



Universidade de Brasília

Programa de pós-graduação em Biologia Molecular

Análise da Infecção Criptocócica Latente e da Reativação de
Células Dormentes de *Cryptococcus neoformans* Associada ao
Metabolismo Celular de Macrófagos

Tese de Doutorado em Biologia Molecular

Aluna: Clara Luna Freitas Marina

Orientadora: Dra. Anamelia Lorenzetti Bocca

Coorientadora estrangeira: Dra. Carolina Coelho

Brasília

27 de fevereiro de 2023

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
Capítulo 1 – Reativação de <i>Cryptococcus neoformans</i> dormente em modelo murino in vitro e in vivo.....	13
1.1 Introdução	13
- <i>Cryptococcus neoformans</i>	13
- Imunidade antifúngica.....	15
- Estratégias de virulência	20
- Dormência	24
1.2 Justificativa	27
1.3 Objetivos.....	28
1.3.1 Geral:	28
1.3.2 Específicos:	28
1.4 Metodologia:.....	29
1.4.1 Cultivo fúngico:	29
1.4.2 Indução de dormência em <i>C. neoformans</i>	29
1.4.3 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos.....	30
1.4.4 Obtenção de Vesículas Extracelulares de Macrófagos e ensaio de reativação.....	31
1.4.5 Infecção de Macrófagos com células dormentes de <i>C. neoformans</i>	32
1.4.6 Infecção de <i>Acanthamoeba castellanii</i> com células dormentes de <i>C. neoformans</i>	32
1.3.7. Quantificação de Óxido Nítrico	33
1.3.12. Indução de Imunossupressão utilizando dexametasona	35
1.3.13. Infecção dos camundongos	35
1.3.14. Análise estatística.....	36
1.4. Resultados	37
1.4.1 Macrófagos promovem a reativação de células dormentes de <i>C. neoformans</i> por meio da produção de vesículas extracelulares.....	37
1.4.2 <i>C. neoformans</i> não é reativado ao infectar camundongos imunocompetentes.....	44
1.4.3 <i>C. neoformans</i> reativa durante disseminação para o sistema nervoso central em camundongos imunodeficientes	48
1.5. Discussão	53
Capítulo 2 - Metabolismo celular e mitocondrial de macrófagos infectados <i>Cryptococcus neoformans</i> dormente.....	60
2.1 Introdução	60
2.2 Objetivos.....	68
2.2.1 Geral:	68
2.2.2 Específicos:.....	68
2.3 Metodologia	69
2.3.1 Cultivo fúngico:	69
2.3.2 Infecção dos macrófagos.....	69
2.3.3. Análises por citometria de fluxo	69
2.3.4. Análises de oximetria em equipamento Oroboros	70

2.3.5.	Análises de oximetria em equipamento Seahorse	71
2.3.6.	Análise da expressão gênica	73
2.4.	Resultados	75
2.4.1.	<i>C. neoformans</i> dormente não causa despolarização mitocondrial em macrófagos derivados de medula nem altera a produção de espécies reativas de oxigênio ou a quantificação mitocondrial celular 75	
2.4.2.	<i>C. neoformans</i> dormente não altera significativamente o metabolismo mitocondrial de macrófagos infectados.....	77
2.4.3.	<i>C. neoformans</i> dormente altera o metabolismo de ácidos graxos de macrófagos infectados 84	
2.3.	Discussão	90
3.	<i>Considerações Finais</i>.....	96
4.	<i>Produção acadêmica</i>.....	97
5.	<i>Referências Bibliográficas</i>.....	98

AGRADECIMENTOS

- ◇ A minha mãe Márcia Freitas e ao meu irmão Tiago Freitas que sempre apoiaram minhas escolhas e acreditaram no meu potencial, me incentivando e proporcionando todos os recursos afetivos e financeiros necessários para minha formação como pessoa e profissional;
- ◇ Às minhas avós materna Grasiela Freitas e paterna Elvira Revuelta que sempre estiveram presentes na minha vida e foram exemplos de mulher e de pessoa almejados por mim durante toda minha trajetória, deixando saudades eternas;
- ◇ Aos meus tios e primos que sempre me apoiaram em todos os sentidos, se interessando por minha trajetória acadêmica além de compartilharem momentos de alegria e felicidade;
- ◇ Ao meu companheiro Pedro Bürgel que sempre foi acima de tudo um grande amigo e com quem eu escolhi viver a vida. Me apoia em todos os momentos tanto pessoais quanto profissionais e aguenta minhas chatices diárias;
- ◇ Aos meus amigos e amigas de toda a vida, que sempre estão lá quando eu preciso tanto nos momentos de festa, quanto nos momentos difíceis;
- ◇ A minha orientadora Anamelia Bocca, que há sete anos me recebeu no laboratório e acreditou em meu potencial, sempre fornecendo todos os recursos necessários para o desenvolvimento dos projetos e promovendo discussões científicas relevantes para meu crescimento como pesquisadora. Além disso, sempre que necessário, esteve disposta a apresentar suporte emocional a mim e a todo o grupo;
- ◇ À minha coorientadora Carolina Coelho, que me recebeu de braços abertos em seu recém grupo de pesquisa na Universidade de Exeter – UK, fornecendo materiais e acesso a equipamentos de ponta essenciais para o desenvolvimento dessa tese;

- ◇ Aos meus companheiros atuais do Laboratório de Imunologia Aplicada: Pedro Bürgel, Luisa Coutinho, Luisa Dan, Thais Bergmann, Tatiana Herman e Filipe Timboni; e aos que já seguiram outros caminhos na vida: Raffael Castro, Lucas las Casas, Stephan Machado, Paulo Henrique, Karina Simon, por sempre estarem dispostos a ajudar em experimentos, discutir resultados ou fofocar na mesa de um bar;
- ◇ Às minhas companheiras de intercâmbio: Alessandra Dantas, Glaucia Sayuri e Jenny Schulze por terem me recebido e feito me sentir em casa em terras britânicas;
- ◇ Às professoras Andreza de Bem e Paula Bellozi do Laboratório de Bioenergética e Metabolismo – UnB, por me receberem e proporcionarem a realização de experimentos importantes para esse trabalho além de ajudarem na discussão e interpretação dos resultados apresentados.
- ◇ Às professoras do Laboratório de Imunologia Aplicada Larissa Matos e Márcia Maciel por prestarem auxílio quando necessário e promover importantes discussões científicas;
- ◇ Aos professores Milton de Oliveira e João Santana pelo fornecimento de camundongos geneticamente modificados essenciais para o desenvolvimento desta tese.
- ◇ Aos professores Ildinete Pereira, Milton de Oliveira, Pedro Vieira e Juliana Lott por aceitarem participar da banca de avaliação deste trabalho;
- ◇ À Capes, CNPq e FAP-DF pelo apoio financeiro.

