



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Thaís Silva Alves

Papel da melanina de *Cryptococcus neoformans* na fagocitose por macrófagos murinos J774

Brasília

2022

Thaís Silva Alves

Papel da melanina de *Cryptococcus neoformans* na fagocitose por macrófagos murinos J774

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. André Moraes Nicola

Brasília

2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Isto é um agradecimento e também uma homenagem a minha avó materna, senhora Josefa Maria da Conceição. Minha avó está presente nas minhas mais tenras lembranças e foi incansável em me apoiar em tudo o que precisei desde a minha primeiríssima infância. Mulher forte, lutadora, nunca me deixou titubear, sendo a base sólida que me sustentou nas horas mais desafiadoras. É uma pena que hoje a senhora esteja me assistindo de um outro lugar, mas folgo em saber que não estou sozinha. Obrigada por me ensinar tanto, mesmo na finitude da vida. Nós conseguimos vó!

À minha filha, por me mostrar todos os dias o quanto o que estamos construindo vale a pena. Obrigada por, do seu jeitinho, ter entendido todas as vezes que precisei me ausentar e me dedicar mais ao trabalho. Essa conquista também é sua minha filha!

Ao meu esposo por ter sido o meu sustento desde os primórdios, por ter insistido e lutado junto comigo para que eu não desistisse dos meus sonhos, obrigada por ser antes de tudo o meu amigo.

A minha mãe e irmã por serem a guarida de todas as horas e por acreditarem em mim quando nem eu mesmo consigo. Aos meus sogros, sem vocês nada disso teria sido possível, vocês foram fundamentais. Às minhas tias por estarem na “plateia” me aplaudindo, sem importar o resultado.

À Beatriz Ribeiro, pelo amparo psicológico e afetuoso.

Aos colegas do Lab MIB: Cris, Juan e Luiz. Aos colegas da Bio Mol: Mari e Matheus. Especialmente à Amanda, por ter me recebido no laboratório e ter sido o primeiro rosto amigável, generoso e solícito, sempre disponível para ajudar. À Thalita por toda a dedicação e escuta, pelas trocas tão ricas de conteúdos não só da academia, mas da vida. À Stefânia por me ajudar em meu recomeço. À Lara por todo o apoio e inspiração.

Ao meu orientador por todo o auxílio prestado, pela humanidade com que conduz a sua gestão, pelo respeito e oportunidade de me receber no laboratório, me permitindo trabalhar com o que foi minha vocação desde criança.

Aos professores do programa, que foram impulsionadores para que nós não desanimássemos mesmo diante das adversidades impostas pela condução de um mestrado na pandemia.

Aos membros da banca avaliadora por se disporem a contribuir com este trabalho.

Ao apoio financeiro do Decanato de Pós-Graduação da Universidade de Brasília.

RESUMO

O fungo *Cryptococcus neoformans* é o principal agente etiológico da criptococose, afetando principalmente indivíduos imunocomprometidos. A doença tem o pulmão como sítio primário, apresentando tropismo pelo Sistema Nervoso Central onde sua principal manifestação clínica é a meningoencefalite. É um importante problema de saúde pública, que tem seu diagnóstico de forma tardia e os dados epidemiológicos subestimados. A cápsula, a melanina e a lacase são fatores de virulência marcantes, sendo um campo promissor para entendimento da patogênese e promoção de alvos terapêuticos mais adequados. A melanina de *C. neoformans* exerce um impacto na proteção contra a resposta imune efetora e também dificultando a ação de antifúngicos. Nosso grupo estudou os efeitos da melanina de *C. neoformans* na interação com macrófagos murinos por meio de ensaios de fagocitose e também detecção de Fagocitose associada a LC3 (LAP), com duas cepas fúngicas: o selvagem H99 e o mutante para lacase LAC1. Observamos que sem suplementação para melanização o selvagem era mais fagocitado que o mutante, demonstrando efeitos da ausência de lacase. A adição de suplementação para melanização diminuiu a ocorrência de fagocitose para o selvagem ao longo do tempo e para o mutante apenas após 48 horas, manifestando efeitos da L-DOPA mesmo no mutante. Quanto a detecção de LAP, o mutante apontou maior ocorrência que o selvagem na ausência de melanina, sugerindo que a lacase seja importante para a evasão do fungo. Quando suplementamos para produção de melanina, não houveram alterações significativas quanto a detecção e quantificação da LAP para o selvagem, com um ligeiro aumento observado no mutante após 48 horas. Esses resultados em conjunto sugerem que a melanina seja protetora quanto a ação efetora de macrófagos, mas que outros interferentes, como a lacase, podem ser tão relevantes quanto.

Palavras – chave: *Cryptococcus neoformans*; melanina; autofagia; interação patógeno-hospedeiro; LAP; fagocitose

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is the major etiologic agent of cryptococcosis, mainly affecting immunocompromised individuals. The disease has the lung as its primary site, presenting tropism for the Central Nervous System where its main clinical manifestation is meningoencephalitis. This disease is an important public health issue, which is diagnosed late and its epidemiological data are underestimated. Capsule, melanin and laccase are virulence factors, being a promising field for understanding the pathogenesis and searching more suitable therapeutic targets. *C. neoformans* melanin protects it against the effector immune response and also hindering the action of antifungals. Our group studied the effects of *C. neoformans* melanin on the interaction with murine macrophages through phagocytosis assays and also detection of LC3-associated phagocytosis (LAP). Two fungal strains were selected for this study: wild type H99 and LAC1 laccase mutant. We observed that without melanization supplementation, the wild type was more phagocytosed than the mutant, indicating effects of the absence of laccase. The addition of supplementation for melanization decreased the occurrence of phagocytosis for the wild type over the time and for the mutant only after 48 hours, this result shows effects of L-DOPA even in the mutant. As for the detection of LAP, the mutant, in the absence of melanin, presented higher occurrence of LAP than the wild type, suggesting that laccase is important for the evasion of *C. neoformans*. When we supplemented for melanin production, there were no significant changes in the detection and quantification of LAP for the wild type, with a slight increase observed in the mutant after 48 hours. These results could suggest that melanin is protective against the macrophage activity and there are others interferents, such as laccase, so relevant as melanin in the immune response against *C. neoformans*.

Key words: *Cryptococcus neoformans*; melanin; autophagy; host-pathogen interaction; LAP; phagocytosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	JUSTIFICATIVA	12
3	OBJETIVO	13
3.1	Principal	13
3.2	Específico	13
4	REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1	O Patógeno	14
4.2	A criptococose	15
4.3	Os antifúngicos	20
4.4	<i>C. neoformans</i>: adaptação ao hospedeiro e fatores de virulência	22
4.5	Interação patógeno-hospedeiro	27
4.6	A autofagia e o <i>C. neoformans</i>	29
6	METODOLOGIA	33
6.1	Cultura de células	33
6.1.1	Fungos	33
6.1.2	Macrófagos J774	34
6.2	Indução da produção de melanina em <i>C. neoformans</i>	35
6.3	Co-incubação fungo-macróforo	35
6.4	Fagocitose	36
6.5	Detecção de LC3	37
6.6	Microscopia confocal e fluorescência	39
6.7	Análise das imagens	39
6.8	Estatística	39
7	RESULTADOS	40
7.1	Melanização das cepas fúngicas	40
7.2	Ensaio de fagocitose	40

7.3	Detecção e quantificação de LC3	43
8	DISCUSSÃO	47
9	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença de relevância mundial, comumente associada a pacientes imunossuprimidos. Dados recentes estimam que a meningite criptocócica seja responsável por 152 mil casos com, aproximadamente, 112 mil mortes em todo o mundo por ano (RAJASINGHAM *et al.*, 2022). No Brasil, esta doença é negligenciada sendo um problema de saúde pública importante, uma vez que é diagnosticada de forma tardia e possui taxas de letalidade variando de 45% a 65% (ALVES SOARES *et al.*, 2019). O Governo Federal ainda não tornou compulsória a notificação desta doença, o que dificulta a obtenção de dados epidemiológicos seguros e atualizados, nos afastando de um panorama nacional real e, por consequência, obstando a adoção de políticas de combate e prevenção.

O principal desfecho clínico da infecção por *Cryptococcus* spp. é a meningoencefalite, muito embora este patógeno possa ficar limitado a uma infecção pulmonar ou mesmo infectar muitos outros órgãos do corpo humano (ZAVALA; BADDLEY, 2020). Há duas principais espécies desse gênero envolvidas nas infecções de seres humanos: *Cryptococcus neoformans* associado mais frequentemente ao desenvolvimento da doença em pacientes imunocomprometidos, enquanto a espécie *Cryptococcus gattii* se mostrou capaz de infectar pacientes imunocompetentes mais comumente (HANSAKON *et al.*, 2019).

Dada a relevância em saúde pública desta doença, se faz necessário entender sobre sua patogênese e virulência. A capacidade de evasão a resposta imune do hospedeiro e a expressão de fatores de virulência (cápsula e melanina, por exemplo) são dois focos de concentração de estudos que buscam trazer respostas para o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos e consequentemente um melhor manejo da doença (ZARAGOZA, 2019).

A melanina é um importante fator de virulência descrito na literatura, junto da cápsula e a presença da enzima lacase. A cápsula é uma estrutura complexa composta, principalmente, de água e polissacarídeos, que dificulta a fagocitose; protege as células fúngicas de desidratação e da ação de radicais livres; inibe a quimiotaxia de leucócitos e em estudos recentes há evidências de que os polissacarídeos capsulares sejam potentes indutores de apoptose de células de defesa (CASADEVALL *et al.*, 2019; ZARAGOZA, 2019). A melanina é um pigmento escuro que confere proteção ao fungo a múltiplos fatores de estresse oxidativo e à ação de antifúngicos, agindo também na resposta imune do hospedeiro ao alterar a produção de citocinas, evadir a fagocitose de macrófagos e mesmo quando fagocitado dificultando a ação microbicida (CORDERO; CAMACHO; CASADEVALL, 2020; LEE *et al.*, 2019; ZARAGOZA, 2019). A lacase tem sua produção induzida em meio pobre em nutrientes, tendo

por função conhecida catalisar a polimerização e sintetizar a melanina (CASADEVALL et al., 2019; CORDERO; CAMACHO; CASADEVALL, 2020; LEE et al., 2019).

A fagocitose de macrófagos é uma das respostas da imunidade inata direcionada à infecção causada por *C. neoformans*. Autofagossomos são formados no citoplasma de macrófagos, que após se fundirem a lisossomos, sofrem maturação e fazem a digestão dos patógenos num mecanismo específico de autofagia chamado Fagocitose Associada a LC3 (LAP) (NICOLA et al., 2012). DE SOUSA e colaboradores (2022) encontraram uma correlação entre diminuição da LAP em células J774 e uma maior produção de melanina em isolados clínicos de *C. neoformans*, sugerindo que a melanina possa modular o reconhecimento de células fúngicas pelos macrófagos, afetando diretamente a resposta imune ao patógeno.

A primeira descrição de um caso de criptococose na literatura foi em 1894, mas só na década de 50 ocorreu o desenvolvimento dos primeiros agentes antifúngicos para tratamento clínico, como a nistatina e a anfotericina B (KWON-CHUNG et al., 2015; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017). A anfotericina B, desde a década de 60, segue sendo o medicamento de escolha para o tratamento da criptococose, porém a partir da década de 90 a combinação de anfotericina B e 5-flucitosina se tornou viável, sendo ainda hoje a melhor estratégia farmacológica. Nos países onde não é amplamente disponível a 5-flucitosina, como no Brasil, utiliza-se fluconazol em combinação com a anfotericina B.

Apesar de haver alternativas farmacológicas para o tratamento da doença, a resistência microbiana a antifúngicos tem sido relatada ao longo da história e isso pode se dar por meio de mutações gênicas, mecanismos adaptativos ao estresse gerado pela droga ou mesmo de forma natural. Um outro fator relevante quanto às drogas utilizadas para tratamento, especialmente a anfotericina B, é que elas induzem elevada toxicidade em células humanas, representando assim mais um desafio importante no manejo da doença (ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

Estudos direcionados para entender a dinâmica dos fatos, seja da maquinaria individual tanto do patógeno quanto do hospedeiro, seja da própria interação entre eles podem prover novas estratégias terapêuticas, reduzindo efeitos colaterais, sendo mais efetivos na neutralização e eliminação do patógeno, trazendo assim desfechos clínicos mais positivos.

Nesse contexto, este trabalho visou caracterizar o papel da melanina de *C. neoformans* na interação com macrófagos, através da avaliação da função imunomoduladora da melanina, mensurando a influência desta em ensaios direcionados a fagocitose e na quantificação de LAP. A hipótese é que a melanina de *C. neoformans* contribua de modo significativo na capacidade desse fungo evadir à resposta imune do hospedeiro, provocando mudança nos padrões de reconhecimento celular, na autofagia e na efetividade da ação microbicida.

2 JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma micose oportunista de relevância mundial, responsável por taxas de letalidade significativas em populações de imunossuprimidos, comumente acima de 50% nos países em desenvolvimento. No Brasil esse cenário pode ser ainda mais grave, pois não há uma rede de vigilância bem articulada por todo o país, impossibilitando a adoção de políticas públicas de prevenção e enfrentamento da doença.

Mesmo com todo o conhecimento que se tem na descrição dos agentes etiológicos da criptococose e da relação patógeno-hospedeiro, há muitas hipóteses em aberto carecendo de atenção e esforços científicos. Estudos recentes de nosso grupo de pesquisa na UnB atribuíram à melanina a capacidade de evasão do fungo a fagocitose, além de possivelmente interferir na diferenciação de fagócitos importantes na resposta imunitária. Essas alterações desencadeadas a partir da interação com a melanina podem enfraquecer a imunidade do hospedeiro, agravando quadros clínicos e trazendo desfechos negativos.

Assim, é de grande relevância estudar qual o papel da melanina na resposta imune, até que ponto e de que forma ela pode afetar essa interação com macrófagos. Os resultados alcançados podem fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de terapias específicas que tenham como alvo aumentar a eficácia da resposta imunitária do hospedeiro, ao invés de matar o patógeno. Tais terapias têm potencial de induzir menos toxicidade e resistência antimicrobiana.

3 OBJETIVO

3.1 Principal

Estudar o papel da melanina de *C. neoformans* na interação com macrófagos murinos J774.

3.2 Específico

Verificar possíveis interferências da melanina de *C. neoformans* na fagocitose por macrófagos J774 por meio de ensaios específicos;

Avaliar a presença de autofagia associada a LC3 (LAP) na interação de cepas *C. neoformans* melanogênicas e não melanogênicas com macrófagos murinos J774 através de microscopia de imunofluorescência.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O Patógeno

O gênero *Cryptococcus* compreende uma variedade de espécies, porém poucas são de interesse clínico. O *C. neoformans* passou ao status de patógeno oportunista quando foi descrito em 1894 e 1895 como agente etiológico de uma infecção óssea (ALANIO, 2020; ZHAO; LIN, 2021). Os primeiros relatos de criptococose foram atribuídos em sua maioria a esta espécie, porém com o avanço dos casos e das tecnologias de biologia molecular, uma outra espécie foi descrita: *C. gattii*. Apesar de muito relacionadas entre si, as duas possuem algumas diferenças com relação a epidemiologia e na patogênese humana.

