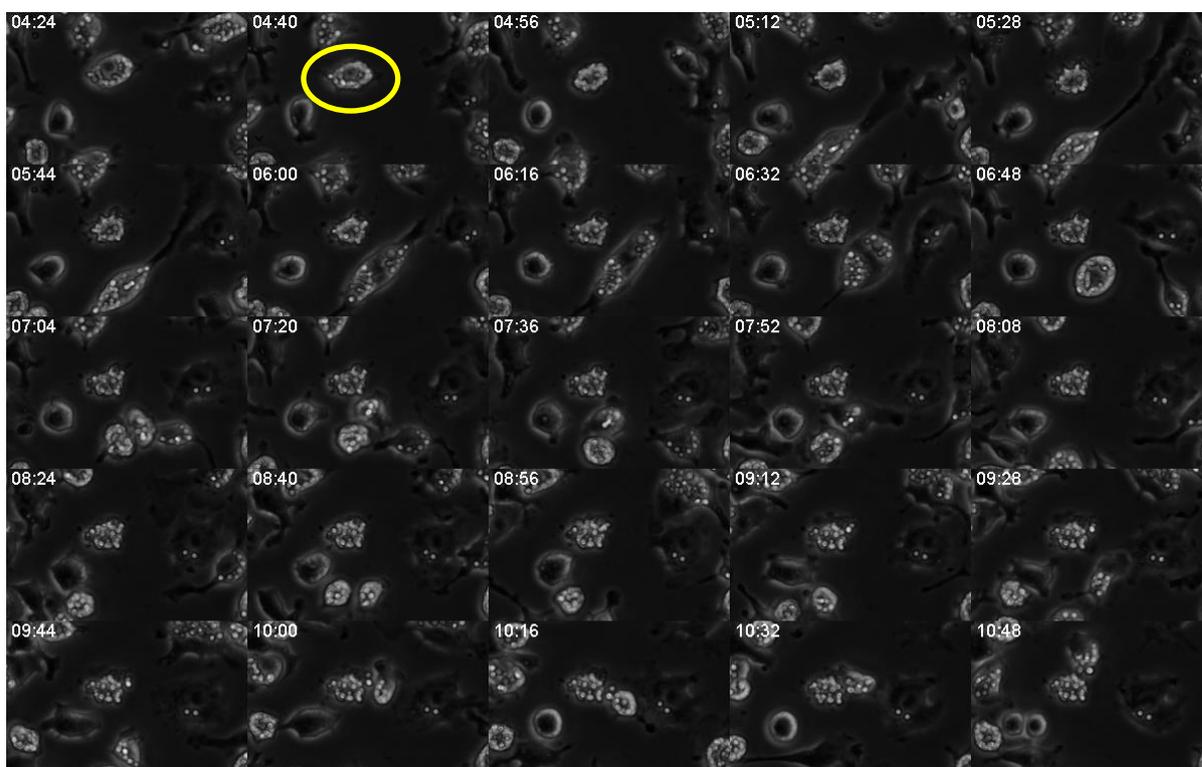


Figura 8: : Evento de exocitose lítica de células de *C. neoformans* após sua internalização por macrófagos J774. As células foram incubadas por um período de 24 horas no Microscópio Invertido Zeiss AxioObserver Z1 e fotografadas a cada 4 minutos em um aumento de 10x.

Tabela 1: Percentual de Exocitose dos diferentes isolados.

Isolado	% Exocitose não-lítica		%Morte lítica
	Completa	Parcial	
<b>H99</b>	50	24	5
<b>B3501</b>	43	16	6
<b>CNF001</b>	7	7	0
<b>CNF002</b>	34	11	8
<b>CNF003</b>	30	29	0
<b>CNF004</b>	7	13	6
<b>CNF005</b>	1	17	19
<b>CNF006</b>	10	13	6
<b>CNF007</b>	12	16	1
<b>CNF008</b>	18	7	0
<b>Média</b>	21.2	15.4	5.1

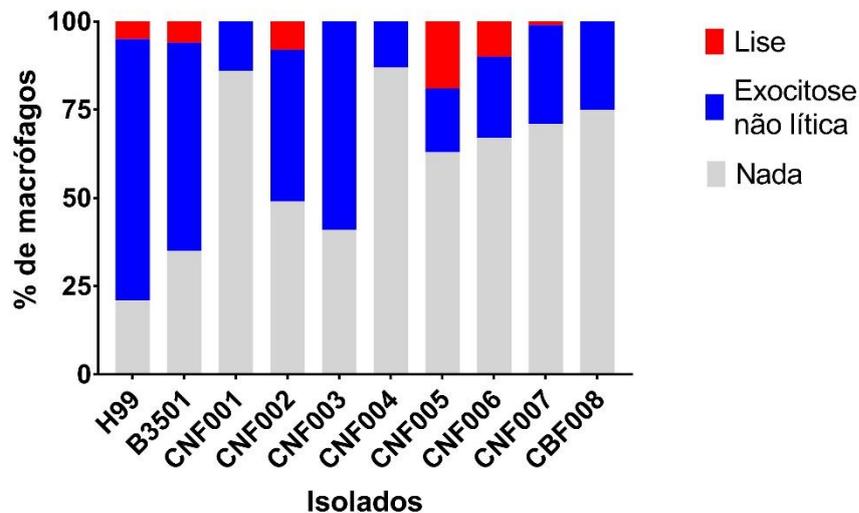


Figura 9: **Desfecho de macrófagos que apresentavam células fúngicas internalizadas.** Foram observados 100 macrófagos de cada evento de interação dos macrófago com os diferentes isolados clínicos de *C. neoformans* analisados. Cada barra completa indica 100% dos macrófagos contabilizados, sendo que as barras vermelhas representam os macrófagos que fizeram exocitose lítica, as barra azuis representam os macrófagos que fizeram exocitose não-lítica, e a barras cinzas representam os macrófagos que não fizeram nenhum dos tipos de exocitose.

Na figura 9, podemos observar além do percentual de eventos de exocitose, o percentual de macrófagos que permaneceram com fungos internalizados durante as 24 horas. Os isolados

CNF004 e o CNF001 foram os isolados que mais frequentemente permaneceram internalizados após a fagocitose nos nossos experimentos.

## Momento de Exocitose

Fizemos uma curva para analisar quanto tempo levava para que ocorresse a exocitose de cada isolado pelos macrófagos. No tempo 0 todos os macrófagos analisados apresentavam células fúngicas internalizadas. Na figura 10 podemos observar a temporalidade dos eventos de exocitose não-lítica de cada um dos isolados. Com o passar do tempo esses macrófagos poderiam fazer exocitose lítica, sendo representados pelas figuras geométricas que aparecem nas curvas, ou fazer exocitose não-lítica, conforme representado pelos degraus das curvas. Observamos que alguns isolados já eram excitados nas primeiras horas da interação, enquanto outros apenas mais tardiamente. Mas observamos a ocorrência de eventos de exocitose não-lítica de todos os isolados antes das primeiras 6 horas e ao longo das 24 horas de observação. O isolado CNF003 apresentou uma curva semelhante as dos controles, enquanto os demais isolados apresentaram menores percentuais de exocitose não-lítica. A variabilidade no percentual de exocitose não lítica de diferentes linhagens de *C. neoformans* já foi descrita por outros pesquisadores (Chrisman, Alvarez, and Casadevall 2010; Ma et al. 2006; Alvarez and Casadevall 2006), onde é também relatado que os eventos de exocitose não-lítica podem ser observados já nas primeiras 2 horas pós o início dos vídeos e até as 24 horas.