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação esquemática da evolução fenotípica e morfológica de *C. neoformans* durante progressivo cultivo sob estresse nutricional e anaerobiose

Figura 2. *C. neoformans* dormente é reativado após ser fagocitado por macrófagos com perfil antiinflamatório

Figura 3. Macrófagos promovem a reativação de células dormentes de *C. neoformans* por meio da produção de vesículas extracelulares

Figura 4. *C. neoformans* dormente induz uma maior produção de quimiocinas por macrófagos infectados

Figura 5. *C. neoformans* não é reativado ao infectar camundongos imunocompetentes

Figura 6. *C. neoformans* induz diferentes respostas inflamatórias nos pulmões de camundongos infectados dependendo de seu estado metabólico inicial após 7 dias de infecção.

Figura 7. Após 14 dias de infecção com *C. neoformans*, há uma redução na produção de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões e cérebros.

Figura 8. Tratamento com Dexametasona gera imunossupressão em camundongos tratados por 17 dias.

Figura 9. *C. neoformans* reativa durante migração para SNC em camundongos deficientes para IFN- γ .

Figura 10. *C. neoformans* reativa durante migração para SNC em camundongos imunossuprimidos.

Figura 11. Infecção com *C. neoformans* não gerou alterações histopatológicas significativas nos pulmões e cérebros dependendo do estado metabólico do fungo.

Figura 12. Fisiologia da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial

Figura 13. Análise de ontologia gênica para identificação de processos biológicos de genes diferencialmente expressos no macrófago desafiado com *C. neoformans*

Figura 14. Cálculo para determinação dos valores de Dependência ou Capacidade de utilização de glutamina pela célula analisada

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para quantificação da expressão gênica por RT-qPCR dos macrófagos infectados com *C. neoformans* por 24h

Figura 15. *C. neoformans* dormente não causa despolarização mitocondrial em macrófagos infectados.

Figura 16. *C. neoformans* dormente não altera significativamente o perfil respiratório de macrófagos infectados.

Figura 17. *C. neoformans* dormente não altera significativamente o perfil respiratório de macrófagos infectados.

Figura 18. *C. neoformans* em crescimento estacionário altera padrões respiratórios de macrófagos infectados, enquanto dormente não os altera significativamente.

Figura 19. *C. neoformans* altera a dependência e a capacidade de utilização de fontes de energia pelos macrófagos infectados.

Figura 20. *C. neoformans* estacionário modula negativamente a captação de glicose de macrófagos pré-ativados e dormente induz aumento na captação de ácidos graxos.

Figura 21. *C. neoformans* dormente não estimula significativamente a expressão de genes relacionados ao metabolismo celular de macrófagos infectados.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
2NBDG	adicionado 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2 Deoxyglucose
ADP	Adenosina Difosfato
Ag	Aminoguanidina
ALR	Receptor do tipo AIM2
AIM2	Ausente no Melanoma
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASC	Proteína do tipo SPECK associada a apoptose que contém CARD
ATP	Adenosina Trifosfato
BAL	Lavado bronquioalveolar
BMDM	Macrófago Derivado de Medula Óssea
cDNA	DNA Cíclico
CCL	Quimiocina ligante
CCR	Receptor de quimiocina
CLR	Receptores de Tipo Lecitina
CFU	Unidades Formadoras de Colônias
CAC	Ciclo do Ácido Cítrico
CCCP	Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona
CoA	Coenzima A
CoQ	Ubiquinona
Cyt c	Citocromo C
DAMP	Padrão Molecular Associados a Dano
DCn	<i>C. neoformans</i> dormente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dpi	Dias pós infecção

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de Ligação Imunoenzimático
EV	Vesícula Extracelular
FADH	Dinucleótido Flavina Adenina
GalXM	Galactoxilomanana
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GXM	Glucoronoxilomanana
h	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HK	Fungo morto por calor
HK + Stat	HK + 1% Stat
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
kDa	Kilodalton
LCCM	Meio Condicionado Célula L
LPS	Lipopolissacarídeos de bactérias gram negativas
MFI	Mediana da intensidade de fluorescência
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
miRNA	MicroRNA
mM	milimolar
mL	Mililitros
MM	Meio Mínimo
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NK	Células Natural Killers
NLR	Receptor de Tipo NOD
NLRP	Receptor do Tipo NOD que contém Pirina

ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
NOD	Domínio de Oligomerização de Nucleotídeos
OCR	Consumo de O ₂ relativo
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PRR	Receptor de Reconhecimento Padrão
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Reativos de Oxigênio
RPM	Rotações por Minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
Stat	Fungo em crescimento estacionário
TCR	Receptor de Antígeno Da Célula T
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
Th	Linfócito T Auxiliar
TLR	Receptor do Tipo <i>toll</i>
TMRM	Tetramethylrhodamine-methyl-ester-perchlorate
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TWEEN	Polietileno Glicol Monoestearato de Sorbitano
UCP	Proteína Desacopladora
VBNC	Células viáveis, mas não cultiváveis
WT	Selvagem
xg	Força Centrífuga Relativa
YPD	Meio de cultivo Levedura Peptona Dextrose
OMS	Organização Mundial da Saúde