O *C. gattii* é mais comumente isolado nos trópicos e subtropicais. No ambiente vive em materiais em decomposição em cascas de árvores e pode infectar indivíduos aparentemente imunocompetentes, com boas condições clínicas e fora de um contexto de doenças preexistentes ou subclínicas (MAY *et al.*, 2016; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014). Por esses e outros fatores, a incidência de doenças causadas por essa espécie é menor se comparada ao *C. neoformans*.

O *C. neoformans* tem boa difusão geográfica, sendo encontrado principalmente nas excretas de alguns pássaros como pombos, o que contribui para sua dispersão em áreas urbanas, mas também pode ser isolado no solo, em árvores e em outros animais (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

O ciclo de vida do *C. neoformans* pode se dar de forma assexuada e sexuada. A reprodução assexuada é a mais frequente, onde a propagação ocorre por brotamento na forma de levedura unicelular. A forma sexuada precisa de condições particulares que favoreçam o cruzamento, como baixas concentrações de nitrogênio e desidratação, bem como da presença dos dois tipos celulares preferencialmente opostos para o acasalamento, MAT_a e MAT_α (MAZIARZ; PERFECT, 2016; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014).

Embora a forma mais comum de reprodução sexuada aconteça com células opostas, há relatos de reprodução entre mesmos tipos celulares (MAT_a e MAT_α) que produzem prole infecciosa, com características hiper virulentas (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

4.2 A criptococose

O *C. neoformans* é responsável por grande parte dos casos de criptococose no mundo, podendo infectar tanto pessoas imunocomprometidas quanto imunocompetentes, embora estes em menor número (ALANIO, 2020; MAZIARZ; PERFECT, 2016; ZARAGOZA, 2019). Essa espécie representa um risco para pacientes em curso de aids, que apresentam algum grau de supressão imune, bem como para portadores de doenças autoimunes sistêmicas e ainda para aqueles indivíduos submetidos a tratamentos médicos avançados como para tumores e leucemias (BAHN *et al.*, 2020).

As infecções causadas pelo fungo tiveram um aumento de incidência com a emergência dos casos de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) no início do século XX, onde se estima que pelo menos 10% dos pacientes HIV⁺ tenham sido afetados também pelo *C. neoformans* (ZARAGOZA, 2019). As pessoas infectadas por esse vírus evoluíam para um quadro imunodeficiência que as tornavam suscetíveis a infecções oportunistas, incluindo aquelas causadas por fungos.

O uso de antirretrovirais para controle e tratamento da infecção pelo HIV, trouxe melhorias e boa resposta clínica, permitindo que houvesse tempo hábil para o tratamento das infecções oportunistas. Com isso, houve um impacto direto nos casos de criptococose nos países desenvolvidos, onde a doença deixou de ser certamente fatal, para se tornar tratável (ALANIO, 2020; RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

Infelizmente, vemos que nos países em desenvolvimento a doença segue sendo um grave problema de saúde pública, por questões de infraestrutura e custos financeiros, afetando milhões de indivíduos, contribuindo para o crescimento de dados estatísticos lamentáveis e evitáveis (FIRACATIVE; MEYER; CASTAÑEDA, 2021; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014).

A criptococose é a segunda maior causa de mortes associadas a Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida em adultos, sendo a tuberculose a primeira (AKAIHE; NWEZE, 2021). Na América Latina, observamos que a incidência de criptococose acompanha o perfil global, afetando principalmente pessoas do gênero masculino, tendo como importante fator de risco a infecção por HIV. Nos países em desenvolvimento, o número de pessoas que convivem com o HIV é alto, porém o tratamento com antirretrovirais não alcança boa parte dessa população (FIRACATIVE; MEYER; CASTAÑEDA, 2021).

No Brasil, os dados que se tem sobre a criptococose são subestimados, normalmente indiretos oriundos de programas de vigilância da aids ou de casos em estágio avançado diagnosticados em centros regionais. Quando o paciente chega na rede de saúde, geralmente

são identificadas formas clínicas de acometimento do sistema nervoso central. A demora na detecção precoce desses casos, reduz bastante as chances de tratamento, aumentando as hospitalizações, as lesões, a probabilidade de sequelas e as taxas de letalidade (ALVES SOARES *et al.*, 2019).

Há uma história natural da criptococose em humanos que nem sempre vai ser sintomática, pode evoluir para latência, reativando ou não no futuro, a depender da condição clínica de cada um e de fatores inerentes as cepas fúngicas. De forma mais comum, o contato ocorre quando somos expostos ao meio ambiente contendo leveduras desidratadas ou esporos, que ao serem inalados fazem do pulmão o primeiro órgão colonizado (ALANIO, 2020).

De maneira incomum, a criptococose pode se desenvolver de forma rápida e letal, principalmente em casos de sujeitos imunossuprimidos e decorrente fatores intrínsecos ao fungo (BAHN *et al.*, 2020; KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Normalmente, a manifestação da criptococose se dá partindo de uma evolução do quadro clínico onde ocorre uma reativação de formas fúngicas viáveis, porém quiescentes, contidas em reservatórios ou granulomas em órgãos alvo (ALANIO, 2020). Muitas vezes, a infecção primária se deu até mesmo numa outra fase da vida, com o sistema imunitário tendo desenvolvido resposta efetiva. O estado de latência pode durar anos e só efetivamente culminar em reativação e disseminação devido a uma imunossupressão. A dormência é uma ferramenta utilizada pelo fungo que permite que ele se adapte a vida no hospedeiro, sem trazer danos a nenhum dos envolvidos (ALANIO, 2020; CASADEVALL; COELHO; ALANIO, 2018; MAY *et al.*, 2016).

As manifestações clínicas da criptococose estão diretamente relacionadas aos locais de colonização pelo microrganismo. No pulmão, as células fúngicas vão se depositar nos alvéolos pulmonares, e devido a resposta imune acionada vão induzir um quadro de inflamação granulomatosa. Os sintomas podem se manifestar como pneumonia aguda ou mesmo como Síndrome da Insuficiência Respiratória Aguda (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

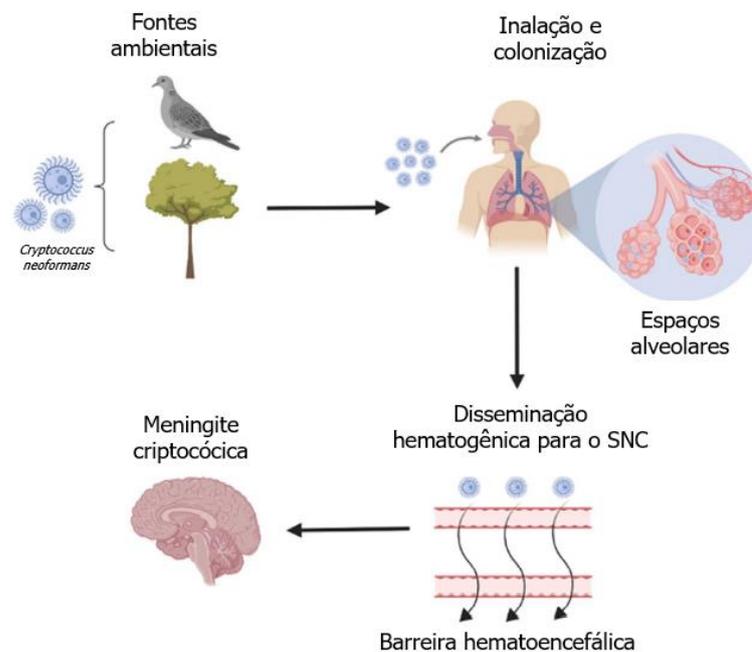
O sistema imunitário do hospedeiro pode não conseguir montar uma resposta efetora contra a infecção no sítio primário ou mesmo o fungo pode modular a resposta imune dirigida, resultando na sua propagação via circulação sanguínea periférica, se disseminando para outros órgãos, como o cérebro. Há relatos de invasão da barreira hematoencefálica de forma direta ou através de fagócitos contendo leveduras viáveis fagocitadas (teoria cavalo de Tróia) (SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014).

Uma vez internalizadas, as células fúngicas trarão danos ao sistema nervoso central, com múltiplos sinais e sintomas, tais como: dor de cabeça, neuropatias, febre, letargia, perda

de memória e irritação das meninges. Os tipos e a intensidade dos sinais clínicos são dependentes da relação patógeno-hospedeiro e podem se manifestar de maneira rápida ou demorar semanas (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A figura 1 resume o trajeto do *Cryptococcus* durante a infecção e dispersão do sítio primário via hematogênica.

Figura 1 - Ciclo de infecção e disseminação. Inalação de leveduras desidratadas ou basidiósporos presentes no meio ambiente. Alojamento nos alvéolos pulmonares e dispersão via hematogênica para o Sistema Nervoso Central.



Fonte: Imagem traduzida e adaptada de (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020).

Apesar do tropismo do *C. neoformans* pelos pulmões e sistema nervoso central, outros órgãos podem ser acometidos e há capacidade de infecção de qualquer local no corpo humano. O aparecimento de ferimentos na pele indica provável disseminação, uma vez que a infecção cutânea primária é rara e associada com lesões prévias. Os sintomas, assim como nas outras manifestações, são pouco específicos e podem se apresentar, por exemplo, como pústulas, pápulas, celulite e abscessos (ZAVALA; BADDLEY, 2020).

A próstata é outro órgão que pode ser afetado pelas células fúngicas, mas quase sempre sem sintomatologia, sendo então considerado um sítio com características de reservatório (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Infecções oculares são pouco frequentes contudo, podem levar a cegueira irreversível. As causas para a perda de visão podem estar relacionadas a invasão do nervo óptico pelas leveduras, ou por um aumento da pressão intracraniana que traria prejuízos ao sistema vascular (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

O diagnóstico da criptococose é essencialmente clínico e epidemiológico, podendo contar com auxílio de exames laboratoriais e de imagem. O padrão ouro para o diagnóstico de criptococose é a cultura e isolamento do *Cryptococcus* spp. na amostra. São métodos de diagnóstico apropriados: a cultura, hemocultura, exame micológico, exame direto com tinta nanquim, exames imunológicos e análise semiquantitativa de LCR (BRASIL, 2022).

A detecção direta utilizando a tinta nanquim é um método barato e rápido que permite a visualização das leveduras em uma amostra de Líquido Cefalorraquidiano (LCR) sendo altamente específico. A sensibilidade do exame, por outro lado, é afetada pela carga biológica e falsos-positivos podem estar relacionados com formas fúngicas não viáveis, linfócitos intactos (são confundidores em nível de morfologia e tamanho) ou outros tipos celulares contaminantes da amostra (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

Ao exame, as leveduras apresentam um halo claro que é visto no microscópio de luz, pois a cápsula de polissacarídeos intacta não permite a entrada do corante utilizado. Esta metodologia pode ser substituída com sucesso pelo teste imunocromatográfico de fluxo lateral de antígeno criptocócico, que é mais sensível, mais específico e não dependente do operador (BRASIL, 2022; GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

O teste imunocromatográfico de fluxo lateral de antígeno criptocócico – *Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay* (CrAg-LFA) é uma opção de diagnóstico que elimina a necessidade de equipamento específico para processamento ou leitura, não é dependente do operador e que tem logística facilitada permitindo sua adoção mesmo em regiões de difícil acesso (BRASIL, 2022). O teste consiste numa fita adsorvida de anticorpos que, imersa na amostra biológica, apresenta um traço de coloração específica caso existam antígenos capsulares. Casos de falso-negativo podem ser reportados em decorrência do efeito prozona em pacientes com altas cargas fúngicas. O diagnóstico por essa metodologia não chega em nível de espécie, mas para efeito de tratamento isso não é uma informação determinante, embora o seja para epidemiologia (ZAVALA; BADDLEY, 2020).

O antígeno capsular de *Cryptococcus* pode ser encontrado em diversos fluidos corpóreos não apenas no líquido, e sua presença pode ser detectada muito antes dos sintomas surgirem, mesmo em crianças. O soro, o plasma, o líquido e o sangue total são amostras eletivas para detecção de antígeno. A detecção do antígeno é importante para diagnóstico precoce, que permite a adoção do tratamento no início aumentando sua efetividade, reduzindo o risco de morte por meningite (BRASIL, 2022).

Não há sinais clínicos patognomônicos de criptococose descritos na literatura, sendo assim muitas vezes se faz necessário o diagnóstico diferencial com outras doenças e o que norteia a busca é o sítio acometido (BRASIL, 2022).

O tratamento tem como principal objetivo reduzir a carga fúngica, podendo chegar à depleção, por meio do uso de antifúngicos. Diferentes abordagens terapêuticas podem ser assumidas a depender das formas clínicas da doença (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

Para pacientes com comprometimento pulmonar recomenda-se terapia com antifúngicos se apresentarem sintomas respiratórios, sinais de disseminação para outros órgãos ou em caso de indivíduos imunocomprometidos (BRASIL, 2022). Para pacientes imunocompetentes está previsto a observação da evolução clínica de forma criteriosa, ficando para o médico a decisão pela adoção do tratamento farmacológico (ZAVALA; BADDLEY, 2020).

Para indivíduos com o sistema nervoso central afetado é utilizada uma estratégia que se divide em três fases: indução, consolidação e manutenção (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

O objetivo principal da fase de indução é o controle da carga fúngica, com uso de anfotericina B lipossomal combinada com flucitosina, e na ausência de flucitosina, altas doses de fluconazol, por pelo menos 14 dias. A duração do tratamento farmacológico desta fase é definida de acordo com as particularidades clínicas do paciente, podendo superar 18 meses (BRASIL, 2022).

A formulação lipossômica da anfotericina B é mais indicada do que outras apresentações da anfotericina, porque tem menores reações adversas e efeitos colaterais, além de melhor alcance ao SNC (ZAVALA; BADDLEY, 2020).

A fase de consolidação consiste em regularizar os indicadores clínicos do paciente, mantendo regulada proliferação fúngica, por um período de pelo menos 8 semanas. A medicação de escolha nesta fase é o fluconazol, onde sua dosagem vai variar de acordo com as opções medicamentosas feitas na fase de indução e os resultados das culturas feitas no período vigente (BRASIL, 2022).

A última fase é a manutenção onde será mantido o uso de fluconazol em baixa dosagem, apenas por via oral, com a finalidade de evitar a recidiva. O tratamento tem duração prevista de 12 meses. A alta farmacológica é avaliada caso a caso, de acordo com o histórico clínico e a estabilidade imunológica (BRASIL, 2022).

4.3 Os antifúngicos

As infecções fúngicas são responsáveis por bilhões de casos no mundo, sendo que as formas invasivas causam taxas de mortalidade maiores do que as infecções bacterianas por ano. Apesar disso, há poucas alternativas farmacológicas a disposição, se limitando a apenas quatro classes de antifúngicos: os polienos, a flucitosina, os azóis e as equinocandinas (IYER *et al.*, 2021; PERFECT, 2017).