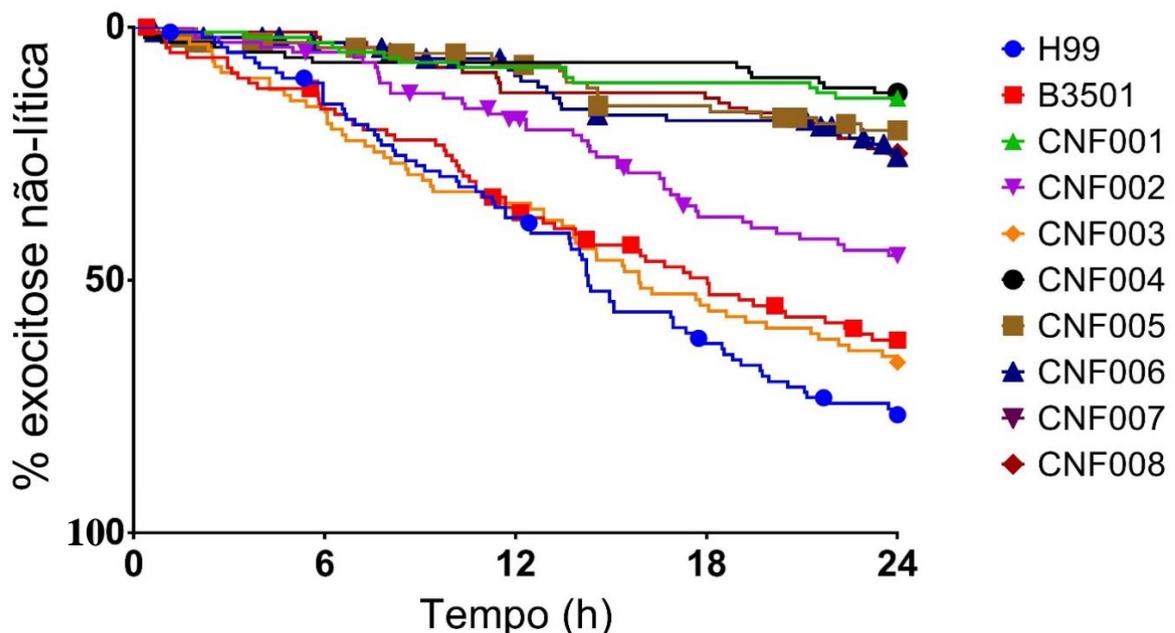


Figura 10: Curva temporal de eventos de exocitose dos diferentes isolados de *C. neoformans* após a sua interação com macrófagos. Registramos o momento em cada evento de exocitose lítica ou não lítica aconteceu durante as 24h de interação dos macrófagos com os diferentes isolados. Os eventos de exocitose lítica estão representados pelos círculos, quadrados, triângulos e losangos nas curvas e a exocitose não-lítica está representada pelos degraus nas curvas.

## Divisão celular de macrófagos que fizeram fagocitose

Observamos a divisão celular de vários macrófagos durante a interação. Essa divisão celular poderia ser simétrica ou assimétrica, conforme demonstrado nas figuras 11 e 12 respectivamente. Conforme observado na tabela 2 observamos um percentual médio de 53.5% de macrófagos que realizaram divisão celular durante a interação com os isolados. Desses, a porcentagem média de divisão simétrica foi de 71.43% e 28.56% de divisão celular assimétrica. Os controles foram os que apresentaram maiores porcentagens de divisão simétrica, aproximadamente 85%.

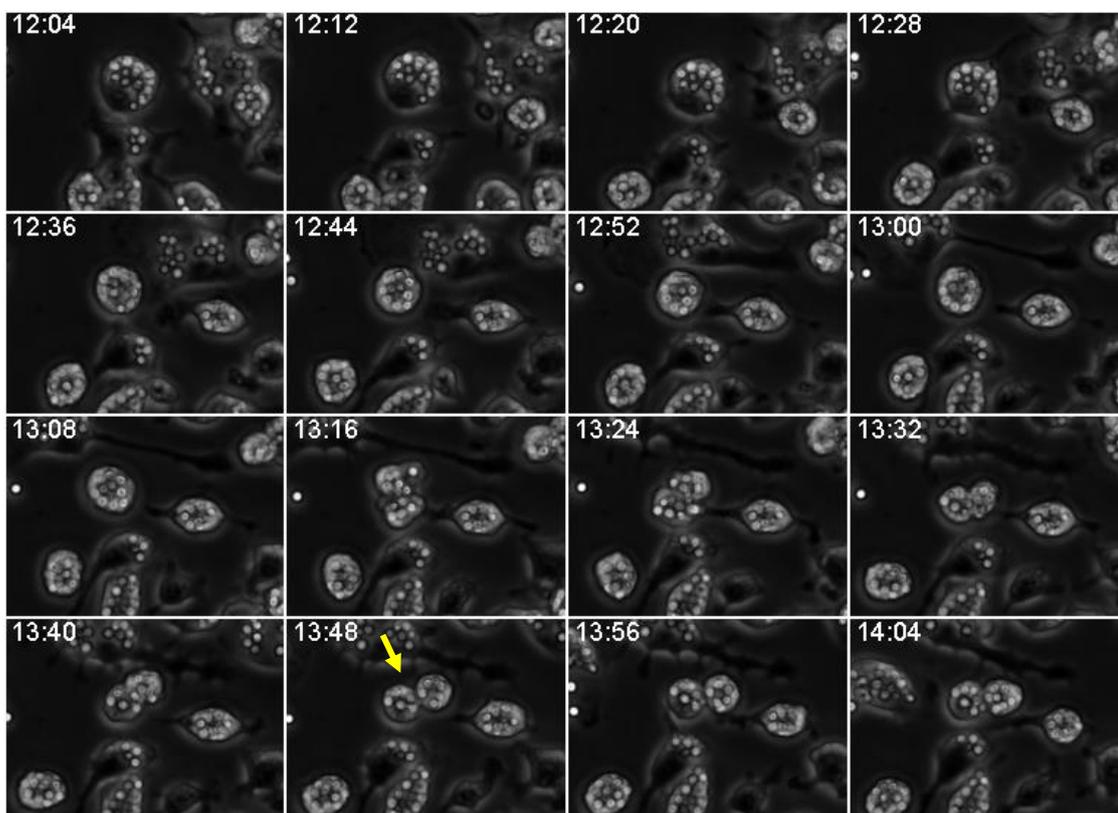


Figura 11: **Evento de divisão simétrica de células de macrófagos J774 com células de *C. neoformans* internalizadas.** As células foram incubadas por um período de 24 horas no Microscópio Invertido Zeiss AxioObserver Z1 e fotografadas a cada 4 minutos em um aumento de 10x. A seta amarela indica o momento em que o evento ocorre.

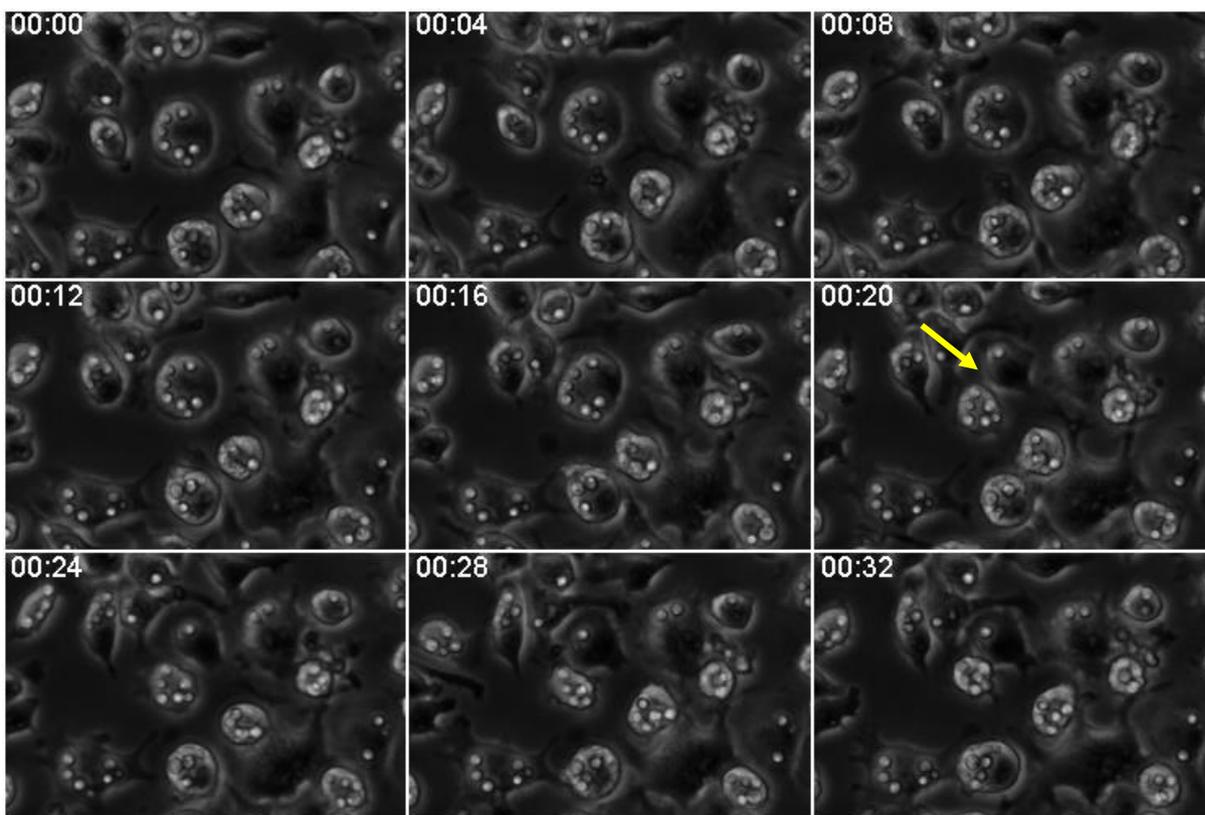


Figura 12: Evento de divisão assimétrica de células de macrófagos J774 com células de *C. neoformans* internalizadas. As células foram incubadas por um período de 24 horas no Microscópio Invertido Zeiss AxioObserver Z1 e fotografadas a cada 4 minutos em um aumento de 10x. A seta amarela indica o momento em que o evento ocorre.