RESUMO

A capacidade de se manter dormente ou em estado latente é uma adaptação observada em diversas células e organismos, na qual as células reduzem seu metabolismo, transcrição e tradução, para se manterem vivas em condições não ideais para seu crescimento. Assim, elas retomam o crescimento ativo quando o ambiente volta às condições favoráveis. Tal adaptação também é observada em leveduras de *Cryptococcus neoformans*, fungo causador da meningite criptocócica em pacientes imunocomprometidos. Nesse trabalho analisamos os mecanismos envolvidos na reativação de *C. neoformans* durante infecção *in vitro* e *in vivo* e as alterações metabólicas induzidas por esse fungo nos macrófagos infectados. Para isso, infectamos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), pré-tratados ou não com LPS e IFN- γ com o nosso modelo de *C. neoformans* dormente (DCn), *C. neoformans* em crescimento estacionário (Stat) e mortos por calor (HK) + 1% Stat e analisamos a capacidade do DCn de reativar nessas condições e também a influência de vesículas extracelulares (EV) produzidas pelos BMDM. Para análise do metabolismo celular, analisamos a massa mitocondrial, despolarização da membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), captura de glicose e ácidos graxos por citometria de fluxo. Além disso, analisamos o perfil respiratório das células infectadas por oximetria e empregamos RT-qPCR para quantificação da expressão de genes importantes no metabolismo celular. Para análise da reativação em um contexto *in vivo*, infectamos camundongos com fenótipo selvagem (WT) ou “Knockout” (KO) para expressão de IFN- γ ou óxido nítrico (NO), com DCn e seus respectivos controles. Observamos então, que a fagocitose é importante para estimular a reativação de DCn, apesar de não ser necessária, já que o contato com compostos extracelulares liberados pelos macrófagos é suficiente para induzir tal reativação e que esse processo é inibido na presença de LPS e IFN- γ . Observamos também que o DCn só reativou em camundongos imunossuprimidos com dexametasona (C57BL/6) deficientes na produção de IFN- γ ou em camundongos imunodeficientes na produção de linfócitos T (Balb/c nude), em que o fungo manteve sua virulência e migrou para o Sistema Nervoso Central (SNC), onde retomou sua proliferação, confirmando a importância da resposta imune adaptativa em conter essa infecção fúngica. Em relação aos aspectos metabólicos analisados, observamos que todos os fungos induziram acidificação extracelular, indicando aumento na realização de glicólise pelos macrófagos, ao mesmo tempo em que o Stat previne o aumento da captação de 2NBDG induzida pelo tratamento com LPS e IFN- γ , possivelmente representando uma estratégia ativa de evitar a ativação pró-inflamatória. Curiosamente, o DCn induz uma maior captura de ácidos graxos por macrófagos pré-tratados com LPS e IFN- γ , apesar de reduzir a dependência dos macrófagos utilizarem essa fonte de energia. Por fim, DCn modulou a expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose e ácidos graxos, apesar de em menor grau do que o Stat. Esses dados demonstram a preferência do DCn pela utilização de lipídeos como fonte de energia e a capacidade de modular o metabolismo do macrófago hospedeiro a seu favor, induzindo o metabolismo glicolítico nos macrófagos.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, dormência, metabolismo, macrófago, reativação.

ABSTRACT

The ability to remain dormant or in a latent state is an adaptation observed in several cells and organisms, in which cells reduce their metabolism, transcription and translation, to remain alive in conditions that are not ideal for their growth. Thus, they resume active growth when the environment returns to favorable conditions. Such adaptation is also observed in *Cryptococcus neoformans* yeasts, fungus that causes cryptococcal meningitis in immunocompromised patients. In this work we analyzed the mechanisms involved in the reactivation of *C. neoformans* during *in vitro* and *in vivo* infection and the metabolic changes induced by this fungus in infected macrophages. For this, we infected bone marrow-derived macrophages (BMDM), pre-treated or not with LPS and IFN- γ with our model of dormant *C. neoformans* (DCn), *C. neoformans* in active growth (Stat) and heat-killed (HK) + 1% Stat and analyzed the ability of DCn to reactivate under these conditions; and also the influence of extracellular vesicles (EV) produced by BMDM. For analysis of cellular metabolism, we analyzed mitochondrial mass, mitochondrial membrane depolarization, production of reactive oxygen species (ROS), indirect glucose and fatty acid capture by flow cytometry. Furthermore, we analyzed the respiratory profile of infected cells by oximetry and used RT-qPCR to quantify the expression of important genes in cellular metabolism. For analysis of reactivation in an *in vivo* context, we infected wild-type (WT) or “Knockout” (KO) mice for IFN- γ or nitric oxide (NO) expression, with DCn and their respective controls. We then observed that phagocytosis is important to stimulate DCn reactivation, although it is not necessary, since contact with extracellular compounds released by macrophages is enough to induce such reactivation and that this process is inhibited in the presence of LPS and IFN- γ . We also observed that DCn only reactivated in mice immunosuppressed with dexamethasone (C57BL/6) deficient in the production of IFN- γ or in mice immunodeficient in the production of T lymphocytes (Balb/c nude), in which the fungus maintained its virulence and migrated to the Central Nervous System (CNS), where it resumed its proliferation, confirming the importance of the adaptive immune response in containing this fungal infection. Regarding the analyzed metabolic aspects, we observed that all fungi induced extracellular acidification, indicating an increase in the performance of glycolysis by macrophages, while Stat prevents the increase of 2NBDG uptake induced by treatment with LPS and IFN- γ , possibly representing an active strategy to avoid pro-inflammatory activation. Interestingly, DCn induced a greater uptake of fatty acids by macrophages pretreated with LPS and IFN- γ , despite reducing the dependency of macrophages on this energy source. Finally, DCn enhanced the expression of genes related to glucose and fatty acid metabolism, although to a lesser extent than Stat. These data demonstrate DCn's preference for the use of lipids as an energy source and the ability to modulate host macrophage metabolism in its favor, inducing glycolytic metabolism in macrophages.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, dormancy, metabolism, macrophage, reactivation

Capítulo 1 – Reativação de *Cryptococcus neoformans* dormente em modelo murino *in vitro* e *in vivo*

1.1 Introdução

- *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans é um fungo ambiental amplamente difundido nos diversos ecossistemas terrestres, sendo facilmente encontrado em cascas de árvores e fezes de animais, principalmente aves, com os quais mantêm uma estreita relação ecológica e evolutiva (Nielsen, K. *et al*, 2007). Apesar de estar bem adaptado à forma de vida livre, este micro-organismo é um patógeno intracelular facultativo, capaz de infectar eficientemente células animais, proliferando-se e difundindo-se para diversos órgãos (Feldmesser, M. *et al*, 2000). Por possuir preferência pelo Sistema Nervoso Central (SNC), esse patógeno utiliza diversas estratégias de virulência para chegar ao cérebro, podendo causar meningite criptocócica, principalmente em um contexto de imunossupressão (Esher, S. *et al*, 2018), como é o caso de pacientes acometidos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Bekondi, C. *et al*, 2006).