Os polienos foram descobertos em 1950, têm como alvo o ergosterol presente na membrana plasmática das células fúngicas e são utilizados para tratamento de infecções causadas por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus*. O mecanismo de ação é a formação de poros artificiais na membrana celular, permitindo um efluxo de componentes intracelulares essenciais, promovendo instabilidade para a célula, alterando potencial de membrana e conseqüentemente morte celular (IYER *et al.*, 2021; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

A anfotericina B é a principal representante dos polienos, sendo o medicamento padrão para tratamento de infecções fúngicas invasivas, tal qual a criptococose. Seu principal efeito adverso é a nefrotoxicidade, que pode ser atenuada a partir das formulações lipídicas, que permitem uma velocidade de absorção menor sem impactar na sua eficácia (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

A 5-flucitosina é um composto sintético (antimetabólito de pirimidina) que inibe a síntese de DNA e RNA. Mostrou efeitos para o tratamento de micoses sistêmicas e foi utilizado pela primeira vez em 1968, como escolha terapêutica para criptococose (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017). Entretanto, em decorrência de sua resistência intrínseca e aos efeitos colaterais, o uso como monoterapia foi desaconselhado. O tratamento combinado com formulações lipídicas de anfotericina B, proporciona efeitos aditivos ou sinérgicos tornando o tratamento de indução muito mais efetivo do que a combinação anfotericina B e fluconazol (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020; PERFECT, 2017).

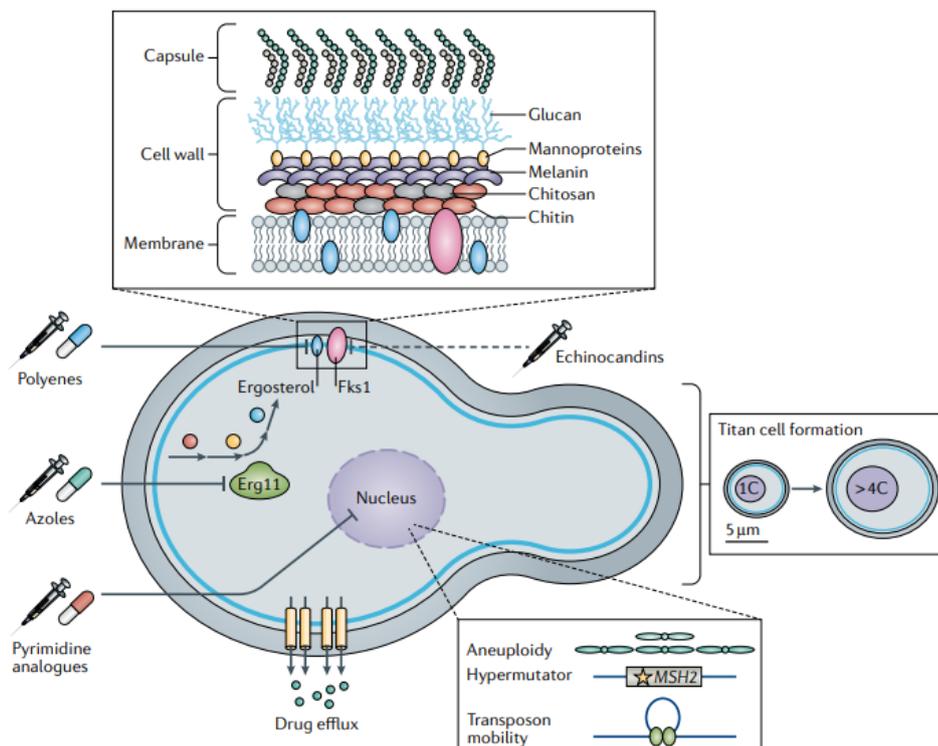
Os azóis foram por muito tempo a droga de escolha para tratamento de micoses, por sua eficácia, segurança clínica e biodisponibilidade. O mecanismo de ação é o bloqueio da síntese do ergosterol por inibição enzimática, com efeitos fungistáticos (ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017). Apesar de possuírem o mesmo mecanismo de ação, há diferenças entre os vários derivados azólicos, que afetam a especificidade de ligação para inibição enzimática. Isso altera os efeitos antifúngicos, a segurança e os efeitos colaterais (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020).

Entre os variados derivados azólicos, o mais comum é o fluconazol. Possui amplo espectro de atuação, com boa eficácia clínica, baixa toxicidade e baixo custo. Na ausência de flucitosina, é a droga de escolha para o tratamento combinado com a anfotericina B para meningite criptocócica por ter boa penetração no Sistema Nervoso Central, baixa interação medicamentosa e poucos efeitos adversos (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020).

As equinocandinas agem inibindo a produção do principal biopolímero da parede celular dos fungos, a (1,3) – β – D – glicana, inviabilizando as células fúngicas (IYER *et al.*, 2021). São fungicidas contra a maioria das espécies de *Candida* e podem desempenhar efeitos também fungistáticos contra *Aspergillus fumigatus* (ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017). Mesmo que o *C. neoformans* expresse este biopolímero de parede celular, as equinocandinas não apresentam eficácia clínica ele por haver uma resistência intrínseca a essa classe de antifúngicos em um mecanismo ainda não elucidado.

A figura 2 mostra um resumo dos mecanismos de resistência a antifúngicos das 4 classes de antifúngicos em uso clínico atualmente.

Figura 2 - Mecanismo de resistência a antifúngicos por *Cryptococcus*. Os polienos tem como alvo direto o ergosterol. Os azóis afetam a biossíntese do ergosterol a partir do bloqueio da enzima Erg11. Os análogos de pirimidina, representados pela Flucitosina, agem na síntese de DNA e RNA. As equinocandinas focam na enzima glucana sintase Fks1, como o *Cryptococcus* demonstra resistência intrínseca a esta classe de antifúngico, sua relação é representada na figura com linha pontilhada. Aneuploidia, hipermutação e mobilidade de transposons são recursos para o desenvolvimento de adaptação e resistência aos fármacos.



Fonte: (IYER *et al.*, 2021)

Em publicações recentes, observou-se a ação de uma subunidade regulatória de flipase lipídica, a Cdc50, na mediação da resistência a equinocandinas em *Cryptococcus*, através de uma dupla ação na homeostase e sinalização do cálcio citoplasmático pela interação com canais de cálcio (CAO *et al.*, 2019). Outra hipótese é de que a melanina de *Cryptococcus* proteja contra a ação de equinocandinas e anfotericina B (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002).

Apesar de haver alternativas farmacológicas para o tratamento da criptococose, a resistência microbiana a antifúngicos tem sido relatada ao longo da história e isso pode se dar por meio de mutações gênicas, mecanismos adaptativos ao estresse gerado pela droga ou mesmo de forma natural. Um outro fator relevante quanto às drogas utilizadas para tratamento, especialmente a anfotericina B, é que elas induzem elevada toxicidade em células humanas, representando assim mais um desafio importante no manejo da doença (ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

O cenário atual torna hiperativo a busca por novos alvos terapêuticos, que não precisam estar centralizados na eliminação do microrganismo, pois sabemos que muitas características celulares dos fungos são compartilhadas pelas células de mamíferos, tornando o tratamento tóxico e com muitos efeitos adversos. Boas alternativas podem estar em entender características intrínsecas do fungo como os fatores de virulência, a biologia, novos genes alvo e suas funções e assim, não só visar a eliminação do patógeno, mas promover um ambiente mais efetivo para a resposta imunitária do hospedeiro.

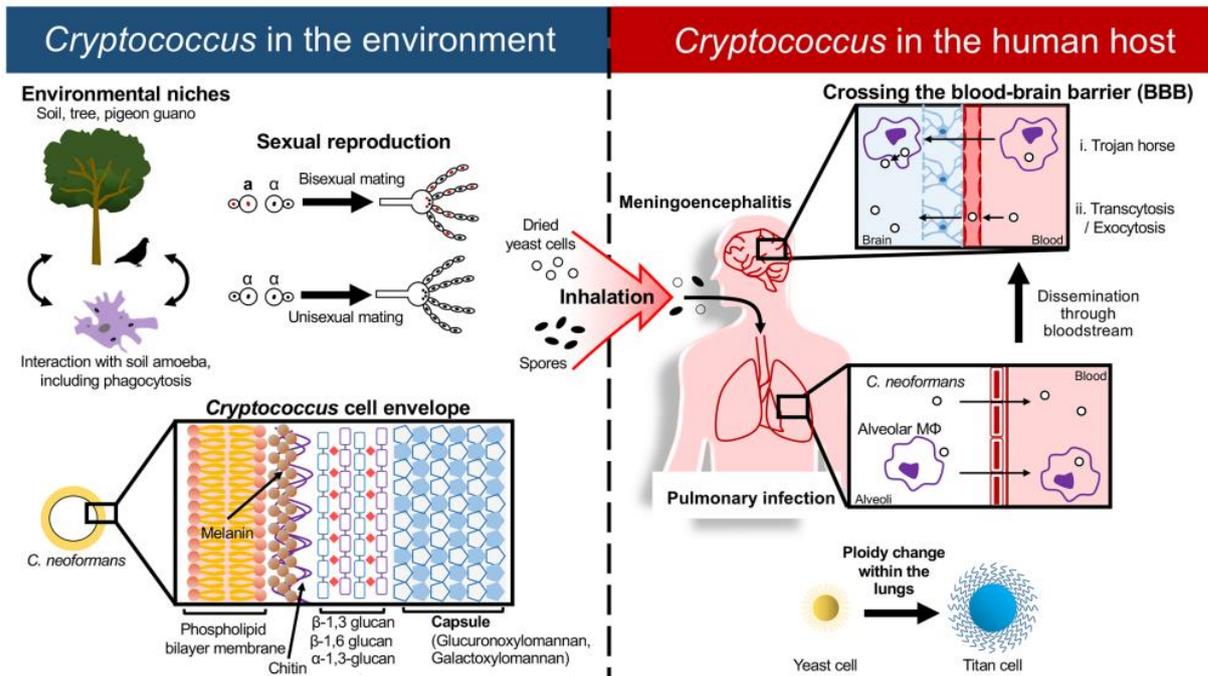
4.4 C. neoformans: adaptação ao hospedeiro e fatores de virulência

Como já citado anteriormente, nem sempre o *C. neoformans* foi considerado um patógeno, sendo responsável por poucos casos até emergência das infecções por HIV. Alguns fatores têm um papel importante para sua patogenicidade, enquanto outros ainda não foram elucidados.

O *C. neoformans* é um fungo de vida livre, que não tem o ser humano como parte necessária de seu ciclo de vida. No habitat natural, ele precisa se manter viável mesmo em condições hostis e dispor de mecanismos que o protejam da ação de predadores naturais, como protozoários e amebas de solo, onde inclusive tem capacidade de, não só sobreviverem como se replicarem (MAY *et al.*, 2016). A figura 3, oferece um resumo das relações nos nichos ambientais e também na relação patógeno-hospedeiro.

Figura 3 – Relações do *Cryptococcus* no meio ambiente e no hospedeiro humano. A esquerda: Esquema gráfico citando os nichos ambientais, reprodução sexual, interação com predadores naturais e

características estruturais do *Cryptococcus*. A direita: fatores da relação patógeno-hospedeiro na meningoencefalite e a pneumonia.



Fonte: (BAHN *et al.*, 2020)

O convívio com predadores naturais gerou uma pressão evolutiva, produzindo ferramentas que funcionam como fatores de virulência quando na interação patógeno-hospedeiro. Essa pressão também selecionou, ao longo dos anos, exemplares que melhor se adaptassem a vida em órgãos como cérebro e pulmão, onde podem evadir da resposta imunitária, permanecendo vivos e se reproduzindo, tal qual o fazem no meio ambiente (BAHN *et al.*, 2020; ZARAGOZA, 2019).

A termotolerância é a capacidade de crescer na temperatura corpórea de mamíferos, mecanismo crucial para agentes de doenças invasivas (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014). Outras espécies do gênero *Cryptococcus* até expressam fatores de virulência significativos, como cápsula e a melanina, mas não são patogênicas por não demonstrarem termotolerância (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Uma vez no organismo, o fungo deve ser capaz de extrair do hospedeiro suas fontes energéticas e nutricionais necessários a sobrevivência, que serão utilizados em múltiplas rotas metabólicas. Um íon notável é o ferro, que é valioso também para as células de mamíferos, sendo sempre protegido e reciclado nos processos celulares. Para obter ferro, o *C. neoformans* vai competir com o hospedeiro utilizando de permeases, ferroxidases e a glicoproteína Cig1 (ZARAGOZA, 2019).

Outro íon importante é o cobre, útil para a ação de enzimas como a lacase e a superóxido desmutase. Altas concentrações de cobre nos fagossomos parecem ter ação microbicida, exigindo do fungo estratégias para evitar o acúmulo (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

Uma das principais respostas efetoras do hospedeiro contra a infecção por leveduras é a fagocitose, onde o microrganismo será submetido a um ambiente acidificado e com pouca disponibilidade de nutrientes. Para o *C. neoformans* isso não é um grande obstáculo, pois o interior do fagossomo com pH baixo é favorável para o seu crescimento. Alguns estudos também demonstram que o fungo seja capaz de desestabilizar as membranas dos fagossomos e aumentar a expressão de canais transportadores de aminoácidos, permitindo a extração destes do citoplasma corrigindo os efeitos da privação nutricional (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

A evasão a ação de radicais livres confere aos patógenos a capacidade de se proteger durante as infecções. O *C. neoformans* possui um conservado sistema de defesa enzimático contra a ação de radicais livres, composto por superóxido redutases, catalases, entre outras (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

A cápsula polissacarídica é uma constituinte notável que possui duas propriedades, ser um significativo fator de virulência e uma proteção a resposta imunitária, conferindo vantagens para sua sobrevivência *in vivo*. A composição principal é de glicuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), embora sua estrutura possa variar de acordo com as condições ambientais, sendo estruturalmente dinâmica (ZARAGOZA, 2019). Mutantes acapsulares podem sobreviver e se replicar, mas com uma capacidade muito menor de causar danos ao hospedeiro (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

A cápsula reduz a capacidade do sistema imunitário do hospedeiro de detectar a presença do patógeno e suprime a resposta imune. Ela impõe um impedimento físico a fagocitose, já que sua presença pode encobrir a maioria dos epítomos presentes na parede celular dificultando a ligação a receptores expressos em fagócitos, além de poder tornar as leveduras grandes demais para serem fagocitadas, como é o caso das “*titan cells*”. A cápsula também vai protegê-lo de condições estressantes como a desidratação, a ação de radicais livres e aos efeitos de outras moléculas microbidas (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; ZARAGOZA, 2019).

Os polissacarídeos capsulares também podem ser secretados, onde terão efeitos inibitórios a migração de neutrófilos e a ação de quimiocinas, vão impedir a ligação de leucócitos ao endotélio, se ligar aos receptores CD18, além de serem potentes indutores de

apoptose (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; KWON-CHUNG *et al.*, 2014; ZARAGOZA, 2019).

A melanina é um pigmento escuro, presente em muitos animais e microrganismos, funcionando como um antioxidante eficiente, que absorve radiação eletromagnética gerando proteção contra os efeitos de raios solares, por exemplo (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

A síntese da melanina ocorre por oxidação enzimática nos melanócitos e nos fungos há duas vias principais para produção: a 1,8-di-hidroxi-naftaleno (DHN) ou L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA). A via da L-DOPA é muito semelhante a produção de melanina em mamíferos e vai utilizar a L-DOPA ou a tirosina como moléculas iniciais (LIU *et al.*, 2021).