Tabela 2: Avaliação da **divisão celular de macrófagos após a interação com os diferentes isolados de *C. neoformans***.

Isolado	Divisão do macrófago		
	Número total de macrófagos se dividindo	Porcentagem de divisões simétrica	Porcentagem de divisões assimétricas
<b>H99</b>	49	85.71	14.28
<b>B3501</b>	39	82.05	17.94
<b>CNF001</b>	75	64	36
<b>CNF002</b>	46	65.21	34.78
<b>CNF003</b>	37	64.86	35.13
<b>CNF004</b>	51	74.50	25.49
<b>CNF005</b>	54	74.07	25.92
<b>CNF006</b>	53	66.03	33.96
<b>CNF007</b>	66	56.06	43.93
<b>CNF008</b>	65	81.81	18.18
<b>Média</b>	53.5	71.43	28.56

## Transferência de fungos entre macrófagos

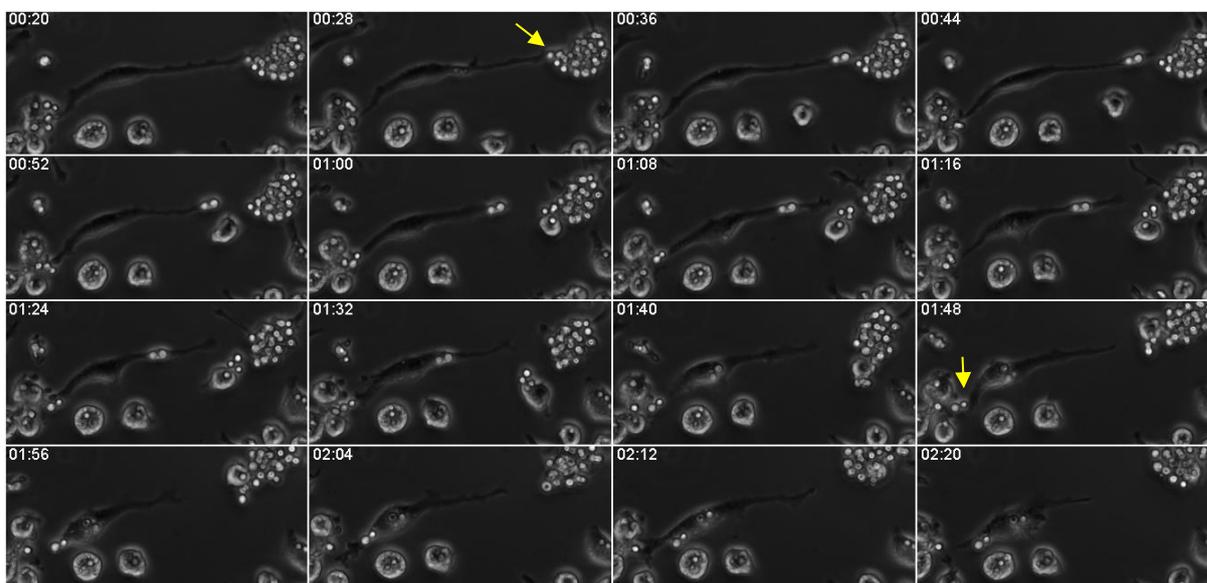


Figura 13: **Transferência de células *C. neoformans* internalizadas entre macrófagos J774.** As células foram incubadas por um período de 24 horas no Microscópio Invertido Zeiss AxioObserver Z1 e fotografadas a cada 4 minutos em um aumento de 10x. A seta amarela indica o momento em que o fungo começa a ser transferido de um macrófago para o outro.

Além de poderem transferir as células fúngicas entre as células filhas após a divisão celular dos macrófagos, também observamos que alguns macrófagos realizavam transferências de fungo(s) para outros macrófagos (Figura 13). Na figura acima 13 podemos observar quando um macrófago transfere células do fungo para um macrófago que está próximo. Esses eventos foram raros e em sua maioria a transferência foi parcial. A transferência de fungos entre macrófagos, assim como a exocitose não-lítica, ainda não são completamente compreendidas, mas a literatura descreve a transferência de fungos por macrófagos como um evento raro conforme observamos em nossos experimentos (Alvarez and Casadevall 2007; Ma et al. 2007).

## A produção de melanina afeta os percentuais de exocitose não-lítica dos isolados clínicos por macrófagos

A avaliação da produção de melanina pelos diferentes isolados por quantificada por outros membros do nosso grupo. Mais especificamente eles observaram que todos os isolados clínicos foram capazes de produzir melanina na presença de L-DOPA, mas tanto a velocidade quanto a quantidade final de melanina produzida variaram bastante entre os diferentes isolados. Fizemos uma análise semi-quantitativa da produção de melanina separando os diferentes isolados em sete grupos de acordo com a velocidade relativa e a intensidade final de melanização. Outro dado que obtivemos da melanina foi o tempo e a velocidade necessária para

que as colônias dos diferentes isolados levavam para atingir a sua coloração máxima. Usando esses valores fizemos uma correlação desses dados de melanização com os dados de exocitose não-lítica das diferentes linhagens e observamos uma correlação positiva entre o grau de melanização e a porcentagem de exocitose não-lítica, onde o valor de p foi de 0.0047, e uma possível correlação positiva entre o percentual de exocitose não-lítica e a velocidade em que cada isolado melaniza, com valor de p de 0.0737. Na Figura 9 podemos observar, no painel esquerdo, que quanto mais escura a colônia do isolado maior a capacidade do fungo de escapar do macrófago por exocitose não-lítica. No painel direito o eixo x apresentamos o EC50 da curva de melanização de cada isolado, ou seja, o tempo em que cada colônia levava para atingir 50% da sua pigmentação máxima. Nesses gráficos é possível observar que os isolados que apresentaram um menor EC50 foram aqueles com os maiores percentuais de exocitose não-lítica.

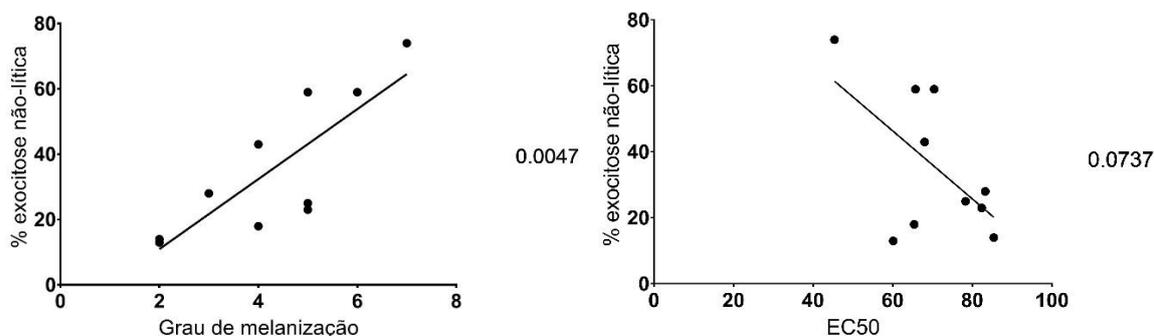


Figura 9: **Correlação entre a melanização dos isolados e o percentual de exocitose não-lítica.** No quadro a esquerda temos a correlação da Exocitose não-lítica com o grau de melanização de cada isolado com valor de p de 0.0047 e  $R^2$  de 0.6524. O quadro a direita mostra a correlação da exocitose não-lítica com a velocidade em que cada isolado melanizava, com valor de p de 0.0737 e  $R^2$  de 0.5046.