Dentre os pacientes que apresentaram diagnóstico positivo para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), a criptococose é a infecção fúngica mais prevalente e responsável por 19% das mortes destes pacientes em um contexto global, com aproximadamente 112.000 mortes anuais. Essa doença representa um problema de saúde pública principalmente na África Subsaariana, onde ocorre cerca de 75% das mortes por meningite criptocócica (Rajasingham, R. *et al*, 2022). Apesar disso, a criptococose é uma doença negligenciada, recebendo menos de 0,5% dos recursos destinados para a pesquisa científica (Rodrigues, *et al*, 2016) e nem mesmo consta na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS). Somente recentemente (2022), a OMS publicou um documento listando os principais patógenos fúngicos que apresentam riscos para a humanidade, na qual o *C. neoformans* consta como prioridade máxima, acompanhado por *Candida auris*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Considerados fungos invasivos e oportunistas, tais espécies afetam principalmente pacientes imunodeficientes, como é o caso de pacientes com AIDS, com

doença pulmonar crônica, com câncer ou diabetes mellitus, além de pacientes internados em unidades intensivas ou em tratamento para transplante de órgãos. Considerando que tais populações de risco vêm aumentando progressivamente, as infecções fúngicas oportunistas também se tornam um problema cada vez mais grave e necessário de atenção (OMS, 2022).

Cryptococcus é um gênero da classe Basidiomiceto que inclui mais de 70 espécies, pertencente ao filo Basidiomycota, (Kwon-Chung, K.J. *et al*, 2011). O ciclo de vida dos basidiomicetos alterna entre fases haploides e diploides, em que a fase haploide é composta por leveduras a e α que podem se fundir, formando uma célula diploide a/α (hifa), que pode realizar meiose, formando os basidiósporos, que ao germinarem formam novas hifas. No caso do *C. neoformans*, a fase leveduriforme é sua fase dominante, podendo, entretanto, mudar para o crescimento filamentosos em casos de estresse nutricional (Shapiro, R. *et al*, 2011). A estrutura leveduriforme é favorável a esse micro-organismo, permitindo a reprodução por brotamento e a sobrevivência em substratos líquidos, ricos em nutrientes solúveis e no interior de células animais e vegetais, apesar de aparentemente não ser patogênico para células vegetais, usando-os apenas como reservatório temporário (Dornelas, J. *et al*, 2022).

Dentre as espécies de *Cryptococcus*, as potencialmente causadoras da criptococose pertencem às espécies *C. neoformans* e *C. gatti*. Recentemente observou-se diferenças fenotípicas antigênicas consideráveis dentro do grupo do *C. neoformans*, justificando análises moleculares e genéticas que chegaram a divisões mais específicas dentro desses grupos. *C. neoformans* foi dividido em variação grubii (*C. neoformans*) e variação *neoformans* (*C. deneoformans*), em que o grupo *C. neoformans* contém o sorotipo A (genótipo VNI, VNII e VNB), o grupo *C. deneoformans* contém o sorotipo D (genótipo VNIV) e o grupo *C. gatti* contém as espécies *C. gatti*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii*, e *C. decagattii* (sorotipos B e C; genótipos VGI-IV) (Hagen, F. *et al*, 2015; Kwon-Chung, K. *et al*, 2017).

É importante ressaltar que existem algumas diferenças cruciais entre *C. gatti* e *C. neoformans* quanto às estratégias de virulência, vias de infecção e epidemiologia. O *C. neoformans*, principalmente encontrado na África subsaariana, é o maior responsável por

mortes em pacientes HIV+, infectando principalmente pacientes imunossuprimidos, o que o caracteriza como um patógeno oportunista. Já o *C. gatii*, é um fungo endêmico do norte australiano que acomete principalmente a população aborígine, apesar de também ser encontrado em outras regiões do planeta (Ngamskulrunroj, P. *et al*, 2012). É considerado um patógeno primário, já que também infecta pacientes imunocompetentes. Além disso, *C. gatii* tem como preferência a infecção pulmonar, causando sérias pneumonias, enquanto somente 35% dos casos de criptococose por *C. neoformans* geram um quadro de infecção pulmonar (Ngamskulrunroj, P. *et al*, 2012). O pior desfecho em infecções por *C. neoformans* é a meningite criptocócica, já que este fungo apresenta tropismo pelo SNC e muitas vezes só é diagnosticado quando já atingiu essa região, dificultando o tratamento (Esher, S. *et al*, 2018). Um dos motivos usados para explicar tais diferenças decorre da resposta imune contra as duas espécies, já que *C. gatii* induz uma imunossupressão significativamente maior no pulmão infectado do que *C. neoformans*, favorecendo sua proliferação (Cheng, P. Y. *et al*, 2009).

- Imunidade antifúngica

A infecção se inicia com a inalação de esporos ou leveduras de *Cryptococcus* presentes no meio ambiente, que eficientemente ultrapassam as barreiras de proteção nasais e se instalam nos alvéolos pulmonares (Nielsen, K. *et al*, 2007). Na maioria das vezes a infecção é assintomática ou se confunde com os sintomas de uma infecção pulmonar viral, sendo facilmente eliminada, no caso de pacientes imunocompetentes (Littman, M. 1959). Já foi mostrado inclusive que 70% das crianças maiores de 5 anos apresentam reatividade sorológica a vários antígenos criptocócicos, evidenciando a prévia exposição dessas crianças ao fungo, sem que tenham sido diagnosticadas com a doença anteriormente (Goldman, D. *et al*, 2001). Como esperado, tal reatividade também é observada em adultos de forma ubíqua, independentemente da manifestação ou não de criptococose (Deshaw, M. *et al*, 1995). Acredita-se que a maioria dos casos de criptococose é desencadeada a partir da reativação de uma infecção latente, que estava controlada até uma eventual fragilidade do sistema imune (Garcia-Hermoso, D. 1999; Brunet, K. *et al*, 2018). Outra evidência para isso é que muitas vezes o antígeno

encontrado no paciente infectado é geneticamente diferente das cepas de *C. neoformans* endêmicas do local de sua residência (Beale, M. A. *et al*, 2015).