No caso específico do *C. neoformans*, ele utiliza a via da L-DOPA e não é capaz de produzir os precursores da melanina, exigindo a coleta de catecolaminas exógenas para iniciar o seu processo de melanização. A lacase é a enzima que catalisa a síntese da melanina de *C. neoformans* e é codificada, principalmente pelo gene *lac1*, embora possua o gene *lac2* expresso em menores níveis (LIU *et al.*, 2021).

Os melanossomos são vesículas intracelulares onde ocorre a síntese. Essas vesículas distribuem a melanina ao longo da camada mais profunda da parede celular, contribuindo para uma constituição mais rígida dessa parede (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; LIU *et al.*, 2021).

A melanina de *C. neoformans* confere algumas vantagens a ele nas suas relações ecológicas. Quando em seu habitat natural a melanina o protege da ação de raios ultravioleta e gama, e do calor, permitindo a sobrevivência mesmo em temperaturas extremas (SMITH; CASADEVALL, 2019). Também possibilita a absorção de radiação de alta energia para conversão em energia, os fazendo seres autotróficos limitados (LIU *et al.*, 2021).

Foi relatada a capacidade do *C. neoformans* de secretar fatores de virulência em exossomos, onde há evidência de lacase, bem como de melanina, o que contribui para o entendimento da patogênese e pode ajudar a elucidar o efeito imunomodulador desses fatores de virulência (EISENMAN *et al.*, 2009; SMITH; CASADEVALL, 2019).

A melanina também pode alterar a susceptibilidade do fungo a antifúngicos alterando a farmacocinética. A localização privilegiada na parede celular permite que os fármacos com efeitos citotóxicos permaneçam fora da célula, em um mecanismo ainda não completamente elucidado (SMITH; CASADEVALL, 2019).

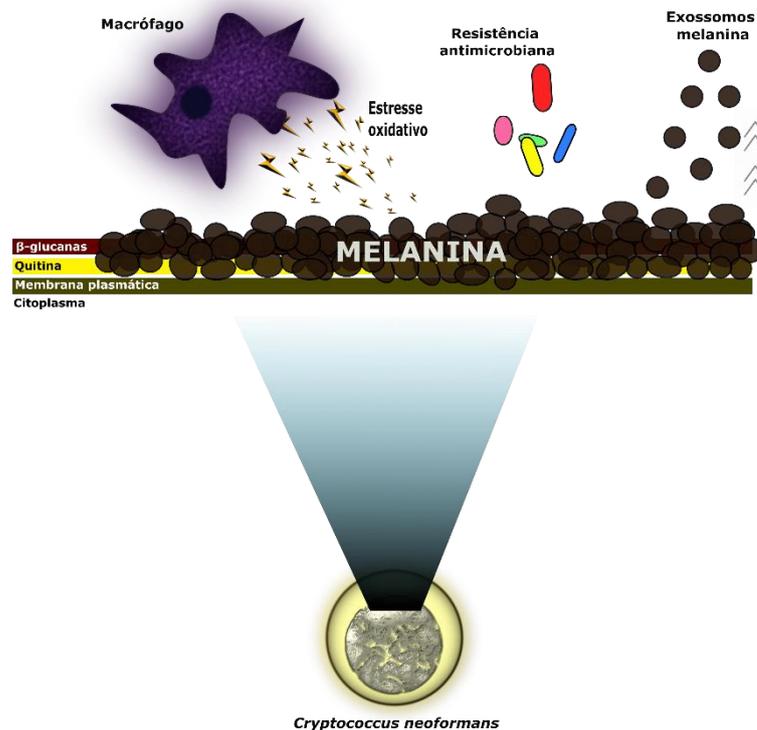
Com relação a fagocitose, esse importante fator de virulência também pode desempenhar fator protetivo. Alguns estudos trazem uma redução na fagocitose de exemplares

melanizados por macrófagos alveolares, enquanto outros mostram que mutantes acapsulares melanizados tiveram maiores taxas de fagocitose, podendo inferir que a cápsula de *C. neoformans* exerça um papel de esconder a melanina das ações da resposta imune inata do hospedeiro, bem como do reconhecimento para produção de anticorpos (SMITH; CASADEVALL, 2019).

Ainda não há um consenso sobre a ação imunomoduladora da melanina frente a fagocitose, pois outros fatores podem ser relevantes interferentes, como a velocidade da melanização, ação e quantidade de enzima lacase presente ou ainda captura de importantes íons como cobre e ferro (DE SOUSA et al., 2021, 2022; SMITH; CASADEVALL, 2019).

A figura 4 é um esquema gráfico sobre a melanina, sua localização nas leveduras e algumas funções no *C. neoformans*.

Figura 4 - A melanina está localizada na parede celular, e pode ser secretada para o meio extracelular em exossomos contendo também a enzima lacase e outros fatores de virulência que vão contribuir para o sucesso da infecção. A melanina executa papéis na proteção contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, contra a ação de antifúngicos, peptídeos antimicrobianos e enzimas antifúngicas.



Fonte: própria autoria.

A enzima lacase também é tida como um fator de virulência de *C. neoformans*. Há dois tipos produzidos, a LAC1 e a LAC2. A LAC1 se encontra em maior concentração ligada a parede celular, ao passo que a LAC2 pode ser encontrada no citoplasma das células, não

possuindo evidências de sua localização em outros compartimentos (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

Algumas das funções associadas a esta enzima são: biossíntese de melanina, na reação de Fenton feita em fagócitos a partir da oxidação de ferro, produção de neuro catecolaminas, e imunomodulação de prostaglandinas fúngicas (PARK *et al.*, 2020).

Com relação as ações do fungo no Sistema Nervoso Central, muito é possibilitado pela atividade da lacase, pois é ela que durante a invasão da barreira hematoencefálica, vai agir como facilitadora do neurotropismo, fazendo a oxidação das catecolaminas e íons lá presentes, essenciais para a sobrevivência e replicação do patógeno nesse sítio infeccioso (PARK *et al.*, 2020). Ela também será responsável por uma eosinofilia, seguida de uma distorção do perfil de macrófagos ativados para M2 e polarização para resposta Th2 (WANG *et al.*, 2022).

4.5 Interação patógeno-hospedeiro

Como já abordado, o contato com o *C. neoformans*, comumente, se dará nas primeiras fases da vida a partir da inalação de partículas suspensas contendo leveduras desidratadas ou basidiósporos. Essa exposição conduzirá a infecção primária, normalmente bem gerida, por se dar em indivíduos imunocompetentes com apresentações de sinais e sintomas clínicos da doença inespecíficos ou até mesmo assintomática.

A consequência desta primeira infecção pode ser a completa eliminação do fungo, ou o desenvolvimento de latência na forma de granulomas. Caso a latência ocorra, em um novo momento de imunocomprometimento, poderá haver a reativação do patógeno, onde a criptococose se manifesta requerendo tratamento.

Compreendida a história natural da doença, agora faz-se necessário entender os processos imunitários que a regem, assim como aprofundar na relação patógeno-hospedeiro.

A primeira linha de defesa contra a infecção por *C. neoformans* nos humanos é desempenhada pela imunidade inata. Ela tem início na mucosa nasal, passa pelo muco e pelos movimentos ciliares presentes em todo o trato respiratório com o objetivo de impedir a instalação e proliferação do microrganismo. Contudo, o fungo é capaz de evadir obtendo vantagens de seu tamanho. Os basidiósporos são estruturas de aproximadamente 1-2 μ m, o que permite que eles passem pelos brônquios, bronquíolos até chegar nos alvéolos pulmonares sem serem perturbados (ZHAO; LIN, 2021).

Chegando aos alvéolos, as principais células envolvidas no reconhecimento do patógeno são os macrófagos alveolares e as células dendríticas que vão utilizar da fagocitose, principal

resposta efetora frente uma infecção por *C. neoformans*, para eliminá-lo (NELSON *et al.*, 2021).

Dadas as propriedades antifagocíticas da cápsula de *C. neoformans*, a fagocitose precisa do processo de opsonização para ocorrer. As principais opsoninas envolvidas são as proteínas do sistema complemento e os anticorpos circulantes (ZARAGOZA, 2019).

O sistema complemento é composto por um conjunto de proteínas que são ativadas por meio de uma cascata enzimática, que pode ser iniciada pelas vias clássica, alternativa e pela via da lectina. No caso do *C. neoformans*, a cápsula é capaz de ativar esse sistema, principalmente pela via alternativa, causando a deposição de C3, mas as demais vias também podem ser utilizadas (ROHATGI; PIROFSKI, 2015).

Numa proporção menor, algumas proteínas de *C. neoformans* podem ser identificadas a partir do reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) expressos nas células imunitárias (ZHAO; LIN, 2021). Receptores de manose presentes em macrófagos e células dendríticas, por exemplo, podem reconhecer manoproteínas de *Cryptococcus* e assim mediar a fagocitose (ROHATGI; PIROFSKI, 2015). As células dendríticas são capazes de reconhecer antígenos capsulares via TLR2 e TLR4, o DNA de *C. neoformans* pode ser reconhecido via TLR9 (WOZNIAK, 2018).

Uma vez fagocitada, a levedura é internalizada no fagossomo que se funde a um lisossomo, resultando na formação do fagolisossomo e na liberação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. O lisossomo contém proteases, peptídeos antimicrobianos, entre outras moléculas que tem por função auxiliar na degradação do patógeno, além de facilitar o processamento destes para serem apresentados via MHC de classe II, completando a resposta imunitária efetora com a participação da imunidade adaptativa (CAMPUZANO; WORMLEY, 2018; NELSON *et al.*, 2021).

Os macrófagos e células dendríticas podem modular a resposta mediada por linfócitos T, pela sua função de apresentação de antígenos e pela secreção de citocinas e quimiocinas que induzem a diferenciação para linfócitos T auxiliares. No que tange ao status imune do hospedeiro, o padrão de resposta ponderado para Th1 com a ativação de macrófagos M1 é considerado efetor para eliminação do fungo. Ao passo que macrófagos ativados M2, tendem a favorecer a resposta ponderada Th2, considerada menos fungicida e, portanto, menos efetora (ROHATGI; PIROFSKI, 2015; WANG *et al.*, 2022). A resposta ponderada para Th17 está mais associada a imunidade de mucosas, autoimunidade (MUKAREMERA; NIELSEN, 2017).

A indução da ativação de macrófagos M1 é feita pela presença local de citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

(GM-CSF), de lipopolissacarídeos e do estímulo aos receptores TLRs. Os macrófagos M2, tem perfil anti-inflamatório sendo influenciados pelas citocinas IL-4 e IL-13 (WANG *et al.*, 2022).

A células dendríticas maduras, assim como os macrófagos ativados M1 secretam citocinas pro-inflamatórias, IL-12 e IFN- γ , influenciando os linfócitos T auxiliares a direcionarem a resposta para o perfil Th1. A resposta Th1 é caracterizada por um aumento na excreção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α (CAMPUZANO; WORMLEY, 2018). A produção destas citocinas no microambiente vai agir em um mecanismo de retroalimentação para manutenção deste padrão Th1, para a ativação de mais macrófagos M1 e supressão de outros tipos de resposta até que o patógeno seja neutralizado.

O padrão de resposta Th2 é induzido na presença de células dendríticas expressando as moléculas co-estimulatórias CD86 e OX40L e da IL-4, que também favorecerá a maturação de macrófagos M2. Esse padrão de resposta é rico em IL-4, IL-5 e IL-13 (MUKAREMERA; NIELSEN, 2017). Acredita-se que nesse tipo de resposta, os macrófagos funcionem como reservatórios para as leveduras, não sendo capazes de reduzir o crescimento fúngico, facilitando sua disseminação para outros órgãos e a contribuindo para a exacerbação da doença (WANG *et al.*, 2022).

4.6 A autofagia e o *C. neoformans*

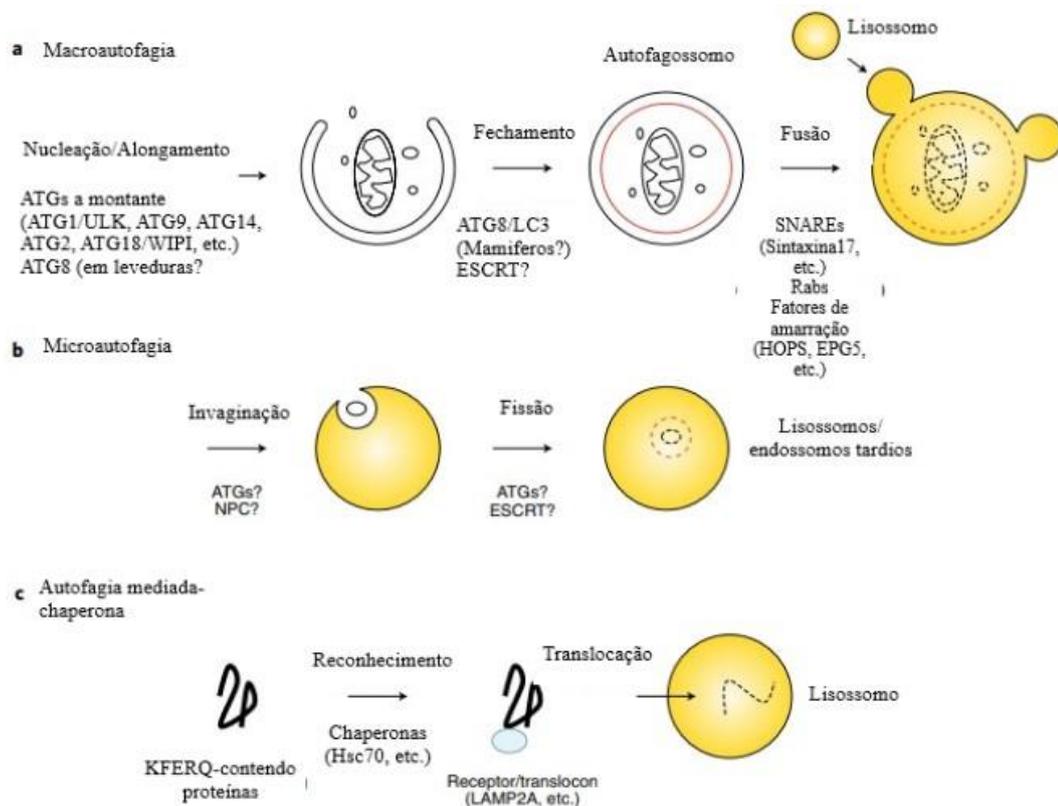
O termo autofagia foi inicialmente usado na década de 1960 por Christian de Duve, quando o definiu como um processo celular onde substratos intracelulares são conduzidos para degradação dentro de lisossomos. As estratégias utilizadas para entender esse mecanismo eram baseadas em bioquímica, fisiologia celular e técnicas ultra estruturais, trazendo avanços na compreensão da regulação e da morfologia de estruturas relacionadas (MIZUSHIMA, 2018).

Depois dos trabalhos do grupo de Yoshinori Ohsumi (prêmio Nobel de Medicina em 2016), muito se evoluiu na descoberta dos genes associados e muitos outros grupos contribuíram para que se chegasse hoje numa nomenclatura unificada de Genes Relacionados a Autofagia (ATGs). Atualmente tem-se a descrição de 16 genes classificados como essenciais (MIZUSHIMA, 2018).