## **Diâmetro da cápsula em meios indutores não interferem no percentual de exocitose não-lítica dos isolados clínicos**

A análise de correlação do aumento de cápsula nos diferentes meios de indução com a exocitose não-lítica dos isolados mostrou não haver uma correlação entre o tamanho da cápsula e o percentual de exocitose não-lítica entre os diferentes isolados. Como valor de p foram consideravelmente altos, não acreditamos que a falta de correlação se deva a problemas relacionados ao baixo número de amostras analisadas.

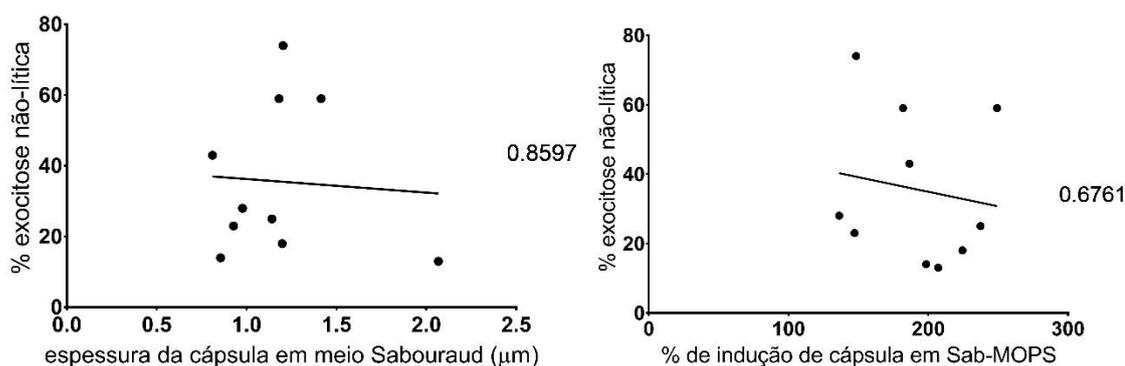


Figura 10: **Correlação entre a espessura de cápsulas dos isolados e a exocitose não-lítica.** No painel a esquerda é apresentada a correlação entre o percentual de exocitose não-lítica com a média da espessura da cápsula de cada isolado em meio Saboraud, com valor de p de 0.8597 e  $R^2$  de 0.004145. No painel a direita observa-se a correlação entre o percentual de exocitose não-lítica com a espessura da cápsula de cada isolado em meio indutor Sab-MOPS, com valor de p de 0.6761 e  $R^2$  de 0.02295.

## **Melhor sobrevivência dos isolados clínicos pós interação com macrófagos podem levar a maior percentual de exocitose não-lítica**

A figura 16 mostra uma correlação positiva da exocitose não-lítica dos isolados com a capacidade de sobrevivência dos diferentes isolados após a sua interação com macrófagos, com valor de p de 0.0186. Quanto maior a capacidade de fungo sobreviver dentro dos macrófagos maior foi a taxa de exocitose não-lítica desse isolado. A exocitose não-lítica é um processo caracterizado pela liberação do fungo do interior de macrófagos em uma situação em que ambas as células continuam vivas e descrita como rara ou ausente quando o fungo está morto. Além disso, a permanência do fungo dentro do macrófago durante seu período de latência seria uma maneira desse microrganismo evitar o reconhecimento pelo sistema imunológico. Quando esse patógeno recebe sinais de que o sistema imunológico está menos funcional, o fungo sai da sua latência, proliferando-se e podendo causar danos ao hospedeiro. Dessa maneira, esperávamos que linhagens que sobrevivessem melhor dentro do macrófago conseguissem “escapar” mais frequentemente do interior dos macrófagos pela exocitose não-lítica.

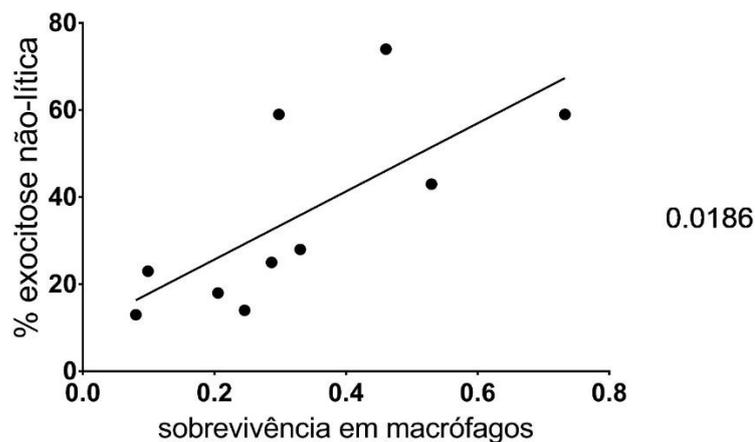


Figura 11: **Correlação entre a taxa de exocitose não-lítica e a sobrevivência dos isolados em macrófagos.** O gráfico mostra uma correlação positiva entre o percentual de exocitose não-lítica e a capacidade do isolado clínico de sobreviver no macrófago, com valor de p de 0.0186 e  $R^2$  de 0.5199.

## Correlação entre Crescimento do fungo e Exocitose não-lítica

Para essa análise fizemos a curva de crescimento de cada isolado e utilizamos os diferentes valores de inclinação da curva para comparação. Esses valores refletem o quão rápido cada isolado se duplica durante a fase exponencial. Na figura 17, podemos observamos uma possível correlação inversa entre esses dois fatores. Quanto mais rápido é a velocidade de crescimento de cada isolado durante o seu crescimento exponencial, menor é a porcentagem de exocitose não-lítica desse isolados pelos macrófagos.

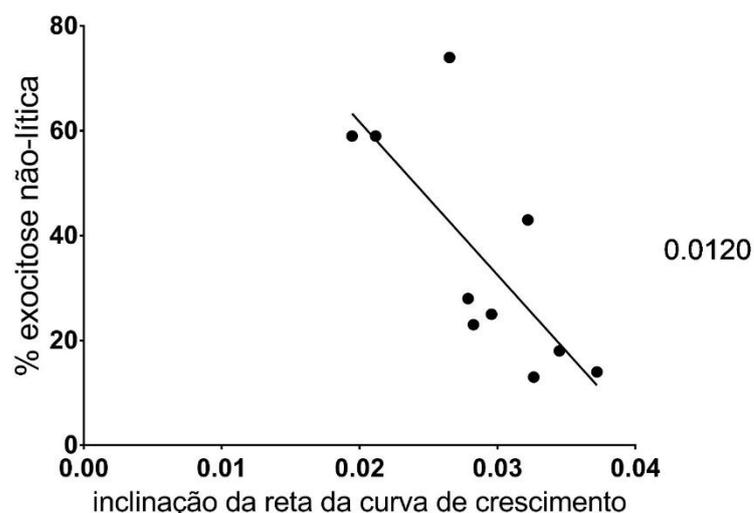


Figura 12: **Correlação entre o crescimento do *C. neoformans* e exocitose não-lítica.** O painel mostra uma correlação negativa entre o percentual de exocitose não-lítica e a velocidade de crescimento de cada isolado, com valor de p de 0.0120 e  $R^2$  de 0.5662.

## DISCUSSÃO

*Cryptococcus* spp é um patógeno importante por estar distribuído mundialmente e por causar uma doença potencialmente fatal. Apesar de termos bastante informações sobre esse fungo, ainda há muito o que se estudar. Os países com maior número de casos contam com uma infraestrutura de diagnóstico e tratamento precário, além de profissionais da saúde por falta costume, quando os pacientes chegam até eles com os sintomas, tendem a não pensar que esses pacientes possivelmente apresentem uma micose sistêmica. Isso leva a um atraso no diagnóstico e no tratamento dessas micoses, que por consequência diminuem as chances dos pacientes se recuperarem dessa infecção.

Nosso grupo tem dedicado esforços para estudar diversos fatores de virulência de isolados clínicos para que possa nos ajudar a entender melhor a dinâmica da criptococose. A exocitose não-lítica foi descrita a pouco mais de uma década (Ma et al. 2006; Alvarez and Casadevall 2006), mas ainda existem muitas perguntas a respeito desse processo. Nossos resultados confirmaram alguns achados já descritos na literatura como a cinética de ocorrência de exocitose, a qual não ocorre essencialmente no início ou no final da interação fungo-fagócito e sim em momentos variados da interação (Alvarez and Casadevall 2006; Ma et al. 2006; Johnston and May 2010; Voelz et al. 2010).