Após a instalação das leveduras nos alvéolos pulmonares, rapidamente há o reconhecimento por macrófagos alveolares residentes e subsequente internalização fúngica nas primeiras horas após a infecção (Feldmesser, M. *et al*, 2000). Macrófagos são os principais representantes da resposta imune inata: são células mononucleadas responsáveis pela fagocitose e degradação de moléculas e micro-organismos estranhos ao hospedeiro, além de liberação de diversos fatores que induzem a quimiotaxia de outras células do sistema imune inato e adaptativo para auxiliar no controle da infecção. Para tal, eles apresentam diversos receptores responsáveis pelo reconhecimento de Padrões Associados a Patógenos (PAMPs), ou seja, moléculas comuns entre micro-organismos patogênicos. No caso dos fungos, os principais PAMPs são moléculas encontradas na parede celular, como β -glucana, quitina e mananas. Tais receptores, chamados Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRR) são classificados quanto ao tipo de molécula reconhecida e localização celular. Dentre eles, os principais relacionados ao reconhecimento fúngico são os receptores de lectina do tipo C (CLR) e os receptores do tipo Toll (TLR), localizados na membrana plasmática e endossomos das células imunes inatas. Além disso, essas células também apresentam receptores citoplasmáticos que reconhecem moléculas fúngicas no meio intracelular, que são representados pelos receptores do tipo NOD (NLR) e do tipo AIM2 (ALR) (Schroder, K and Tschopp, J. 2010; Tavares, A. *et al*, 2015).

Os receptores de membrana têm como principal função a internalização fúngica e degradação das partículas no fagolisossomo por meio da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e de Nitrogênio (RNS). Concomitantemente, os receptores ativam fatores de transcrição como o Fator Nuclear kappa B (NF- κ B), que leva a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), interleucina (IL)-6 e das formas inativas de IL-1 β e IL-18 (Takeuchi, O. *et al*, 2010). Essas citocinas precisam de um segundo sinal induzindo a sua ativação, de modo a evitar respostas inflamatórias exacerbadas e inespecíficas, função desempenhada pelos receptores intracelulares. Então, posteriormente, há o reconhecimento de fatores como alta concentração de ROS e catepsina B e baixos níveis de K⁺ pelos receptores

citoplasmáticos, que se agregam em complexos multiproteicos denominados inflamassomas. O *C. neoformans* ativa principalmente o inflamassoma NLR que contém Pirina (NLRP3), o qual é formado por um receptor NLR associado a uma proteína adaptadora do tipo SPECK associada a apoptose que contém CARD (ASC) e a uma pró-caspase-1 ou pró-caspase-8 que são auto-clivadas e ativadas quando o NLR reconhece o sinal. As caspases ativas estariam aptas, então, para clivar as formas inativas das interleucinas, formando IL-1 β e IL-18 ativas (Chen, M *et al*, 2015) além de ativar vias de piroptose, auxiliando na eliminação das leveduras intracelulares (Bergsbaken, T. *et al*, 2009).

Após iniciada a resposta inata pelos fagócitos residentes, há um intenso recrutamento de monócitos e células dendríticas expressando Receptor de Quimiocina 2 (CCR2), que têm função de auxiliar no combate à infecção e na captura de antígenos (Osterholzer, J. *et al*, 2008). As células dendríticas contendo o antígeno migram para os órgãos linfoides secundários e, nas áreas ricas em linfócitos T, estimulam a maturação e diferenciação de linfócitos T virgens expressando CD4 em sua superfície para um perfil T auxiliar (Th) ou de linfócitos T expressando CD8 em sua superfície para um perfil citotóxico. Para que essa diferenciação ocorra, são necessários que ocorram concomitantemente três estímulos diferentes: apresentação do antígeno via Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I para linfócitos CD8⁺ ou II para linfócitos CD4⁺ na célula dendrítica, que se liga ao Receptor de Antígeno da Célula T (TCR); expressão de moléculas co-estimulatórias como CD40 pelas células dendríticas e reconhecimento pelos CD40 ligante dos linfócitos T; e produção de citocinas (Kambayashi, T. e Laufer, T. 2014).

As citocinas secretadas são determinantes para a diferenciação de linfócitos Th1 ou Th2, que se diferenciam quanto ao padrão de citocinas produzido e mecanismo de ação. As citocinas IL-12, Interferon (IFN)- γ e IL-18 estimulam a diferenciação de linfócitos Th1, com características pró-inflamatórias, produtores de IFN- γ e IL-2. Em contraste, a secreção de IL-4 e IL-13 pelas células dendríticas estimula preferencialmente a diferenciação de linfócitos Th2, produtores de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, citocinas com características mais reparadoras (Kambayashi, T. e Laufer, T. 2014; Mukaremera, L. *et al*, 2017). Linfócitos T CD4 também podem ser ativados para um perfil Th17, relacionado

a respostas pró-inflamatórias a micro-organismos extracelulares, podendo causar também respostas autoimunes. Essa resposta é iniciada com o estímulo das citocinas TGF- β , IL-6, IL-21, que geram linfócitos produtores de IL-17 e IL-22 (Gugliani L. *et al*, 2010)

A importância dos linfócitos T CD4⁺ para o combate a criptococose deve ser ressaltada, já que os casos mais graves da doença, com disseminação do fungo para o SNC ocorrem predominantemente em pacientes imunodeficientes, com baixa produção desses linfócitos (Rajasingham, R. *et al*, 2022). Além disso, o controle da criptococose geralmente está associado a uma resposta adaptativa do tipo Th1, sendo mais facilmente disseminada quando há predominância da resposta Th2. Entretanto, já foi mostrado que *C. neoformans* também ativa linfócitos Th17 tanto em pacientes imunocompetentes quanto imunossuprimidos, principalmente no fluido cerebrospinal (Guo, X. *et al*, 2022). Dessa forma o organismo regula constantemente as respostas Th, sendo essencial para o controle efetivo de infecções e podendo causar quadros alérgicos ou doenças autoimunes quando não é bem regulado (Kambayashi, T. e Laufer, T. 2014; Mukaremera, L. *et al*, 2017). Além disso, as células CD4⁺ são as principais responsáveis pelo controle da infecção no sangue periférico, recebendo auxílio também dos linfócitos T CD8⁺. Ambas realizam exocitose de grânulos contendo granulizina, molécula similar às perforinas, secretadas pelas células Natural Killers (NK). Estas, ao se ligarem à membrana fúngica, reagem com os compostos lipídicos aí presentes levando à formação de poros, o que acaba desencadeando a lise do micro-organismo (Zheng C. *et al*, 2007).