Atualmente a autofagia é definida como um processo biológico fundamental, que se manifesta de, pelo menos, três formas conhecidas: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (MIZUSHIMA, 2018). Na figura 5, vê-se um esquema resumido da formação dos autofagossomos em cada um dos tipos de autofagia. A macroautofagia é a principal delas e tem por função geral a reciclagem, por digestão lisossomal, dos mais variados componentes intracelulares, indo desde proteínas a organelas inteiras, com o intuito de manter

a vitalidade e o equilíbrio funcional celular. Pode ser desencadeada por privação nutricional, sinalização intracelular, mal funcionamento de organelas e presença de patógenos (DERETIC; LEVINE, 2009; HECKMANN; GREEN, 2019).

Figura 5 - Dinâmica da formação de autofagossomos. A – Na macroautofagia uma espécie de saco membranar se alonga e se encurva para englobar estruturas citoplasmáticas. O processo é mediado por proteínas chamadas ATGs (incluindo ATG1/ULK, ATG9, ATG14, ATG2, ATG18/WIPI e ATG8/LC3). O segundo passo é o fechamento, que resulta em um autofagossomo de membrana dupla. Após a fusão com lisossomo, mediada por SNAREs, proteínas Rab e fatores de amarração, ocorre a degradação seletiva da membrana mais interna. B – Na microautofagia, uma porção do citoplasma é diretamente englobada pela membrana lisossomal, com a fase de invaginação e fissão também mediada por proteínas ATGs. As vesículas formadas são lançadas em lisossomos para degradação. C – A autofagia mediada por chaperonas não envolve membranas, porque proteínas com características específicas são reconhecidas e transportadas para o interior de lisossomos por receptores/translocon em um processo inteiramente mediado por chaperonas.



Fonte: Imagem traduzida de (MIZUSHIMA, 2018).

Fisicamente, o processo se inicia com a formação de uma estrutura composta por uma bicamada chamada de autofagossomo, que evolui estruturalmente até a fusão com um lisossomo onde ocorrerá a digestão do conteúdo (NICOLA *et al.*, 2012).

Com os avanços no entendimento desse mecanismo celular, percebeu-se que os impactos gerados por ele se estendem a muitas outras áreas, trazendo outros pontos de vistas para desafios já conhecidos. É o que se pode notar nos estudos recentes sobre a fisiopatologia

de algumas doenças neurodegenerativas, das neoplasias e de disfunções no sistema cardiovascular (WU; LU, 2020).

A maioria dos tipos celulares que compõe o corpo humano conservam alguns níveis de autofagia, sendo a escassez de nutrientes um dos principais gatilhos. Com os macrófagos não seria diferente, pois além de cuidar da própria regulação, eles são uma das principais pontes entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, com capacidade para imunomodulação da resposta imunitária como um todo (DERETIC; LEVINE, 2009; WU; LU, 2020).

A autofagia também está impactada diretamente no funcionamento do sistema imunitário e na resposta a infecção por patógenos. A coevolução dos seres eucariotos com microrganismos com capacidade para se desenvolver no ambiente intracelular trouxe uma pressão para a promoção de um processo efetivo no manejo destes, e nesse sentido a autofagia está diretamente conectada com processos de regulação da resposta imune inata, resposta imune adaptativa e processo inflamatório (DERETIC; LEVINE, 2009).

O reconhecimento de PAMPs via PRRs e toda a cascata que é desencadeada a partir desta ligação, também é capaz de ativar a autofagia por meio de uma via de sinalização diferente da autofagia clássica, utilizando a via da Fagocitose Associada a LC3, ou só LAP (HECKMANN; GREEN, 2019).

A via da LAP é uma das funções não clássicas que as proteínas associadas a autofagia desempenham na modulação da interação patógeno-hospedeiro. Essa via utiliza proteínas que estão envolvidas na via clássica da autofagia, incluindo aquelas que conjugam a família das proteínas de microtúbulo: MAP1LC3A, MAP1LC3B e MAP1LC3C, coletivamente designadas como LC3, à membrana de fagossomos (HECKMANN; GREEN, 2019).

Estudos mostraram que o estímulo a receptores de superfície como os TLR 1, 2, 3, 4, 5 e 7 podem induzir a formação dos autofagossomos, assim como a ligação ao receptor Dectina-1 regula processos dependentes de autofagia em macrófagos como secreção de proteínas e a fagocitose dependente de LC3 (MA *et al.*, 2012; WU; LU, 2020) . Quanto aos receptores intracelulares, eles podem estimular o início do processo de autofagia a partir da interação com genes específicos (ATGs) (WU; LU, 2020).

Na autofagia clássica, a LC3 tem função na seleção do conteúdo dos autofagossomos, fechamento dos autofagossomos, e apoio a fusão das membranas. Na LAP, ela tem funções a jusante, como na fusão fagossomo-lisossomo (HECKMANN; GREEN, 2019).

Neste ponto pode-se notar que a LAP pode ajudar no controle da infecção por patógenos que tem maquinaria desenvolvida para sobreviver dentro do hospedeiro como o *C. neoformans*.

São muitos os recursos que o sistema imunitário pode lançar mão na intenção de controlar a infecção por *C. neoformans*, mas talvez sejam igualmente variados os mecanismos pelos quais o fungo pode utilizar fatores de virulência e mecanismos de adaptação para modular a resposta imune, evadindo dela com sucesso.

6 METODOLOGIA

6.1 Cultura de células

6.1.1 Fungos

Para todos os experimentos foram utilizadas as cepas H99 (selvagem) como representante de cepa melanogênica e LAC1 (mutante para o gene LAC1, principal responsável pela produção de melanina) como representante de cepa não melanogênica do fungo *C. neoformans*.

As duas cepas partiram de um estoque a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ preservadas em glicerol, passaram por uma etapa de descongelamento e enriquecimento em caldo Sabouraud. Uma alçada contendo $100\text{ }\mu\text{l}$ de cada cepa criopreservada foi inoculada em 10 ml de caldo Sabouraud e incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação constante de 200 rpm por um período de 72 h . Ao final deste tempo, as culturas líquidas eram então semeadas por esgotamento em ágar Sabouraud a fim de se obter colônias isoladas para execução dos experimentos.

Para obtenção das culturas isoladas cada cepa em meio líquido foi cultivada em ágar Sabouraud (10 g de peptona, 20 g de dextrose e 18 g de ágar, $\text{pH: }5,6$) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas . Ao fim deste período, as placas eram mantidas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 15 dias e depois descartadas.

A cada ciclo de 15 dias , este processo era feito para que os experimentos fossem realizados com culturas jovens. A figura 6 apresenta um resumo esquemático desse processo.

Figura 6 - Esquema ilustrativo do cultivo das cepas de *C. neoformans*.



Fonte: autoria própria.

6.1.2 Macrófagos J774

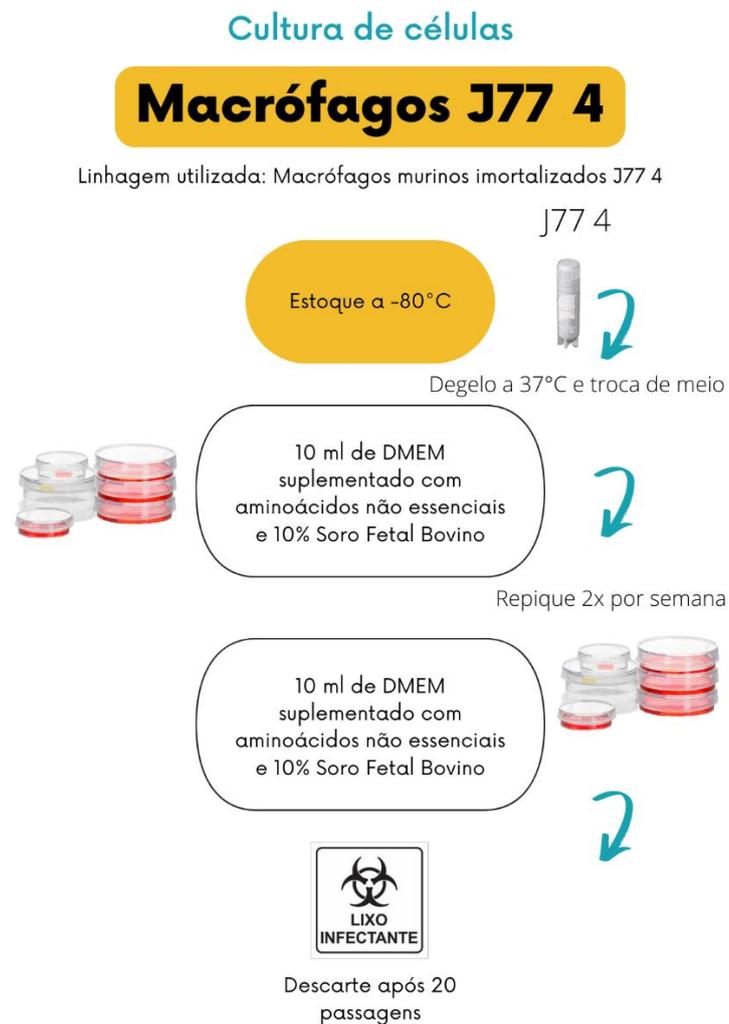
Foram utilizados nesse estudo macrófagos murinos imortalizados J774 vindos de um estoque a -80°C . Essas células eram mantidas em meio DMEM, a 37°C e 5 % de CO_2 , com suplementação de aminoácidos não essenciais e 10 % de soro fetal bovino.

A manutenção das culturas era feita num esquema de repique de 2 – 3 dias, ou antes caso houvesse confluência na placa. Foram feitos até 20 repiques com posterior descarte da cultura.

As células eram criopreservadas com DMSO a 10 %, com estoques renovados a cada 6 meses.

A figura 7 contém um resumo da manutenção dessas células.

Figura 7 - Esquema do manejo das células J774



Fonte: autoria própria

6.2 Indução da produção de melanina em *C. neoformans*

Para indução da produção de melanina nas cepas H99 e LAC1 de *C. neoformans*, partia-se de uma colônia isolada de cada cepa respectiva cultivada em ágar Sabouraud e mantida a 4 °C.

Essas colônias isoladas eram inoculadas em 10 ml de caldo Sabouraud para enriquecimento por 72 horas a 37 °C com agitação constante de 200 rpm. Ao fim desse período, as culturas líquidas eram lavadas e tinham seu meio trocado para Meio Mínimo Glicina (3 g de glicose; 0,975 g de glicina; 2,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado; 4 g de fosfato de potássio monobásico) suplementado com tiamina (51 µl por litro).

Neste estudo foram testadas duas condições de suplementação para produção de melanina, 24 e 48 horas. As culturas eram suplementadas em Meio Mínimo Glicina em dias diferentes de acordo com o planejamento dos desafios experimentais. Nos dias adequados, as culturas recebiam 1 mM de L-DOPA.

O grupo controle para melanização era processado junto com os demais, mas sem receber a suplementação de L-DOPA.

Um tubo Falcon contendo 10 ml de meio mínimo suplementado com L-DOPA estéril foi processado nas mesmas condições das culturas fúngicas para controle de autopolimerização.

6.3 Co-incubação fungo-macrófago

Para co-incubação, a cultura de J774 era utilizada entre o terceiro e vigésimo repique e as cepas fúngicas já tendo passado pelo processo de indução de melanização.

Os macrófagos J774 eram processados um dia antes dos desafios experimentais. Foram coletados das placas de cultura, concentrados e contados em câmara de Neubauer com auxílio de corante de vitalidade celular para determinação de um inóculo de 1×10^5 células/ ml. Em seguida, eram distribuídos nas placas de 96 poços (para ensaio de fagocitose), 24 poços (para os ensaios de detecção de LC3), na densidade de 1×10^4 células/ poço. Essas placas eram incubadas em estufa para cultura de células com atmosfera de 5 % de CO₂ por 24 horas, contendo então no dia seguinte 2×10^4 células/ poço.

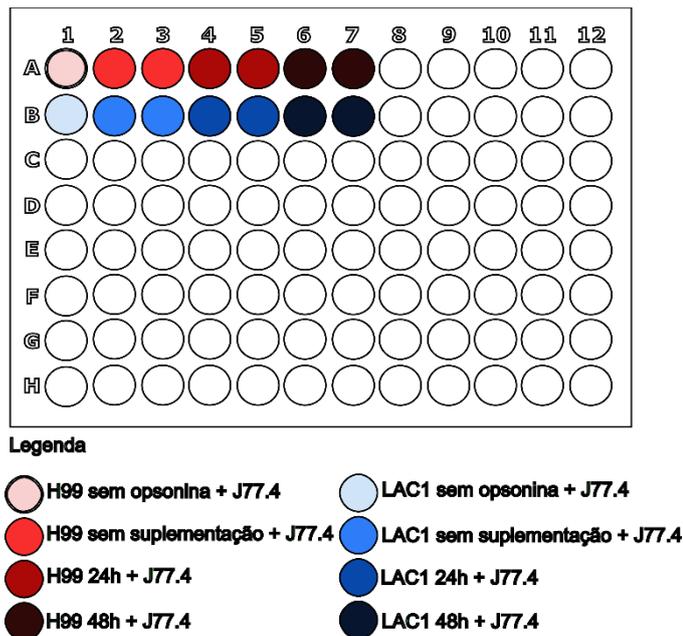
Os fungos eram submetidos ao processo de indução de melanização de forma que no dia dos desafios experimentais tivessem as condições de 24 e 48 horas de melanização satisfeitas. Foi usada uma proporção de 2:1, ou seja, 2 fungos para cada macrófago, nos ensaios de fagocitose e detecção de LC3. Uma alíquota das culturas fúngicas era diluída em tampão PBS estéril (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄ e NaPO₄ mM, pH 7,2-7,4), contada em câmara de Neubauer e então a solução fúngica era preparada.

O anticorpo monoclonal anticápsula 18B7 foi utilizado como opsonina nos ensaios. O anticorpo era adicionado as soluções fúngicas 30 minutos antes das infecções. Depois do período de opsonização, as soluções fúngicas eram plaqueadas nos seus respectivos poços para co-incubação com os macrófagos. Os tempos de infecção variam para cada experimento.

6.4 Fagocitose

Neste experimento os macrófagos J774 foram infectados com cada uma das cepas fúngicas em três condições diferentes: Sem suplementação para melanização; com 24 horas de suplementação para melanização e com 48 horas de suplementação para melanização. Haviam poços de interação sem opsonina, para controle da opsonização. Um esquema da distribuição das células nos poços está presente na figura 8.

Figura 8 - Ensaio de fagocitose. Distribuição das células na placa de 96 poços.



Fonte: autoria própria

A infecção ocorria por duas horas após a opsonização dos fungos e ao fim desse período, cada poço era lavado por 3 vezes com PBS para retirada de fungos não fagocitados. Com os poços lavados esses eram corados com o Kit Instant prov (panóptico), seguindo as instruções da bula, com a finalidade de corar os macrófagos e evidenciar assim a fagocitose.