Outra observação que fizemos é que porcentagem de expulsão do fungo por macrófagos pode variar bastante entre diferentes isolados, ou linhagens fúngicas. Durante a análise dos vídeos observamos que as células fúngicas permaneciam dentro do macrófago por um tempo, quando células fúngicas se aproximavam dos macrófagos, pouco tempo depois ocorria exocitose não-lítica. Esses fngos que se aproximavam dos macrófagos podiam ser, tanto células remanescentes que ficaram fora dos macrófagos, quanto células que haviam sido excitadas.

Nesse trabalho conseguimos visualizar uma possível correlação entre a expressão de alguns fatores de virulência com a exocitose não-lítica. A melanina é um fator de virulência do *Cryptococcus neoformans*, porém não é um fator exclusivo desse fungo. A melanina confere ao fungo confere proteção da ação microbicida de NO dentro dos fagócitos (van Duin, Casadevall, and Nosanchuk 2002; Reiko Ikeda et al. 2003) e os auxilia a sobreviver nesse ambiente hostil e também confere maior resistência aos fármacos atualmente utilizados na terapia da criptococose (Polacheck, Hering, and Kwon-Chung 1982) Não existem estudos que relacionem a produção de melanina com a exocitose não-lítica. No nosso teste observamos uma relação uma correlação entre a intensidade melanização dos isolados e a exocitose não-lítica, as linhagens que apresentação pigmentação mais intensa induziram uma maior porcentagem de exocitose não-lítica. Além da intensidade da pigmentação, o tempo que cada isolado leva para melanizar parece ser importante. Estudos adicionais precisam ser realizados para podermos entender melhor o papel da melanização do fungo nesse processo.

O *C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo. Ele possui mecanismos para sobreviver dentro dos macrófagos do hospedeiro e também para escapar dessas células quando

lhe for favorável. Nossos dados sobre a interação dos isolados com macrófagos indicaram que os isolados que sobreviveram melhor a essa interação foram os que tiveram maior capacidade de realizar exocitose não-lítica. Esse resultado era esperado uma vez que para que ocorra a exocitose não-lítica as células precisam interagir com o macrófago e ambas permanecerem vivas. Esses dados poderiam sugerir que a exocitose não-lítica não seja favorável ao fungo, uma vez que o escape de dentro dos macrófagos poderia levar ao reconhecimento do fungo e ativação dos mecanismos efetores para eliminação desse patógeno. No entanto, quando o *C. neoformans* sai de dentro dos macrófagos por meio da exocitose não-lítica, não há a liberação de fatores pró-inflamatórios em resposta à exposição de DAMPs, permitindo ao fungo continuar evitando o seu reconhecimento pelo sistema imunológico. Por sua vez, durante a exocitose lítica dos fungos, a lise do macrófago desencadeia a produção de moléculas pro-inflamatórias aumentando as chances de reconhecimento do fungo pelas células do sistema imune.

A capsula do *C. neoformans* é um dos fatores de virulência mais estudados na interação desse fungo com o hospedeiro e também no seu ambiente natural (O'Meara and Andrew Alspaugh 2012). Sabemos que a capsula serve como proteção para o fungo, sendo um mecanismo de evitar o reconhecimento fúngico pela exposição de PAMPs da parede celular. Dessa maneira, a fagocitose desse fungo é pouco eficiente na ausência de opsoninas. A cápsula também apresenta um papel na proteção do fungo contra moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio. Sabe-se ainda que o fungo apresenta a capacidade de modular o tamanho da sua cápsula em resposta a diferentes fatores ambientais. Considerando-se o papel protetor dessa estrutura, imaginaríamos que fungos com uma cápsula mais espessa estariam mais protegidos no interior dos macrófagos e conseguiriam permanecer por mais tempo dentro dessas células e possivelmente poderiam ter uma maior capacidade de induzir a exocitose não-lítica. Na revisão de Johnston e colaboradores, os autores sugerem que mutantes acapsulares apresentam baixas percentuais de exocitose não-lítica devido a baixa capacidade de sobrevivência dessas células no interior de macrófagos (Johnston and May 2013). No entanto, nossos dados não demonstraram uma correlação entre o tamanho da cápsula e as percentuais de exocitose não-lítica dos isolados. Esses dados poderiam sugerir que embora a presença da cápsula seja importante para a ocorrência de exocitose não-lítica, o tamanho da cápsula não seja determinante para esse processo. A falta de correlação pode ser devido a diferença dos meios que foram testados os dois parâmetros. A exocitose não-lítica foi feita em meio DMEM, um meio significativamente mais rico, enquanto a indução de cápsula foi feita em meio Sabouraud-MOPS. Alguns estudos já haviam demonstrado que a virulência desse patógenos não se correlacionado com o tamanho da capsula *in vitro* e essa falta de correlação pode ser devido ao fato de o microambiente *in vivo* seja diferente do *in vivo* (Clancy et al. 2006; Dykstra, Friedman, and Murphy 1977). Uma outra hipótese é de que possa haver uma modulação da capsula dos isolados dentro do macrófagos e talvez esses dado pode ter uma correlação com a exocitose não-lítica dos isolados.

Com base na literatura e nos dados que obtivemos até agora consideramos a exocitose não-lítica um processo multifatorial. Nossos resultados sugerem um papel importante e ainda não descrito da melanização fúngica nesse processo, uma vez que tanto a capacidade de produzir esse pigmento, quanto a velocidade de melanização parecem se correlacionar com a

exocitose não-lítica dos isolados clínicos. Pretendemos testar os efeitos dessa molécula utilizando linhagens mutantes para a produção desse pigmento a fim de melhor avaliarmos os efeitos dessa molécula no processo de exocitose não-lítica.

Gostaríamos de finalizar revelando que atualmente nosso grupo tem cerca de 100 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. e que com o prosseguimento das análises, com a inclusão de um número maior de isolados possamos estabelecer melhor as correlações entre a expressão de determinados fenótipos fúngicos com a exocitose não-lítica, e futuramente com os dados clínicos dos pacientes dos quais essas amostras foram provenientes.

## CONCLUSÃO

Os isolados clínicos de *C. neoformans* demonstraram, em nossos experimentos, o quão variadas essas linhagens são, através da oscilação dos resultados nos fatores de virulência estudados. Em especial a exocitose não lítica, observamos que mesmo ocorrendo em percentuais variadas, ela ocorre em todos os isolados. Além de ser mais frequente do que a lise dos macrófagos.

Alguns fatores possivelmente são importantes para que ocorra exocitose não-lítica como a capacidade de sobreviver nos macrófagos e a produção de melanina. No entanto, mesmo a capsula sendo descrita como um dos principais fatores de virulência desse fungo, o tamanho dela aparentemente não é determinante para que ocorra a exocitose não-lítica, mas sabemos que a capsula é importante na virulência do *C. neoformans*, pois vários estudos já demonstraram como a capsula é importante para que o fungo se estabeleça no hospedeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, Abul K., Andrew H. H. Lichtman, Shiv. Pillai, David L. (Medical illustrator) Baker, and Alexandra. Baker. 2015. *Imunologia Celular E Molecular*. Elsevier. <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=n2HuCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=abbas+imunologia+celular+8ed&ots=guBO4dspWa&sig=Vi4wzrPfJXUWz-ydwdlgStAooCA#v=onepage&q=abbas+imunologia+celular+8ed&f=false>.
- Alvarez, Mauricio, and Arturo Casadevall. 2006. "Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus Neoformans* Phagocytosis by Macrophages." *Current Biology* 16 (21):2161–65. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.061>.
- . 2007. "Cell-to-Cell Spread and Massive Vacuole Formation after *Cryptococcus Neoformans* Infection of Murine Macrophages." *BMC Immunology* 8 (1):16. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-16>.
- Bain, Judith M., Leanne E. Lewis, Blessing Okai, Janet Quinn, Neil A.R. Gow, and Lars-Peter Erwig. 2012. "Non-Lytic Expulsion/exocytosis of *Candida Albicans* from Macrophages." *Fungal Genetics and Biology* 49 (9):677–78. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.01.008>.
- Barnett, James A. 2010. "A History of Research on Yeasts 14:1 Medical Yeasts Part 2, *Cryptococcus Neoformans*." *Yeast (Chichester, England)* 27 (10):875–904. <https://doi.org/10.1002/yea.1786>.
- Bielska, Ewa, and Robin C. May. 2016. "What Makes *Cryptococcus Gattii* a Pathogen?" *FEMS Yeast Research* 16 (1):fov106. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov106>.
- Brilhante, Raimunda S. N., Jaime D. A. España, Lucas P. de Alencar, Vandbergue S. Pereira, Débora de S. C. M. Castelo-Branco, Waldemiro de A. Pereira-Neto, Rossana de A. Cordeiro, José J. C. Sidrim, and Marcos F. G. Rocha. 2017. "An Alternative Method for the Analysis of Melanin Production in *Cryptococcus Neoformans Sensu Lato* and *Cryptococcus Gattii Sensu Lato*." *Mycoses* 60 (10):697–702. <https://doi.org/10.1111/myc.12650>.
- Bryan, R. A., O. Zaragoza, T. Zhang, G. Ortiz, A. Casadevall, and E. Dadachova. 2005. "Radiological Studies Reveal Radial Differences in the Architecture of the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus Neoformans*." *Eukaryotic Cell* 4 (2):465–75. <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.465-475.2005>.
- Buchanan, Kent, and J W Murphy. 1998. "What Makes *Cryptococcus Neoformans* a Pathogen?" *Emerging Infectious Diseases* 4 (1):71–83. <https://doi.org/10.3201/eid0401.980109>.
- Carnell, Michael, Tobias Zech, Simon D. Calaminus, Seiji Ura, Monica Hagedorn, Simon A. Johnston, Robin C. May, Thierry Soldati, Laura M. Machesky, and Robert H. Insall. 2011. "Actin Polymerization Driven by WASH Causes V-ATPase Retrieval and Vesicle Neutralization before Exocytosis." *Journal of Cell Biology* 193 (5):831–39. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009119>.
- Charlier, Caroline, Kirsten Nielsen, Samira Daou, Madly Brigitte, Fabrice Chretien, and