Dessa forma, o IFN- γ é uma das principais citocinas responsáveis pelo processo pró-inflamatório tanto na imunidade inata quanto adaptativa no controle à micro-organismos intracelulares. Foi mostrado que o tratamento com essa citocina aumenta a eficiência de macrófagos em matar leveduras intracelulares (Davis, M. *et al*, 2015). O grupo dos IFNs geralmente estão associados à resposta antiviral, sendo a principal citocina no combate a esse patógeno. Entretanto, o IFN- γ (tipo II) é extremamente importante no controle da criptococose, aumentando o recrutamento de leucócitos para sítio de infecção, incluindo neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Além disso, essa citocina induz uma resposta adaptativa protetora do tipo Th1 em detrimento de uma resposta do tipo Th2, auxiliando na efetiva eliminação fúngica (Chen, G. *et al*, 2005).

Outro mecanismo de ação induzido pelo IFN- γ é a produção de Óxido Nítrico (NO) pelos fagócitos, através da transcrição de Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS ou NOS2) (Lu, L. *et al*, 1996). O NO é essencial em processos inflamatórios, já que é um eficiente vasodilatador e regulador do recrutamento leucocitário, inibindo respostas exacerbadas no caso de inflamações agudas. Também é um bom mecanismo efetor no caso de infecções intracelulares, em que o NO interage com espécies reativas de oxigênio formando compostos antimicrobianos capazes de gerar danos no Ácido Desoxirribonucleico (DNA) ou em lipídios do micro-organismo, levando lise do micro-organismo (Xiomara, M. *et al*, 2006). Sabe-se que essa molécula também é essencial no processo de controle da infecção por *C. neoformans*, pois quando sua produção é inibida observa-se o agravamento da infecção (Lovchik, J. *et al*, 1995). Já foi mostrado também que ela está relacionada à formação de granulomas pulmonares contendo *C. neoformans*, induzido pela expressão das citocinas IFN- γ , Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β), também super-expressas em granulomas (Goldman, D. *et al*, 1996).

Granulomas são estruturas que se formam no pulmão ou cérebro infectados por *C. neoformans* como forma de conter a infecção. São similares aos formados durante quadros de tuberculose, formados por agregados de macrófagos contendo um grande número leveduras em proliferação celular. Estes macrófagos vão se diferenciando em células com características epiteliais, incluindo junções comunicantes que permitem o máximo de contato intercelular. Com o desenvolvimento do granuloma, pode haver o recrutamento de outros leucócitos, como neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T e B (Adams, D. 1976). Entretanto, as características do granuloma podem variar em termos de características, número e processo inflamatório dependendo do quadro infeccioso. Por exemplo: sabe-se que *C. gatti* induz um granuloma do tipo gelatinoso, fluido, enquanto *C. neoformans* estimula predominantemente a formação de um granuloma do tipo fibrótico durante infecção pulmonar. Além disso, observou-se que quando a infecção evolui mais rapidamente (em até oito semanas), forma-se uma massa com característica gelatinosa e com menos inflamação, enquanto quando a infecção é mais duradoura, observa-se a formação dos granulomas fibróticos (Baker e Haugen, 1975). Estes, podem reduzir ou aumentar de tamanho, podendo sofrer calcificação e formar uma cicatriz,

dependendo do tipo de resposta adaptativa envolvida em sua formação (Th1 ou Th2) (Ristowi, L. *et al* 2021). Como podem permanecer estáveis após certo tempo, acredita-se que essas estruturas podem servir como sítios reservatórios para infecções latentes de *Cryptococcus*, onde de fato já foram encontradas leveduras com este fenótipo (Goldman, *et al.* 2000; Alanio, A. *et al.*, 2015).

- Estratégias de virulência

Como visto acima, o orquestramento de uma resposta imune inata e adaptativa é essencial para o controle da infecção por *C. neoformans*, evitando sua disseminação para outros órgãos, principalmente o SNC. Entretanto, ainda assim, esse fungo apresenta diversas estratégias para driblar as defesas e se manter viável no organismo, ainda que muitas vezes em uma infecção latente. A principal característica desta levedura que contribui para sua virulência é a presença de uma espessa cápsula polissacarídica composta por cerca de 90% de glucuronoxilomanana (GXM), 9% galactoxilomanana (GalXM) e menos de 1% de manoproteínas, apesar de que essas proporções e características da cápsula variam entre as espécies de *Cryptococcus* e fases de infecção, que vão sendo alteradas de acordo com a progressão da infecção (Zaragoza, O. *et al.*, 2009).

Já foi demonstrado que *C. neoformans* apresenta um espessamento de sua cápsula algumas horas após a infecção murina, o que também ocorre durante a infecção intracelular *in vitro* (Feldmesser, M. *et al.*, 2001). Tal estratégia é considerada uma adaptação para sobreviver no organismo hospedeiro e, também pode ser induzida *in vitro*, cultivando o fungo em um meio mínimo ou em atmosfera com alta concentração de CO₂, simulando uma situação de estresse nutricional (Littman *et al.*, 1958; Granger *et al.*, 1985). Sabe-se que a estrutura capsular é utilizada pelo fungo para evadir do sistema imune do hospedeiro, já que tal estrutura mascara as glucanas presentes na parede celular fúngica, as quais seriam facilmente reconhecidas pelos receptores de manose e receptores FC gamma II do hospedeiro (Syme, R.M. *et al.*, 2002). Tal fenômeno foi descrito utilizando cepas acapsulares de *C. neoformans*, que se mostraram extremamente imunogênicas, estimulando a produção de IL-1 β via ativação do inflamassoma NLRP3 (Guo, C. *et al.*,

2014). Essa ativação faz com que essas cepas sejam facilmente eliminadas pelo sistema imune do hospedeiro e não consigam progredir com a infecção (Guo, C. *et al*, 2014).

Outra importante alteração estrutural e capsular relacionada à virulência do *C. neoformans* é a diferenciação em células titãs, com aumento significativo do tamanho celular, variando de 10 a 100 micrômetros (μm) de diâmetro além de modificações na estrutura da parede celular e da cápsula (Zaragoza, O. *et al*, 2010). Essas alterações dificultam o reconhecimento pelas células do sistema imune do hospedeiro, além de dificultar a fagocitose por macrófagos alveolares (Okagaki, L. *et al*, 2012). Esses fatores aparentemente estão relacionados com a manutenção de uma infecção latente no organismo (Zaragoza, A. e Nielsen, K. 2013) Ademais, já foi demonstrada a importância dessa adaptação para a evasão criptocócica do pulmão e cruzamento da barreira hematoencefálica, assim como a indução de uma resposta imune não protetora para o hospedeiro (Crabtree, J. *et al*, 2012).