A placas foram analisadas em microscópio invertido (Zeiss primover), tendo 4 campos fotografados de forma aleatória. Todos os macrófagos presentes nos campos eram contados e estratificados em contendo ou não fungos, depois era determinada a quantidade de fungos em cada macrófago.

O experimento foi feito em duplicata biológica e triplicata técnica.

6.5 Detecção de LC3

A detecção de LC3 foi feita por microscopia de imunofluorescência no microscópio confocal Leica TCS SP5. O preparo de amostras para microscopia é etapa essencial para o sucesso de qualquer experimento que se valha desta metodologia e é o que determina a obtenção de boas imagens de alta resolução quando em uso de equipamentos tão potentes e versáteis como um microscópio confocal. Esse preparo passa pela escolha de lâminas e lamínulas adequadas, pela escolha dos reagentes mais adequados a proposta e culmina na definição de parâmetros adequados no microscópio.

Existem muitas variedades de lâminas no mercado atual, de tamanho, espessura e estilos diferentes, que serão adequadas a cada finalidade, objetivo e objeto analisados. As lâminas de vidro padrão tem entre 1mm a 1,2mm de espessura.

A maior parte das objetivas atuais são projetadas para serem utilizadas com lamínulas de até 0,17mm, ou 170 μ m para controle dos artefatos relacionados a fenômenos da óptica geométrica.

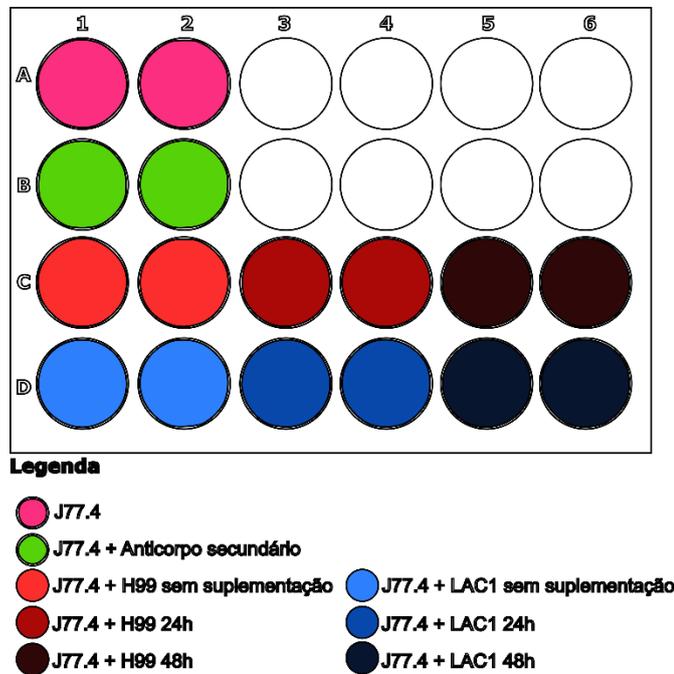
Para oportunizar a detecção de LC3 por microscopia de imunofluorescência, o cultivo dos macrófagos J774 bem como a etapa de infecção pelos fungos precisava ocorrer em um ambiente que pudesse ser observado posteriormente por microscopia. Para isso, utilizamos lamínulas circulares estéreis, de vidro, com 13mm de diâmetro e espessura de 0,13 a 0,16mm, dispostas no fundo de cada poço da placa de 24 poços. As lâminas foram de 25,4 x 76,2 mm, de 1 a 1,2mm de espessura, com borda fosca e arestas lapidadas.

As lâminas e lamínulas utilizadas no experimento passaram por um protocolo de lavagem com detergente Extran, álcool 70% e esterilização por autoclavagem, sendo previamente inspecionadas visualmente e se necessário esfregadas para eliminação de sujidades como pós, poeira ou pelos.

Os macrófagos J774 foram cultivados em placa para cultivo celular de 24 poços com lamínulas em duplicata, na seguinte distribuição: J774 apenas para controle de autofluorescência; J774 com anticorpo secundário para controle de ligações inespecíficas; J774 com H99 sem suplementação para melanização; J774 com H99 com suplementação para melanização por 24 horas; J774 com H99 com suplementação para melanização por 48 horas; J774 com o mutante LAC1 sem suplementação para melanização; J774 com o mutante LAC1 com suplementação para melanização por 24 horas; J774 com o mutante LAC1 com

suplementação para melanização por 48 horas. A figura 9 apresenta um esquema gráfico da disposição da placa experimental.

Figura 9 - Ensaio para detecção de LC3 por imunofluorescência. Distribuição das células na placa de 24 poços.



Fonte: autoria própria

Com os fungos já nas condições de melanização necessárias, foram opsonizados por 30 minutos antes da infecção. Após esse período, os fungos eram distribuídos em seus respectivos poços e co-incubados para infecção por 12 horas em estufa para cultura de células com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C.

Após as 12 horas de infecção, foram feitos os procedimentos para fixação das células, as reações antígeno-anticorpo para detecção de LC3 por imunofluorescência e a montagem das lâminas.

Cada poço foi lavado com tampão PBS, adicionado de metanol e incubado por 10 minutos a -20 °C, para fixação e permeabilização das células. Após a incubação com metanol, os poços foram lavados e adicionados da solução do anticorpo primário (Rabbit IgG anti LC3-beta diluído em solução de bloqueio a 1 %) para detecção de LC3 nos autofagossomos. Após 1 hora a 37 °C, os poços foram lavados e adicionados da solução do anticorpo secundário (Goat anti-Rabbit IgG conjugado com AlexaFluor 488 diluído em solução de bloqueio a 1 %) para revelação da reação antígeno-anticorpo ocorrida no passo anterior. Após 1 hora a 37 °C, os poços foram lavados e as lâminas montadas utilizando o meio de montagem Prolong Diamond.

As lâminas já montadas, foram curadas por 24 horas a temperatura ambiente e posteriormente seladas. Foram mantidas a 4 °C em estojo para lâminas de microscopia.

O experimento foi realizado em duplicata biológica e duplicata técnica.

6.6 Microscopia confocal e fluorescência

As lâminas foram analisadas utilizando o microscópio confocal Leica TCS SP5 equipado com a objetiva HCX PL APL0 lambda blue 63x 1.4 OIL. Os lasers utilizados foram íon argônio e 405 diodo com 30% de potência para cada um. Os fotodetectores foram ajustados as suas faixas de emissão. Para visualização das imagens e ajuste de parâmetros para coleção foi utilizada uma velocidade de varredura de 400Hz, resolução de 1024 x 1024 pixels. Para captura foram mantidos todos os demais parâmetros, apenas reduzindo a velocidade de varredura para 100Hz.

6.7 Análise das imagens

Foram capturadas pelo menos 20 imagens representativas de cada lâmina. Todos os macrófagos presentes no campo fotografado foram contados, estratificados para com e sem fungo. Aqueles que tinham pelo menos uma levedura internalizada em vacúolo evidenciado pela presença de um halo fluorescente em torno, eram considerados positivos.

6.8 Estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism versão 9.4.1. Para a avaliação dos resultados do ensaio de fagocitose e detecção de LC3 foi utilizado o Teste Exato de Fisher.

Para que os resultados encontrados fossem julgados como estatisticamente significantes, foi adotado o valor de $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

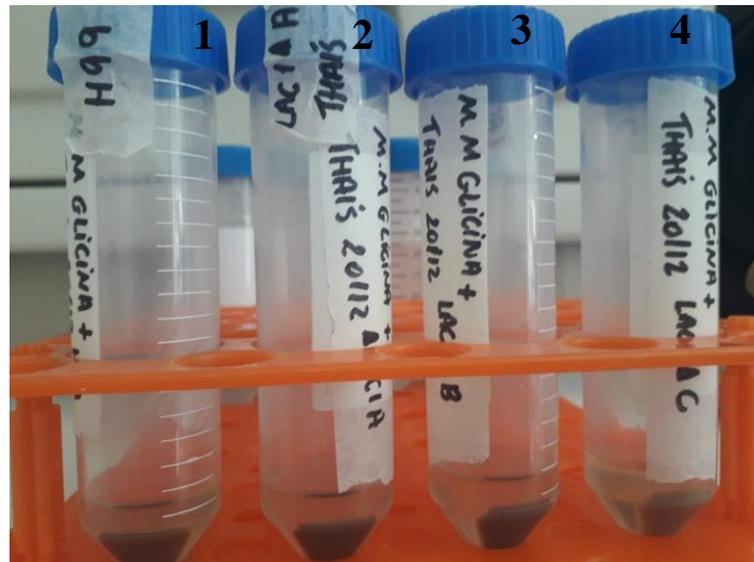
7.1 Melanização das cepas fúngicas

O selvagem apresentou sinais de produção de melanina consistentes dentro do tempo estabelecido (24 e 48 horas). O mutante não produziu melanina detectável nos mesmos tempos que o selvagem, mantendo o meio sem alterações de cor que é um indicador da presença de melanização.

As culturas eram mantidas sob mesmas condições para além dos tempos utilizados em experimentação e observamos que com o passar dos dias, as culturas da cepa selvagem chegavam a um pico máximo de produção de melanina onde não se observava mais escurecimento do meio. Contudo, o mutante após 5 dias apresentava escurecimento do meio de cultura, não sendo possível mais distinguir, visualmente, entre selvagem e mutante.

A imagem a seguir mostra a cepa LAC1 melanizada após 5 dias. Os tubos foram centrifugados e é possível ver o meio claro, com o sedimento escuro.

Figura 10 - Tubos Falcon contendo culturas do mutante LAC1 melanizados tardiamente e do selvagem melanizado. Após centrifugação o meio permanece claro, mas o sedimento apresenta escurecimento. O tubo 1 contém a cepa selvagem e os demais o mutante LAC1.



O controle para autopolimerização foi submetido as mesmas condições das culturas, mantendo-se estéril e sem alterações de cor.

7.2 Ensaio de fagocitose

O objetivo deste experimento era verificar se a melanina de *C. neoformans* era capaz de afetar a fagocitose de macrófagos J774. Após 2 horas de co-incubação, os poços eram lavados para retirada de fungos não internalizados e coramos cada poço com corante panóptico para revelação do fenômeno a microscopia de luz. Foi a partir das fotos obtidas de cada poço que as

células foram contadas. Nas figuras 11 e 12 temos imagens representativas daquelas obtidas durante o experimento.

Figura 11 – Fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos J774. Nesta figura vê-se os macrófagos J774 (células maiores, alongadas, fusiformes, algumas com pseudópodes e com leveduras internalizadas) e o *C. neoformans* (células diminutas e arredondadas). Os fungos desta imagem são da cepa selvagem H99 e passaram por suplementação para produção de melanina por 48 horas.

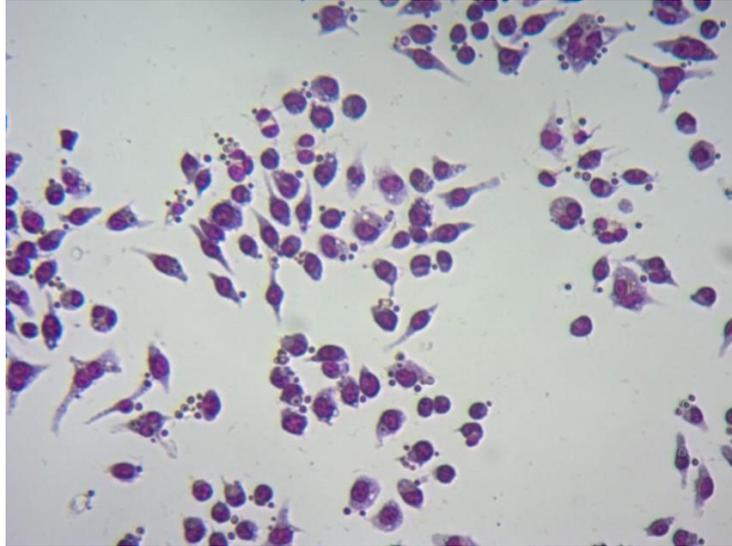
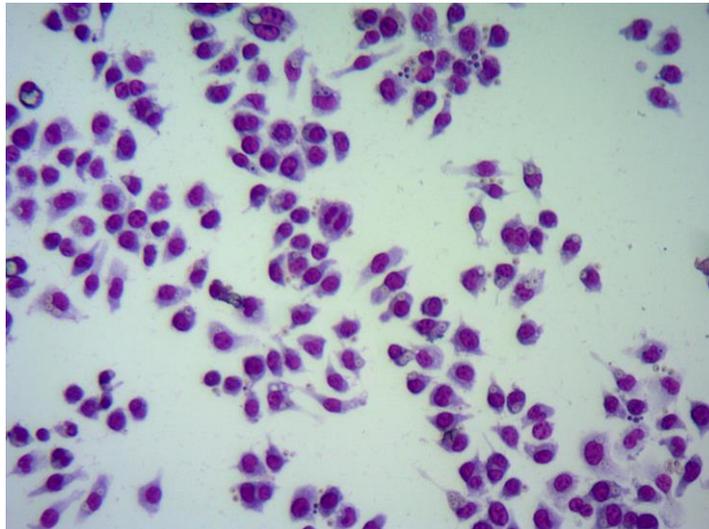


Figura 12 - Fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos J774. Nesta figura vê-se os macrófagos J774 (células maiores, alongadas, fusiformes, algumas com pseudópodes e com leveduras internalizadas) e o *C. neoformans* (células diminutas e arredondadas). Os fungos desta imagem são da cepa mutante LAC1 e passaram por suplementação para produção de melanina por 48 horas.



Quando analisamos a cepa selvagem (H99), vemos que houveram diferenças estatisticamente significativas nos valores de fagocitose quando confrontamos o grupo controle (não recebeu suplementação para melanização) com o grupo que recebeu suplementação por 24 horas e também por 48 horas. Há uma queda na capacidade de fagocitose quando

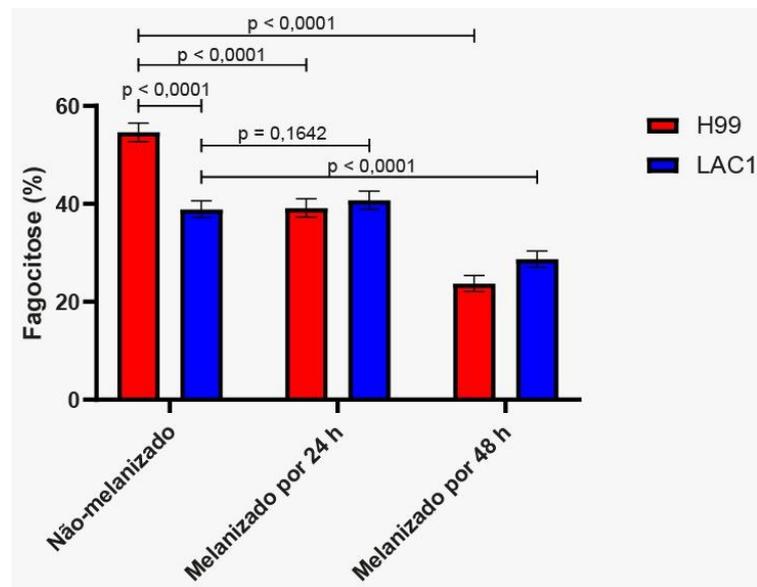
suplementamos os fungos por 24 horas, e os valores se mantem reduzidos quando comparamos com o grupo suplementado por 48 horas.