- Françoise Dromer. 2009. "Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus Neoformans*." *Infection and Immunity* 77 (1):120–27. <https://doi.org/10.1128/IAI.01065-08>.
- Chaskes, S, and R L Tyndall. 1975. "Pigment Production by *Cryptococcus Neoformans* from Para- and Ortho-Diphenols: Effect of the Nitrogen Source." *Journal of Clinical Microbiology* 1 (6). American Society for Microbiology (ASM):509–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1100669>.
- Chayakulkeeree, Methee, Simon Andrew Johnston, Johanes Bijosono Oei, Sophie Lev, Peter Richard Williamson, Christabel Frewen Wilson, Xiaoming Zuo, et al. 2011. "SEC14 Is a Specific Requirement for Secretion of Phospholipase B1 and Pathogenicity of *Cryptococcus Neoformans*." *Molecular Microbiology* 80 (4). NIH Public Access:1088–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07632.x>.
- Chen, S C, M Muller, J Z Zhou, L C Wright, and T C Sorrell. 1997. "Phospholipase Activity in *Cryptococcus Neoformans*: A New Virulence Factor?" *The Journal of Infectious Diseases* 175 (2):414–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203663>.
- Chrisman, Cara J., Patricia Albuquerque, Allan J. Guimaraes, Edward Nieves, and Arturo Casadevall. 2011. "Phospholipids Trigger *Cryptococcus Neoformans* Capsular Enlargement during Interactions with Amoebae and Macrophages." Edited by Christina M. Hull. *PLoS Pathogens* 7 (5). Public Library of Science:e1002047. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002047>.
- Chrisman, Cara J., Mauricio Alvarez, and Arturo Casadevall. 2010. "Phagocytosis of *Cryptococcus Neoformans* By, and Nonlytic Exocytosis From, *Acanthamoeba Castellani*." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (18):6056–62. <https://doi.org/10.1128/AEM.00812-10>.
- Clancy, C. J., M Hong Nguyen, Ruth Alandoerffer, Shaoji Cheng, Kenneth Iczkowski, Malcolm Richardson, and John R Graybill. 2006. "*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* 152 (8):2247–55. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28798-0>.
- Coelho, Carolina, Anamelia L. Bocca, and Arturo Casadevall. 2014. "The Intracellular Life of *Cryptococcus Neoformans*." *Annu Rev Pathol* 9 (1):219–38. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104653>.
- Cogliati, Massimo. 2013. "Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus Neoformans* and *Cryptococcus Gattii*: An Atlas of the Molecular Types." *Scientifica* 2013 (serotype D):675213. <https://doi.org/10.1155/2013/675213>.
- Cox, G M, H C McDade, S C Chen, S C Tucker, M Gottfredsson, L C Wright, T C Sorrell, et al. 2001. "Extracellular Phospholipase Activity Is a Virulence Factor for *Cryptococcus Neoformans*." *Molecular Microbiology* 39 (1):166–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123698>.
- Cox, G M, J Mukherjee, G T Cole, A Casadevall, and J R Perfect. 2000. "Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis." *Infection and Immunity* 68 (2). American Society for Microbiology:443–48. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.443-448.2000>.

- Decken, K, G Köhler, K Palmer-Lehmann, A Wunderlin, F Mattner, J Magram, M K Gately, and G Alber. 1998. "Interleukin-12 Is Essential for a Protective Th1 Response in Mice Infected with *Cryptococcus Neoformans*." *Infection and Immunity* 66 (10). American Society for Microbiology:4994–5000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746609>.
- Diamond, R D, and J E Bennett. 1973. "Growth of *Cryptococcus Neoformans* within Human Macrophages in Vitro." *Infection and Immunity* 7 (2). American Society for Microbiology:231–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4697791>.
- Djordjevic, Julianne T, Maurizio Del Poeta, Tania C Sorrell, Kylie M Turner, and Lesley C Wright. 2005. "Secretion of Cryptococcal Phospholipase B1 (PLB1) Is Regulated by a Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchor." *The Biochemical Journal* 389 (Pt 3). Portland Press Limited:803–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20050063>.
- Dromer, Françoise, and Stuart M. Levitz. 2011. "Invasion of *Cryptococcus* into the Central Nervous System." In *Cryptococcus*, 465–71. American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555816858.ch34>.
- Duin, David van, Arturo Casadevall, and Joshua D Nosanchuk. 2002. "Melanization of *Cryptococcus Neoformans* and *Histoplasma Capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (11). American Society for Microbiology (ASM):3394–3400. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3394-3400.2002>.
- Dyken, Steven J. Van, Alexander Mohapatra, Jesse C. Nussbaum, Ari B. Molofsky, Emily E. Thornton, Steven F. Ziegler, Andrew N.J. McKenzie, Matthew F. Krummel, Hong Erh Liang, and Richard M. Locksley. 2014. "Chitin Activates Parallel Immune Modules That Direct Distinct Inflammatory Responses via Innate Lymphoid Type 2 and  $\Gamma\delta$  T Cells." *Immunity* 40 (3). Elsevier Inc.:414–24. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.003>.
- Dykstra, M A, L Friedman, and J W Murphy. 1977. "Capsule Size of *Cryptococcus Neoformans*: Control and Relationship to Virulence." *Infection and Immunity* 16 (1). American Society for Microbiology (ASM):129–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/326665>.
- Eastman, Alison J, Xiumiao He, Yafeng Qiu, Michael J Davis, Priya Vedula, Daniel M Lyons, Yoon-Dong Park, et al. 2015. "Cryptococcal Heat Shock Protein 70 Homolog Ssa1 Contributes to Pulmonary Expansion of *Cryptococcus Neoformans* during the Afferent Phase of the Immune Response by Promoting Macrophage M2 Polarization." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (12):5999–6010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402719>.
- Eaton, K A, C L Brooks, D R Morgan, and S Krakowka. 1991. "Essential Role of Urease in Pathogenesis of Gastritis Induced by *Helicobacter Pylori* in Gnotobiotic Piglets." *Infection and Immunity* 59 (7). American Society for Microbiology (ASM):2470–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2050411>.
- Emmons, C W. 1955. "Saprophytic Sources of *Cryptococcus Neoformans* Associated with the Pigeon (*Columba Livia*)." *American Journal of Hygiene* 62 (3):227–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13268414>.
- Feder, Vanessa, Lívia Kmetzsch, Charley Christian Staats, Natalia Vidal-Figueiredo, Rodrigo Ligabue-Braun, Céilia Regina Carlini, and Marilene Henning Vainstein. 2015.