Apesar de cepas encapsuladas de *C. neoformans* não ativarem tanto o inflamassoma quanto cepas acapsulares, sabe-se que elas também ativam as vias canônica por Caspase-1 e não canônica por Caspase-8 do inflamassoma NLRP3 quando opsonizadas e fagocitadas por macrófagos e células dendríticas (Mingquan, C. *et al*, 2015). Em contrapartida, já foi mostrado que, como forma de impedir esse processo natural de defesa contra agentes fúngicos, essa espécie secreta pequenas moléculas capazes de inibir a ativação do inflamassoma NLRP3 e os eventos imunológicos subsequentes. Também foi visto que essas moléculas induzem um aumento da exocitose não lítica de leveduras internalizadas por macrófagos e uma maior sobrevivência do fungo no hospedeiro tanto em um modelo *in vitro* quanto *in vivo* (Bürgel, P. *et al*, 2020).

Apesar de o macrófago ser a primeira linha de defesa ao *C. neoformans*, seu mecanismo não apresenta uma eficiente ação microbicida contra as leveduras, já que estas conseguem sobreviver em seu interior e inclusive proliferar mais eficientemente do que no meio extracelular. Isso ocorre pois após a fagocitose há a formação do fagolisossoma contendo as leveduras intracelulares, onde há uma redução do Potencial Hidrogeniônico (pH), o qual é favorável à sobrevivência deste fungo (Feldmesser, M. *et al*, 2000). Entretanto, para que o pH não seja tão ácido, o fungo induz a permeabilização do

fagolisossomo e acúmulo de vesículas contendo polissacarídeos no citoplasma, gerando um ambiente contínuo, com maior espaço para proliferação (Tucker S. e Casadevall, A. 2002). Além disso, o fungo consegue neutralizar os efeitos deletérios do NO produzido pelos macrófagos sem interferir na expressão de iNOS, sobrevivendo então a esse importante mecanismo de defesa (Kawakami, K. *et al*, 1997; Trajkovic, *et al*, 2000). Por fim, a sobrevivência nos fagócitos também está relacionada a presença da cápsula, já que mutantes acapsulares são facilmente eliminados pelos macrófagos, provavelmente apresentando menor resistência às condições intracelulares (Guo, C. *et al*, 2014).

Essa capacidade de sobreviver no interior dos fagócitos é muito semelhante ao observado em amebas infectadas com *C. neoformans*. Amebas são micro-organismos unicelulares ambientais com características estruturais similares aos macrófagos e predadores naturais de fungos como *C. neoformans*. Acredita-se que estratégias de sobrevivência intracelular tenham sido selecionadas ao longo da evolução em conjunto entre as duas espécies, o que favoreceu a capacidade do fungo de sobreviver também em fagócitos. Essa característica também é observada em outros parasitas intracelulares tanto fúngicos quanto bacterianos, também relacionados a processos de coevolução (Steenbergen, J. *et al*, 2001).

A capacidade de sobreviver nos fagócitos também é utilizada pelo *C. neoformans* como forma de se disseminar para outros órgãos, principalmente o SNC, utilizando o mecanismo chamado “Cavalo de Tróia”. Isso ocorre pois naturalmente há o fluxo de macrófagos pelo organismo pela via venosa, o que também ocorre com macrófagos infectados, que “escondem” leveduras que seriam facilmente detectadas se estivessem livres no sangue ou órgão. Esses macrófagos infectados chegam a outros órgãos, onde algumas leveduras podem sair, gerando outra infecção local. Já foi mostrado que o cruzamento da barreira hematoencefálica é mais eficiente por macrófagos carregando leveduras do que pelo fungo em sua forma livre, levando também a uma infecção mais eficiente do tecido cerebral (Santiago-Tirado, F. *et al*, 2017). Esse processo também ocorre com neutrófilos e células dendríticas, apesar de menos estudados, e em todos os casos é necessário que o fungo esteja viável para que ocorra, mostrando que é uma estratégia ativa deste patógeno (Yang, X. *et al*, 2019; Walsh, N. *et al*, 2019).

O mecanismo descrito acima em que há a saída do fungo do meio intracelular para o meio extracelular sem morte da célula hospedeira nem do fungo é chamado vomocitose ou exocitose não lítica e foi observado pela primeira vez em *C. neoformans* (Seoane, P. e May, R. 2020). Anteriormente já havia sido demonstrada a saída de patógenos do interior de fagócitos causando lise celular, fenômeno que gera sinalização imune exacerbada e consequente atração de outras células para sítio de infecção, o que dificulta a sobrevivência do micro-organismo. Posteriormente, esse mecanismo também foi observado em *Candida krusei* e *Candida albicans*, mostrando ser uma estratégia conservada entre diferentes grupos filogenéticos (Seoane, P. e May, R. 2020). Acreditava-se também que havia transferência lateral de leveduras entre macrófagos adjacentes, o que depois demonstrou-se que o que ocorre é uma extrusão seguida de fagocitose pelo macrófago adjacente (Dragotakes, F. e Casadevall, A. 2019).

A vomocitose já foi observada tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ocorrendo mais frequentemente durante infecção *in vivo* e é influenciada por alterações no pH fagossomal (Nicola, A. *et al*, 2011). Dessa forma, quando há neutralização do pH, há um aumento na extrusão, o que é induzido pela produção de urease fúngica, que também evita a degradação da membrana fagossomal e deve facilitar a disseminação pelo organismo do hospedeiro (Fu, M. *et al*, 2018). A enzima lacase produzida pelo *C. neoformans* também se mostrou importante no processo de vomocitose, já que sua ausência reduz as taxas de exocitose não lítica e esse processo parece ser independente de melanização fúngica, mostrando a diversidade das funções das enzimas fúngicas (Frazão, S *et al*, 2020).