Na análise do mutante para o gene LAC1, vemos que não houve diferença significativa com relação ao grupo controle (não recebeu suplementação para melanização) quando comparado ao grupo que foi suplementado por 24 horas. Quando comparamos com o grupo que recebeu suplementação por 48h, nota-se que há uma redução significativa na fagocitose, mostrando que pudesse haver outro interferente para o fenômeno que não apenas a melanina.

Quando verificamos a performance quanto a fagocitose do selvagem (H99) frente ao mutante (LAC1) na ausência de suplementação para melanina, vemos que os macrófagos demonstram maior capacidade de fagocitar o selvagem do que o mutante.

O gráfico 1 mostra o compilado dessas informações.

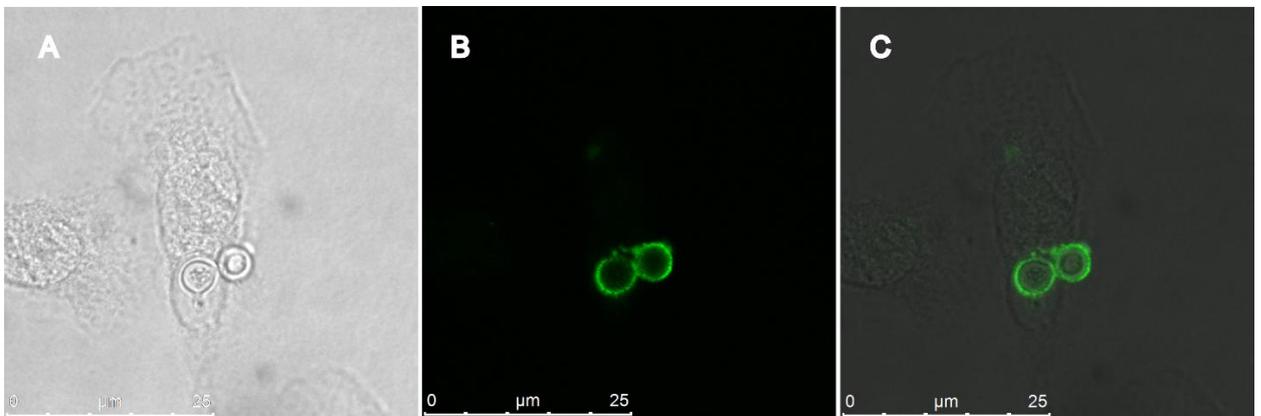
Gráfico 1 – Porcentagem de fagocitose da cepa selvagem (H99) e da cepa mutante (LAC1) opsonizadas com anticorpo 18B7 após 2 horas de co-incubação com macrófagos J774. No eixo y está a porcentagem de macrófagos com fungos internalizados e no eixo x os tempos de suplementação para melanização a que cada cepa foi exposta. A barra em vermelho reflete a porcentagem de macrófagos J774 com evidência de fagocitose para o selvagem H99, em azul para o mutante LAC1. As barras de erro indicam média e desvio padrão. O experimento foi repetido três vezes, em duplicata biológica. Para análise destes dados foi executado o teste exato de Fisher e para teste de hipótese o valor de $p < 0.05$.



7.3 Detecção e quantificação de LC3

Para realizar a detecção e quantificação do marcador de autofagossomos LC3 foi realizado um ensaio de imunofluorescência. O objetivo deste experimento era verificar se a melanina de *Cryptococcus* seria capaz de alterar a ocorrência de Fagocitose associada a LC3 (LAP). A figura 13 é ilustrativa desse fenômeno e apresenta as imagens em campo claro, fluorescência e fusionadas.

Figura 13 - Detecção de LC3 por imunofluorescência. Em A, temos macrófagos e leveduras em campo claro. Em B, aparecem as leveduras recobertas por anticorpos fluorescentes anti - LC3 evidenciando a presença de LC3. Em C, temos as imagens fusionadas.



As figuras 14 e 15 mostram o controle para autofluorescência, e para o anticorpo secundário, respectivamente.

Figura 14 - Controle para autofluorescência dos macrófagos J774. A ausência de fluorescência valida este controle.

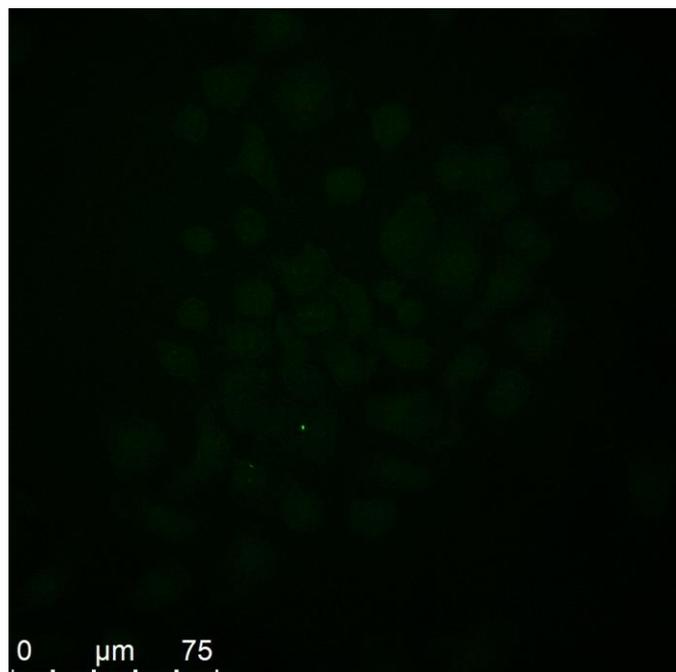
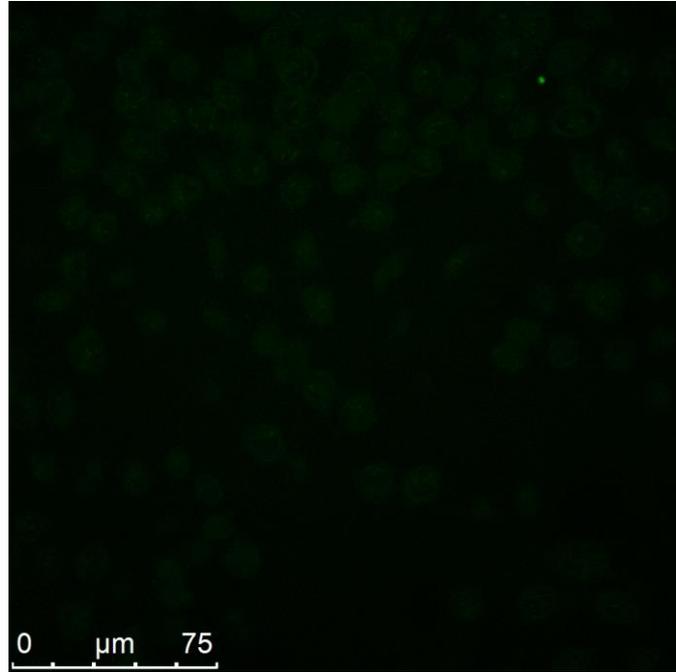


Figura 15 - Controle para o anticorpo secundário. A ausência de fluorescência valida o experimento.



Nas figuras 16 e 17 temos imagens representativas daquelas obtidas durante o experimento.

Figura 16 - Imagens ilustrativas do ensaio para detecção e quantificação de LC3 na cepa selvagem (H99). Em A, H99 sem suplementação para melanização. Em B, as células fúngicas foram suplementadas por 24 horas. Em C, a suplementação ocorreu por 48 horas. As setas indicam leveduras.

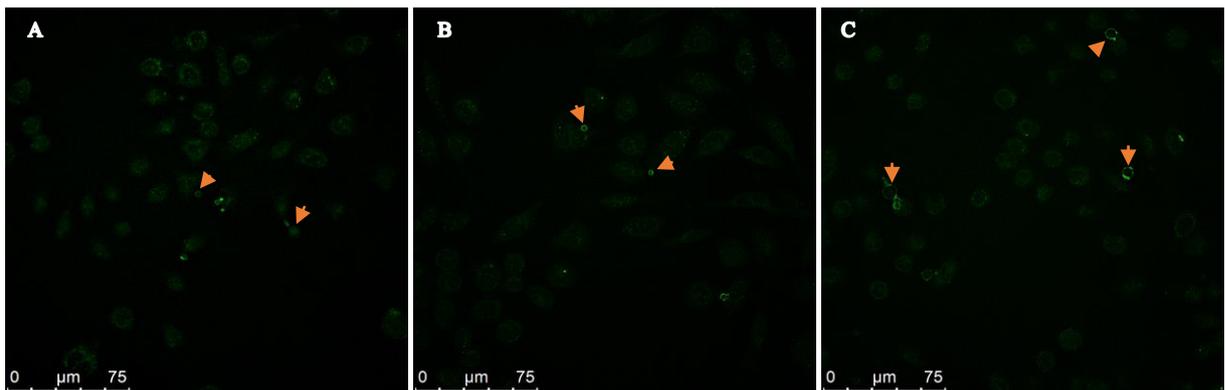
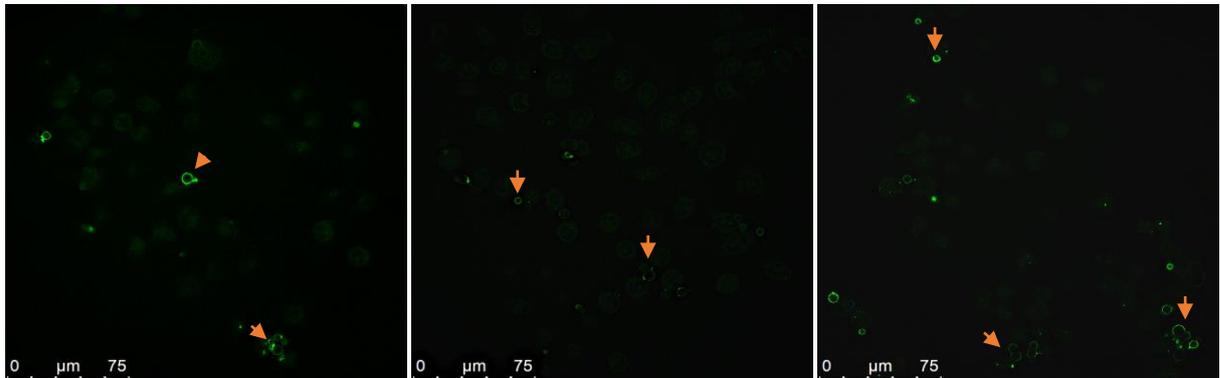


Figura 17 - Imagens ilustrativas do ensaio para detecção e quantificação de LC3 na cepa mutante (LAC1). Em A, LAC1 sem suplementação para melanização. Em B, as células fúngicas foram suplementadas por 24 horas. Em C, a suplementação ocorreu por 48 horas. As setas indicam leveduras.



A cepa selvagem (H99) mostrou uma diminuição, em número absolutos, de macrófagos apresentando vacúolos LC3 positivos quando comparado ao exemplar suplementado para melanização por 24 horas. Um aparente aumento foi visto na contagem de macrófagos apresentando vacúolos LC3 positivos no exemplar suplementado por 48 horas, porém esses valores não se mostraram estatisticamente significativos.

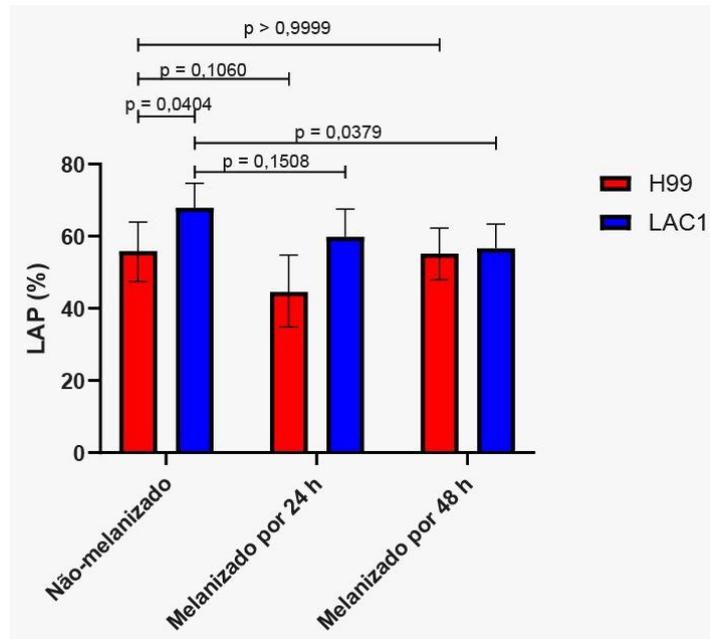
O mutante (LAC1) teve um padrão semelhante ao do selvagem quanto a valores absolutos. Na comparação com o controle sem suplementação para melanização, o grupo que recebeu suplementação por 48 horas demonstrou uma maior ocorrência de vacúolos LC3 positivos, com valores estatisticamente significantes.

Quando comparamos a cepa selvagem e o mutante LAC1, ambos sem suplementação para melanina, vemos que os macrófagos infectados pelo mutante recrutaram mais LC3 do que aqueles infectados com selvagem.

O gráfico 2 apresenta os dados para a detecção de LAP nas condições testadas.

Gráfico 2 - Quantificação de LC3 com relação a cepa selvagem (H99) e a cepa mutante (LAC1) sem adição de suplementação para melanização, com melanização por 24 h e 48 h. A barra em vermelho indica a porcentagem de macrófagos J774 que tiveram vacúolos expressando LC3 para o selvagem H99, e em azul para o mutante LAC1. As barras de erro indicam média e desvio padrão. O experimento foi

realizado uma vez em duplicata. Para análise destes dados foi executado o teste exato de Fisher e para teste de hipótese o valor de $p < 0.05$.



8 DISCUSSÃO

O *Cryptococcus neoformans* possui alguns fatores de virulência e mecanismos de adaptação ao hospedeiro, que são essenciais para sua persistência durante a infecção. Alguns desses fatores de virulência são mais extensamente estudados que outros, mas todos se mostram relevantes para que se entenda melhor a patogênese da doença, assim como oferecem caminhos para melhores alvos terapêuticos (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; RATHORE *et al.*, 2022).

Um dos fatores de virulência de *C. neoformans* examinados é a melanina, importante componente para estrutura e rigidez da parede fúngica, dando múltiplas vantagens para as células fúngicas, tanto no ambiente quanto durante a interação patógeno-hospedeiro (LIU *et al.*, 2021; SMITH; CASADEVALL, 2019).

Com relação as prováveis interferências na interação patógeno hospedeiro, um estudo comparou as respostas imunes celulares direcionadas a duas cepas, uma altamente produtora de melanina e outra com baixa capacidade de produção, e concluiu que a melanina de *C. neoformans* não o protegia da ação de células imune efetoras, mas poderia inibir o seu reconhecimento através da regulação negativa da fase aferente da imunidade mediada por células T, diminuindo a produção de TNF- α e dificultando a linfoproliferação (HUFFNAGLE *et al.*, 1995).