- “*Cryptococcus Gattii* Urease as a Virulence Factor and the Relevance of Enzymatic Activity in Cryptococcosis Pathogenesis.” *FEBS Journal* 282 (8):1406–18. <https://doi.org/10.1111/febs.13229>.
- Feldmesser, Marta, Yvonne Kress, and Arturo Casadevall. 2001. “Dynamic Changes in the Morphology of *Cryptococcus Neoformans* during Murine Pulmonary Infection.” *Microbiology* 1258 (147):33–2355. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2355>.
- Fels, A O, and Z A Cohn. 1986. “The Alveolar Macrophage.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 60 (2):353–69. <https://doi.org/10.1152/jappl.1986.60.2.353>.
- García-Rodas, Rocío, Fernando González-Camacho, Juan Luis Rodríguez-Tudela, Manuel Cuenca-Estrella, and Oscar Zaragoza. 2011. “The Interaction between *Candida Krusei* and Murine Macrophages Results in Multiple Outcomes, Including Intracellular Survival and Escape from Killing.” Edited by G. S. Deepe. *Infection and Immunity* 79 (6):2136–44. <https://doi.org/10.1128/IAI.00044-11>.
- Gilbert, Andrew S, Paula I Seoane, Poppy Sephton-Clark, Aleksandra Bojarczuk, Richard Hotham, Emanuele Giurisato, Adil R Sarhan, et al. 2017. “Vomocytosis of Live Pathogens from Macrophages Is Regulated by the Atypical MAP Kinase ERK5.” *Science Advances* 3 (8). American Association for the Advancement of Science:e1700898. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700898>.
- Goldman, David L, Hnin Khine, Jacob Abadi, Dania J Lindenberg, Liise-anne Pirofski, Ramata Niang, and Arturo Casadevall. 2001. “Serologic Evidence for *Cryptococcus Neoformans* Infection in Early Childhood” 107 (5):1–8.
- Grupo de Consenso de Criptococose. 2008. “Consenso Em Criptococose - 2008.” *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41 (5):524–44. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500022>.
- Hagen, Ferry, Kantarawee Khayhan, Bart Theelen, Anna Kolecka, Itzhack Polacheck, Edward Sionov, Rama Falk, Sittiporn Parnmen, H. Thorsten Lumbsch, and Teun Boekhout. 2015. “Recognition of Seven Species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus Neoformans* Species Complex.” *Fungal Genetics and Biology* 78 (May). Academic Press:16–48. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2015.02.009>.
- Hernández-Chávez, Marco, Luis Pérez-García, Gustavo Niño-Vega, and Héctor Mora-Montes. 2017. “Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition.” *Journal of Fungi* 3 (4):51. <https://doi.org/10.3390/jof3040051>.
- Ikeda, R, T Shinoda, T Morita, and E S Jacobson. 1993. “Characterization of a Phenol Oxidase from *Cryptococcus Neoformans* Var. *Neoformans*.” *Microbiology and Immunology* 37 (10):759–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8289682>.
- Ikeda, Reiko, Takashi Sugita, Eric S. Jacobson, and Takako Shinoda. 2003. “Effects of Melanin upon Susceptibility of *Cryptococcus* to Antifungals.” *Microbiology and Immunology* 47 (4):271–77. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03395.x>.
- Jacobson, E S, and G M Compton. 1996. “Discordant Regulation of Phenoloxidase and Capsular Polysaccharide in *Cryptococcus Neoformans*.” *Journal of Medical and Veterinary Mycology : Bi-Monthly Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 34 (4):289–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873890>.

- James, P. G., and R. Cherniak. 1992. "Galactoxylomannans of *Cryptococcus Neoformans*." *Infection and Immunity* 60 (3):1084–88.
- Jesus, Magdia De, André Moraes Nicola, Marcio L Rodrigues, Guilhem Janbon, and Arturo Casadevall. 2009. "Capsular Localization of the *Cryptococcus Neoformans* Polysaccharide Component Galactoxylomannan." *Eukaryotic Cell* 8 (1). American Society for Microbiology:96–103. <https://doi.org/10.1128/EC.00331-08>.
- Johnston, Simon A., and Robin C. May. 2010. "The Human Fungal Pathogen *Cryptococcus Neoformans* Escapes Macrophages by a Phagosome Emptying Mechanism That Is Inhibited by arp2/3 Complex-Mediated Actin Polymerisation." *PLoS Pathogens* 6 (8):27–28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001041>.
- . 2013. "Cryptococcus Interactions with Macrophages: Evasion and Manipulation of the Phagosome by a Fungal Pathogen." *Cellular Microbiology* 15 (3):403–11. <https://doi.org/10.1111/cmi.12067>.
- Kelly, Ryan M., Jianmin Chen, Lauren E. Yauch, and Stuart M. Levitz. 2005. "Opsonic Requirements for Dendritic Cell-Mediated Responses to *Cryptococcus Neoformans*." *Infection and Immunity* 73 (1):592–98. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.592-598.2005>.
- Kraus, P. R., M.-J. Boily, S. S. Giles, J. E. Stajich, A. Allen, G. M. Cox, F. S. Dietrich, J. R. Perfect, and J. Heitman. 2004. "Identification of *Cryptococcus Neoformans* Temperature-Regulated Genes with a Genomic-DNA Microarray." *Eukaryotic Cell* 3 (5):1249–60. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1249-1260.2004>.
- Kwon-Chung, K J, W K Tom, and J L Costa. 1983. "Utilization of Indole Compounds by *Cryptococcus Neoformans* to Produce a Melanin-like Pigment." *Journal of Clinical Microbiology* 18 (6). American Society for Microbiology (ASM):1419–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6418759>.
- Kwon-Chung, Kyung J, James A Fraser, Tamara L Doering, Zhou Wang, Guilhem Janbon, Alexander Idnurm, and Yong-Sun Bahn. 2014. "*Cryptococcus Neoformans* and *Cryptococcus Gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4 (7). Cold Spring Harbor Laboratory Press:a019760. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760>.
- Leopold Wager, Chrissy M., Camaron R. Hole, Karen L. Wozniak, and Floyd L. Wormley. 2016. "Cryptococcus and Phagocytes: Complex Interactions That Influence Disease Outcome." *Frontiers in Microbiology* 7 (February):1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00105>.
- Levitz, S M, S H Nong, K F Seetoo, T S Harrison, R A Speizer, and E R Simons. 1999. "Cryptococcus Neoformans Resides in an Acidic Phagolysosome of Human Macrophages." *Infection and Immunity* 67 (2):885–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916104>.
- Lima, Cristiane Tavares de, Gabriel Baracy Klafke, and Melissa Orzechowski Xavier. 2015. "Cryptococcus Spp. Em Excretas de Columba Livia (Pombos Domésticos) Provenientes de Um Hospital Universitário No Sul Do Brasil." *Arquivos Do Instituto Biológico* 82:1–4. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001072013>.
- Ma, Hansong, Joanne E. Croudace, David A. Lammas, and Robin C. May. 2006. "Expulsion

- of Live Pathogenic Yeast by Macrophages.” *Current Biology* 16 (21):2156–60. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.032>.
- Ma, Hansong, Joanne E Croudace, David A Lammas, and Robin C May. 2007. “Direct Cell-to-Cell Spread of a Pathogenic Yeast.” *BMC Immunology* 8 (1):15. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-15>.
- Ma, Hansong, and Robin C. May. 2009. “Chapter 5 Virulence in Cryptococcus Species.” *Advances in Applied Microbiology* 67 (January). Academic Press:131–90. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)01005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)01005-8).
- Maxson, Michelle E., Emily Cook, Arturo Casadevall, and Oscar Zaragoza. 2007. “The Volume and Hydration of the Cryptococcus Neoformans Polysaccharide Capsule.” *Fungal Genetics and Biology* 44 (3):180–86. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.07.010>.
- May, Robin C., Neil R.H. Stone, Darin L. Wiesner, Tihana Bicanic, and Kirsten Nielsen. 2016. “Cryptococcus: From Environmental Saprophyte to Global Pathogen.” *Nature Reviews Microbiology* 14 (2). Nature Publishing Group:106–17. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>.
- Missall, Tricia A, Jason M Moran, John A Corbett, and Jennifer K Lodge. 2005. “Distinct Stress Responses of Two Functional Laccases in Cryptococcus Neoformans Are Revealed in the Absence of the Thiol-Specific Antioxidant Tsa1.” *Eukaryotic Cell* 4 (1). American Society for Microbiology (ASM):202–8. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.202-208.2005>.
- Nakamura, Kiwamu, Kazuya Miyagi, Yoshinobu Koguchi, Yuki Kinjo, Kaori Uezu, Takeshi Kinjo, Morikazu Akamine, et al. 2006. “Limited Contribution of Toll-like Receptor 2 and 4 to the Host Response to a Fungal Infectious Pathogen, Cryptococcus Neoformans.” *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 47 (1):148–54. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00078.x>.
- Nicola, André Moraes, and Arturo Casadevall. 2011. “Estudo de Fatores Associados À Virulência E Imunidade Na Interação Entre Macrófagos E Cryptococcus Neoformans.”
- Nicola, André Moraes, and Emma J Robertson. 2011. “Nonlytic Exocytosis of Cryptococcus Neoformans from Macrophages.” *mBio* 2 (4):1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00167-11.Editor>.
- Nosanchuk, J D, and A Casadevall. 1997. “Cellular Charge of Cryptococcus Neoformans: Contributions from the Capsular Polysaccharide, Melanin, and Monoclonal Antibody Binding.” *Infection and Immunity* 65 (5):1836–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125569>.
- Noverr, Mairi C, Gary M Cox, John R Perfect, and Gary B Huffnagle. 2003. “Role of PLB1 in Pulmonary Inflammation and Cryptococcal Eicosanoid Production.” *Infection and Immunity* 71 (3):1538–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595473>.
- O’Meara, Teresa R., and J. Andrew Alspaugh. 2012. “The Cryptococcus Neoformans Capsule: A Sword and a Shield.” *Clinical Microbiology Reviews* 25 (3):387–408. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-12>.
- Olszewski, Michal A, Mairi C Noverr, Gwo-Hsiao Chen, Galen B Toews, Gary M Cox, John R Perfect, and Gary B Huffnagle. 2004. “Urease Expression by Cryptococcus Neoformans

- Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion.” *The American Journal of Pathology* 164 (5). American Society for Investigative Pathology:1761–71. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63734-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63734-0).
- Pappalardo, M. C S M, and M. S C Melhem. 2003. “Cryptococcosis: A Review of the Brazilian Experience for the Disease.” *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 45 (6):299–305. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000600001>.
- Polacheck, I, V J Hearing, and K J Kwon-Chung. 1982. “Biochemical Studies of Phenoloxidase and Utilization of Catecholamines in *Cryptococcus Neoformans*.” *Journal of Bacteriology* 150 (3). American Society for Microbiology (ASM):1212–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6804439>.
- Pukkila-Worley, Read, Quincy D Gerrald, Peter R Kraus, Marie-Josée Boily, Matthew J Davis, Steven S Giles, Gary M Cox, Joseph Heitman, and J Andrew Alspaugh. 2005. “Transcriptional Network of Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the *Cryptococcus Neoformans* Cyclic AMP Cascade.” *Eukaryotic Cell* 4 (1). American Society for Microbiology (ASM):190–201. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.190-201.2005>.
- Rajasingham, Radha, Rachel M Smith, Benjamin J Park, Joseph N Jarvis, Nelesh P Govender, Tom M Chiller, David W Denning, Angela Loyse, and David R Boulware. 2017. “Global Burden of Disease of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: An Updated Analysis.” *The Lancet. Infectious Diseases* 17 (8). Elsevier:873–81. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8).
- Sabiiti, Wilber, Emma Robertson, Mathew A. Beale, Simon A. Johnston, Annemarie E. Brouwer, Angela Loyse, Joseph N. Jarvis, et al. 2014. “Efficient Phagocytosis and Laccase Activity Affect the Outcome of HIV-Associated Cryptococcosis.” *Journal of Clinical Investigation* 124 (5):2000–2008. <https://doi.org/10.1172/JCI72950>.
- Singh, Arpita, Robert J Panting, Ashok Varma, Tomomi Saijo, Kevin J Waldron, Ambrose Jong, Popchai Ngamskulrungrroj, Yun C Chang, Julian C Rutherford, and Kyung J Kwon-Chung. 2013. “Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus Neoformans*.” *mBio* 4 (3). American Society for Microbiology:e00220-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00220-13>.
- Smith, Leanne M., Emily F. Dixon, and Robin C. May. 2015. “The Fungal Pathogen *Cryptococcus Neoformans* Manipulates Macrophage Phagosome Maturation.” *Cellular Microbiology* 17 (5):702–13. <https://doi.org/10.1111/cmi.12394>.
- Speed, B, and D Dunt. 1995. “Clinical and Host Differences between Infections with the Two Varieties of *Cryptococcus Neoformans*.” *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 21 (1):28-34-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7578756>.
- Srikanta, Deepa., Felipe H Santiago-Tirado, and Tamara L. Doering. 2014. “*Cryptococcus Neoformans*: Historical Curiosity to Modern Pethogen.” *National Intitutes Health* 31 (2):47–60. <https://doi.org/10.1002/yea.2997.Cryptococcus>.
- Steenbergen, Judith N, and Arturo Casadevall. 2003a. “The Origin and Maintenance of Virulence for the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans*.” *Microbes and Infection* 5 (7):667–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787743>.

- . 2003b. “The Origin and Maintenance of Virulence for the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans*.” *Microbes and Infection* 5 (7):667–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787743>.
- Stukes, Sabriya, and Arturo Casadevall. 2014. “Visualizing Non-Lytic Exocytosis of *Cryptococcus Neoformans* from Macrophages Using Digital Light Microscopy.” *Journal of Visualized Experiments* 99 (92):1–7. <https://doi.org/10.3791/52084>.
- Stukes, Sabriya, Carolina Coelho, Johanna Rivera, Anne E Jedlicka, Katherine A Hajjar, and Arturo Casadevall. 2016. “The Membrane Phospholipid Binding Protein Annexin A2 Promotes Phagocytosis and Nonlytic Exocytosis of *Cryptococcus Neoformans* and Impacts Survival in Fungal Infection.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 197 (4). NIH Public Access:1252–61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501855>.
- Tucker, S. C., and A. Casadevall. 2002. “Replication of *Cryptococcus Neoformans* in Macrophages Is Accompanied by Phagosomal Permeabilization and Accumulation of Vesicles Containing Polysaccharide in the Cytoplasm.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (5):3165–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.052702799>.
- Voelz, Kerstin, Simon A. Johnston, Julian C. Rutherford, and Robin C. May. 2010. “Automated Analysis of Cryptococcal Macrophage Parasitism Using GFP-Tagged Cryptococci.” Edited by Kirsten Nielsen. *PLoS ONE* 5 (12):e15968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015968>.
- Voelz, Kerstin, David A. Lammas, and Robin C. May. 2009. “Cytokine Signaling Regulates the Outcome of Intracellular Macrophage Parasitism by *Cryptococcus Neoformans*.” *Infection and Immunity* 77 (8):3450–57. <https://doi.org/10.1128/IAI.00297-09>.
- Wager, Chrissy M. Leopold, Camaron R. Hole, Karen L. Wozniak, Michal A. Olszewski, Mathias Mueller, and Floyd L. Wormley. 2015. “STAT1 Signaling within Macrophages Is Required for Antifungal Activity against *Cryptococcus Neoformans*.” *Infection and Immunity* 83 (12):4513–27. <https://doi.org/10.1128/IAI.00935-15>.
- Wang, Y, and A Casadevall. 1994. “Growth of *Cryptococcus Neoformans* in Presence of L-Dopa Decreases Its Susceptibility to Amphotericin B.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (11). American Society for Microbiology (ASM):2648–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7872761>.
- Wozniak, Karen L., Sailatha Ravi, Sandra Macias, Mattie L. Young, Michal A. Olszewski, Chad Steele, and Floyd L. Wormley. 2009. “Insights into the Mechanisms of Protective Immunity against *Cryptococcus Neoformans* Infection Using a Mouse Model of Pulmonary Cryptococcosis.” *PLoS ONE* 4 (9):34–37. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006854>.
- Wright, L. C., R. M. Santangelo, R. Ganendren, J. Payne, J. T. Djordjevic, and T. C. Sorrell. 2007. “Cryptococcal Lipid Metabolism: Phospholipase B1 Is Implicated in Transcellular Metabolism of Macrophage-Derived Lipids.” *Eukaryotic Cell* 6 (1):37–47. <https://doi.org/10.1128/EC.00262-06>.
- Zaragoza, Oscar, Marcio L Rodrigues, Magdia De Jesus, Susana Frases, Arturo Casadevall, Servicio De Micología, Centro Nacional, De Microbiología Instituto, De Salud Carlos, and I I I Crta. 2009. “The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus Neoformans*.” *Adv Appl Microbiol* 68 (9):133–216. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01204-](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01204-)

0.The.

Zhu, X, J Gibbons, J Garcia-Rivera, A Casadevall, and P R Williamson. 2001. "Laccase of *Cryptococcus Neoformans* Is a Cell Wall-Associated Virulence Factor." *Infection and Immunity* 69 (9). American Society for Microbiology (ASM):5589–96. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5589-5596.2001>.

Zhu, X, and P Williamson. 2004. "Role of Laccase in the Biology and Virulence of." *FEMS Yeast Research* 5 (1):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.04.004>.