Outra resposta imune efetora que pode ser afetada pela melanina é a fagocitose. Uma hipótese é que por possuírem cargas negativas, as células fagocíticas e as células fúngicas sofreriam repulsa eletrostática dificultando a ocorrência da fagocitose (NOSANCHUK; CASADEVALL, 1997).

Alguns estudos consolidados destacam que cepas não-melanogênicas tem sua virulência reduzida (SALAS *et al.*, 1996). Outros revelam que cepas produtoras de melanina podem suprimir a respostas imune inflamatória, além de contribuírem para infecções fatais no sistema nervoso central (SABIITI *et al.*, 2014). DE SOUSA e colaboradores (2022), analisando amostras clínicas de *C. neoformans*, observaram que a rapidez na melanização era mais importante para a virulência do fungo do que a própria produção de melanina.

Neste estudo co-incubamos duas cepas de *C. neoformans* (a selvagem, produtora de melanina e uma mutante para o gene LAC1) com macrófagos J774, afim de analisarmos interferências da melanina na fagocitose.

Quando comparamos o selvagem com o mutante para lacase (LAC1), ambos sem qualquer suplementação para melanina, vimos que o selvagem era mais fagocitado que o mutante. O estudo de Sabiiti e colaboradores (2014), mostrou que cepas hipocapsulares, que

tinham alta atividade de lacase sem necessariamente serem mais melanizadas, eram mais facilmente fagocitadas e se mantinham vivas intracelularmente, demonstrando os efeitos acessórios desta enzima, onde o mecanismo de fagocitose era manipulado pelo fungo para se manter no hospedeiro.

O selvagem mostrou queda nos níveis de fagocitose à medida que se avançava o tempo de suplementação para melanina. O que pode contribuir para a alteração da fagocitose é a mudança de carga de superfície das células fúngicas (LIU *et al.*, 2021) e estudos de fagocitose *in vivo* mostraram que cepas produtoras de cápsula, na presença de melanina eram mais resistentes a fagocitose mediada por anticorpos que os espécimes sem melanina (MEDNICK; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2005).

A melanina de *C. neoformans* interfere na fagocitose como vimos em nosso estudo e pode proteger o fungo da morte uma vez que ele for fagocitado. Em um estudo que analisou 18 cepas de *C. neoformans* capazes de melanizar em diferentes níveis, foi visto que quanto mais capacidade de melanizar a cepa tinha, menos susceptível aos mecanismos de eliminação por macrófagos ela era (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995). Comportamento semelhante foi visto em conídios melanizados de *Sporothrix schenckii* (ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000) e também nos conídeos de *A. fumigatus* (HILLMANN *et al.*, 2015) onde os exemplares melanizados foram protegidos da fagocitose.

O mutante para o gene LAC1 tinha deficiência para produção da enzima homônima, que se acredita ser expressa em maior quantidade pelas leveduras e também ter sua concentração na parede celular (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; LIU *et al.*, 2021). Neste trabalho vimos mudanças significativas, quanto a fagocitose, apenas quando comparamos o mutante sem suplementação para melanização com o mutante suplementado por 48 horas, onde houve queda na fagocitose.

O mutante, a partir do dia 5 de cultivo, apresentou mudanças na cor do meio, mostrando produção de melanina. Pukkila-Worley *et al.* (2005) verificou situação semelhante em um estudo sobre cepa mutada para o gene LAC1 onde, assim como em nosso trabalho, não foi verificada auto polimerização dos componentes do meio e mesmo assim o pigmento foi detectado. A produção de melanina faz parte de um complexo sistema do qual fazem parte outros componentes e que podem ser responsáveis pela produção de melanina mesmo em mutantes.

A autofagia é um mecanismo celular conservado em eucariotos. Para além das funções já discutidas, destacamos a imunomodulação exercida sobre as imunidades inata e adaptativa, prevenindo os danos da inflamação excessiva e os danos colaterais. A LAP compartilha

mecanismos e funções com a autofagia clássica, e por isso as vezes é custoso distinguir as duas. Assim como a autofagia, a LAP também está envolvida na resposta a patógenos, esporos de *A. fumigatus* induzem o recrutamento de LAP, assim como o zimosan presente na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* também (MARTINEZ et al., 2015).

Em *Candida albicans*, após sofrerem morte por calor, os esporos são recobertos por LC3, mas com relação a células fúngicas viáveis não (TAM et al., 2014). Há resultados consistentes também *in vivo* como observado num estudo com o modelo animal *zebra fish* (BROTHERS et al., 2013).

Neste presente estudo, objetivamos saber se a melanina de *C. neoformans* interferia na detecção e quantificação da LAP em macrófagos J774. O mutante mesmo sem suplementação para melanina, demonstrou maior quantidade de células com a presença da proteína marcadora de autofagossomos que o selvagem.

Quando adicionada a suplementação, o selvagem não trouxe diferenças significativas, enquanto o mutante mostrou um incremento na quantidade de macrófagos expressando vacúolos fluorescentes em resposta a detecção de LC3, mas apenas no exemplar submetido a 48 horas de suplementação.

Esse cenário mostra que outros fatores, que não só a melanina, tenham efeitos quanto a evasão da resposta de macrófagos. É importante salientar que, a principal característica que diferenciava o selvagem do mutante era a capacidade de melanizar, mas ambos ainda poderiam expressar lacase, embora não o fosse no mesmo nível.

Embora seja produtor de um tipo de melanina diferente, a DHN, o *Aspergillus fumigatus* a utiliza para inibir a ocorrência de LAP (AKOUMIANAKI et al., 2016) e esta interferência não está restrita a melanina presente na parede do fungo, mas sim a propriedades do próprio pigmento (CHAMILOS et al., 2016). O agente etiológico da mucormicose, *Rhizopus oryzae*, também utiliza da melanina para prolongar sua sobrevivência quando em ambiente intracelular, dificultando a identificação pela LAP, além de atrapalhar a maturação dos fagossomos (ANDRIANAKI et al., 2018).

9 CONCLUSÃO

Neste trabalho mostramos a interação de cepas de *C. neoformans* melanogênicas e não melanogênicas com o intuito de observar prováveis efeitos imunomodulatórios da melanina do fungo.

Fizemos a infecção de macrófagos J774 com cepas de *C. neoformans* submetidos a suplementação para melanização por 24 e 48 horas para verificar efeitos na fagocitose e também na autofagia associada a LC3 (LAP). Após 2 horas de infecção, vimos que os exemplares produtores de melanina apresentavam menos taxas de fagocitose com a adição da melanina, com redução acentuada após 48 horas de suplementação. O mutante LAC1, representante não melanogênico, mostrou redução na fagocitose apenas quando suplementado por 48 horas. E quando analisamos cada cepa, sem adição de suplementação para melanina, o selvagem é mais fagocitado que o mutante.

A presença de melanina de *Cryptococcus* não foi capaz de trazer efeitos significativos para recrutamento de LC3 na interação com a cepa selvagem em nenhum dos momentos de suplementação. Com relação ao mutante, apenas após 48 horas de suplementação. Entretanto, quando comparamos o selvagem e o mutante sem suplementação para melanina, o mutante apresenta maior ocorrência de LAP que o selvagem.

Foi possível detectar a presença de melanina na cultura do mutante LAC1 após 5 dias de cultivo em meio mínimo suplementado com L-DOPA.

Em resumo, constatamos que a deleção do gene produtor da enzima lacase causou a diminuição da fagocitose e que a presença de melanina a inibe. Há influências da L-DOPA mesmo no mutante LAC1, que apresentou alterações nos experimentos com suplementação para melanização por 48 horas, além de melanização tardia (após 5 dias). Em nosso estudo o estímulo para melanização não alterou a LAP, mas a lacase indicou ser relevante para a evasão deste importante mecanismo presente em macrófagos.

REFERÊNCIAS

- AKAIHE, C. L.; NWEZE, E. I. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in Western Africa. [S. l.]: **Blackwell Publishing Ltd**, 2021.
- AKOUMIANAKI, T. *et al.* *Aspergillus* Cell Wall Melanin Blocks LC3-Associated Phagocytosis to Promote Pathogenicity. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 79–90, 2016.
- ALANIO, A. Dormancy in *Cryptococcus neoformans*: 60 years of accumulating evidence. [S. l.]: **American Society for Clinical Investigation**, 2020.
- ALVES SOARES, E. *et al.* Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012 A descriptive epidemiological study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 7, 2019.
- ANDRIANAKI, A. M. *et al.* Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2018.
- BAHN, Y. S. *et al.* Microbe profile: *Cryptococcus neoformans* species complex. **Microbiology (United Kingdom)**, [s. l.], v. 166, n. 9, p. 797–799, 2020.
- BERMAS, A; GEDDES-MCALISTER, J. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. [S. l.]: **Blackwell Publishing Ltd**, 2020.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ARTICULAÇÃO ESTRATÉGICA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **MINISTÉRIO DA SAÚDE GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE 5ª edição**. 5 edição. [S. l.: s. n.], 2022. *E-book*. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed.pdf.
- BROTHERS, K. M. *et al.* NADPH Oxidase-Driven Phagocyte Recruitment Controls *Candida albicans* Filamentous Growth and Prevents Mortality. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 10, 2013.
- CAMPUZANO, A.; WORMLEY, F. L. Innate immunity against *Cryptococcus*, from recognition to elimination. [S. l.]: **MDPI AG**, 2018.
- CAO, C. *et al.* A mechanosensitive channel governs lipid flippase-mediated echinocandin resistance in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, [s. l.], v. 10, n. 6, 2019.
- CASADEVALL, A. *et al.* The capsule of *Cryptococcus neoformans*. [S. l.]: **Taylor and Francis Inc.**, 2019.
- CASADEVALL, A.; COELHO, C.; ALANIO, A. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-mediated host damage. [S. l.]: **Frontiers Media S.A.**, 2018.
- CHAMILOS, G. *et al.* Melanin targets LC3-associated phagocytosis (LAP): A novel pathogenetic mechanism in fungal disease. [S. l.]: **Taylor and Francis Inc.**, 2016.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Em: **Advances in applied microbiology**. [S. l.]: Academic Press Inc., 2014. v. 87, p. 1–41.

DE SOUSA, H. R. *et al.* Cryptococcal Virulence in Humans: Learning From Translational Studies With Clinical Isolates. [S. l.]: **Frontiers Media S.A.**, 2021.

DE SOUSA, H. R. *et al.* Faster *Cryptococcus* Melanization Increases Virulence in Experimental and Human Cryptococcosis. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2022.

DERETIC, V.; LEVINE, B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. [S. l.: s. n.], 2009.

EISENMAN, H. C. *et al.* Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, [s. l.], v. 155, n. 12, p. 3860–3867, 2009.

FIRACATIVE, C.; MEYER, W.; CASTAÑEDA, E. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in latin america: A map of molecular types, genotypic diversity, and antifungal susceptibility as reported by the latin american cryptococcal study group. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2021.

GUSHIKEN, A. C.; SAHARIA, K. K.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. [S. l.]: **W.B. Saunders**, 2021.

HANSAKON, A. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* clinical isolates from Thailand display diverse phenotypic interactions with macrophages. **Virulence**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 26–36, 2019.

HECKMANN, B. L.; GREEN, D. R. LC3-associated phagocytosis at a glance. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 132, n. 5, 2019.

HILLMANN, F. *et al.* Virulence determinants of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* protect against soil amoeba predation. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 2858–2869, 2015.

HUFFNAGLE, G. B. *et al.* Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 155, p. 3507–3516, 1995.

IYER, K. R. *et al.* Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. [S. l.]: **Nature Research**, 2021.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: www.perspectivesinmedicine.org. .

LIU, S. *et al.* Fungal melanin and the Mammalian immune system. [S. l.]: **MDPI AG**, 2021.

MA, J. *et al.* Dectin-1-triggered recruitment of light chain 3 protein to phagosomes facilitates major histocompatibility complex class II presentation of fungal-derived antigens. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 287, n. 41, p. 34149–34156, 2012.

MARTINEZ, J. *et al.* Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 893–906, 2015.

MAY, R. C. *et al.* *Cryptococcus*: From environmental saprophyte to global pathogen. [S. l.]: **Nature Publishing Group**, 2016.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. [S. l.]: **W.B. Saunders**, 2016.

MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 2012–2019, 2005.

MIZUSHIMA, N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. [S. l.]: **Nature Publishing Group**, 2018.

MUKAREMERA, L.; NIELSEN, K. Adaptive immunity to *Cryptococcus neoformans* infections. [S. l.]: **MDPI AG**, 2017.

NELSON, B. N. *et al.* Antifungal activity of dendritic cell lysosomal proteins against *Cryptococcus neoformans*. **Scientific reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 13619, 2021.

NICOLA, A. M. *et al.* Macrophage autophagy in immunity to *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 80, n. 9, p. 3065–3076, 2012.

NOSANCHUK, J. D; CASADEVALL, A. Cellular Charge of *Cryptococcus neoformans*: Contributions from the Capsular Polysaccharide, Melanin, and Monoclonal Antibody Binding **infection and immunity**. [S. l.: s. n.], 1997.

PARK, Y. D. *et al.* Role of the ESCRT pathway in laccase trafficking and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 88, n. 7, 2020.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: A reality check. [S. l.]: **Nature Publishing Group**, 2017.

RAJASINGHAM, R. *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017.

RAJASINGHAM, R. *et al.* The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], 2022.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309922004996>.

RATHORE, S. S. *et al.* A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. [S. l.]: **Academic Press**, 2022.

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117>.

ROHATGI, S.; PIROFSKI, L. A. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. [S. l.]: **Future Medicine Ltd.**, 2015.

ROMERO-MARTINEZ, R. *et al.* Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and immunity**. [S. l.: s. n.], 2000.

SABIITI, W. *et al.* Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 124, n. 5, p. 2000–2008, 2014.

SALAS, S D *et al.* Effect of the Laccase Gene, CNLAC1, on Virulence of **Cryptococcus neoformans**. [S. l.: s. n.], 1996.

SMITH, D. F.Q.; CASADEVALL, A. The role of melanin in fungal pathogenesis for animal hosts. *Em: current topics in microbiology and immunology*. [S. l.]: Springer Verlag, 2019. v. 422, p. 1–30.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: Historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 47–60, 2014.

TAM, J. M. *et al.* Dectin-1-dependent LC3 recruitment to phagosomes enhances fungicidal activity in macrophages. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 210, n. 11, p. 1844–1854, 2014.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 46, n. 11, p. 3394–3400, 2002.

WANG, Y. *et al.* Macrophage Mediated Immunomodulation During *Cryptococcus* Pulmonary Infection. [S. l.]: **Frontiers Media S.A.**, 2022.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* Melanin and Virulence: Mechanism of Action. **Infection and immunity**. [S. l.: s. n.], 1995.

WOZNIAK, K. L. Interactions of *Cryptococcus* with dendritic cells. [S. l.]: **MDPI AG**, 2018.

WU, M. Y.; LU, J. H. Autophagy and macrophage functions: Inflammatory response and phagocytosis. [S. l.]: **MDPI**, 2020.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. [S. l.]: **Taylor and Francis Inc.**, 2019.

ZAVALA, S.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 69–79, 2020.

ZHAO, Y.; LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Sex, morphogenesis, and virulence. [S. l.]: Elsevier B.V., 2021.