C. neoformans, assim como a maioria das espécies fúngicas, produz uma série de enzimas necessárias para sua sobrevivência no meio ambiente relacionadas à degradação da matéria orgânica, já que são organismos decompositores (Casadevall, A. *et al*, 1998). Dentre elas, muitas estão também relacionadas à virulência fúngica, como é o caso da fosfolipase B, que é responsável pela degradação de fosfolípidos. Apesar de poucas informações sobre o mecanismo de ação dessa enzima para a virulência do *C. neoformans*, sabe-se que o mutante deficiente para essa característica apresenta dificuldade para proliferar no interior de macrófagos, associado também a um aumento significativo no tamanho das leveduras, levando a um fenótipo de célula titã (Evans, R. *et al*, 2015).

Vale ressaltar também a importância da urease, responsável pela hidrólise de uréia em amônia e auxiliar ao fungo no processo de vomocitose (Olszewski M. *et al*, 2004); e das superóxido-dismutases, que favorecem o crescimento fúngico no interior dos macrófagos por meio da proteção ao estresse oxidativo (Cox, G. *et al*, 2003). Outra enzima importante para a virulência do *C. neoformans* é a lacase, que na presença de compostos polifenólicos ou poliaminobenzênicos exógenos, os metaboliza, produzindo melanina como subproduto, que é acumulada na parede celular. A melanização fúngica é importante para proteção contra estresse oxidativo, assim como a altas ou baixas temperaturas (Chaskes, S. *et al*, 1975). Além disso, a lacase oxida FeII em FeIII no fagossomo de macrófagos alveolares, inibindo a resposta antifúngica dessas células e favorecendo a sobrevivência do *C. neoformans* (Liu, L. *et al*, 1999).

Sabe-se também que tais enzimas assim como outras proteínas e polissacarídeos podem ser produzidos e liberados para o meio extracelular no interior de vesículas extracelulares (EV), exossomos que funcionam como “pacotes de virulência” (Rodrigues, M. *et al*, 2008). As características e conteúdo das EVs variam de acordo com as concentrações nutricionais do órgão em que o fungo se encontra, ora ativando a resposta imune, ora inibindo-a. Esse mecanismo parece ser importante para a sobrevivência do fungo no organismo do hospedeiro e migração das leveduras para o SNC (Marina, C. *et al*, 2020; Oliveira, D. *et al*, 2010; Huang, S. *et al*, 2012).

- Dormência

Como já relatado acima, a principal forma de manifestação da criptococose clínica ocorre devido à reativação de uma infecção latente que ocorreu provavelmente durante a infância do indivíduo e que não conseguiu se desenvolver devido à competência do sistema imune (Goldman, D. *et al*, 2001). Entretanto, as leveduras conseguem manter-se viáveis, principalmente no interior de macrófagos em granulomas pulmonares, porém sem proliferação ativa, o que permite que voltem a proliferar quando as condições voltem a ser favoráveis (Alanio, A. *et al*, 2015). Condições favoráveis essas, representadas pelo comprometimento do sistema imune, como a infecção com o HIV ou tratamento imunossupressor (Dromer *et al*, 2011).

Muitas evidências epidemiológicas já demonstravam a capacidade deste fungo em manter uma infecção latente por muitos anos, como o fato de adultos apresentarem cepas endêmicas de localidades muito distantes, visitadas durante a infância (Beale, M. A. *et al*, 2015). Saha e colaboradores testaram a reatividade a proteínas criptocócicas no soro de pacientes transplantados que desenvolveram criptococose algum tempo após o transplante. O soro foi testado antes e após o transplante de órgãos e uma quantidade significativa deles apresentaram reatividade a proteínas do *C. neoformans* mesmo não tendo apresentado sintomas da doença anteriormente (Saha, D. C. *et al* 2007). Além disso, os pacientes que apresentaram reatividade prévia desenvolveram a doença significativamente mais rápido do que os que não tinham anticorpos no soro contra o patógeno. Tal resultado indica que os pacientes que desenvolveram a doença precocemente teriam o fungo alojado no organismo de forma latente, o qual foi reativado quando o paciente começou o tratamento imunossupressor (Saha, D. C. *et al* 2007).

Entretanto, o fenótipo dessas leveduras somente foi descrito há poucos anos, quando foi possível isolá-las a partir de infecções de camundongos *in vivo* (Alanio, A. *et al*, 2015). Para isso, Alanio e colaboradores descreveram uma técnica baseada na coleta de leveduras marcadas com calcofluor recuperadas após infecção de macrófagos J774 por 24h ou camundongos por 7 dias e marcação com CMFDA (5-chloromethyl-fluorescein diacetato), para definição das características celulares. Por meio de citometria de fluxo, eles observaram que após esse tempo de infecção, formavam-se no pulmão e nos macrófagos populações distintas do fungo. Uma delas caracterizou-se por um número maior de células com baixa fluorescência de CMFDA e alta fluorescência de calcofluor, representando pouca proliferação celular. A análise posterior dessas células mostrou características peculiares, como espessamento da cápsula, aumento na quantidade de vesículas intracelulares, redução na atividade mitocondrial e baixo conteúdo de Ácido Ribonucleico (RNA) (Figura 1). Por fim, essas células apesar de estarem viáveis, o que também foi mostrado por citometria de fluxo, eram incapazes de se proliferar, mas restauravam sua capacidade de replicação após cultivo com Soro Fetal Bovino (SFB) (Alanio, A. *et al*, 2015). As características dessa população permitiram caracterizá-las como células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC), fenótipo já descrito para diversos outros micro-organismos.

As características das células apresentadas acima representam uma redução metabólica compatível com um fenótipo dormente apresentado por muitos micro-organismos. Em fungos, esse fenótipo já foi descrito em *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* e *Brettanomyces bruxellensis* cultivados em meio sintético de vinho e induzido com dióxido de enxofre (Alanio, A. 2020). Essa característica é considerada uma adaptação dos micro-organismos para se manterem viáveis quando submetidos a situações de estresse. Assim, reduzem seu metabolismo, replicação e transcrição de material genético ao mesmo tempo em que mantêm o potencial de membrana, que lhes confere proteção e mobilizam vesículas contendo nutrientes necessários para fornecer o mínimo de energia para manter a sua sobrevivência. O estresse responsável pela indução de dormência varia entre espécies, podendo ser nutricional, concentração de O₂, pH, salinidade, temperatura, dessecação ou uma combinação desses fatores (Alanio, A. 2020).

Recentemente foi proposto um protocolo para indução de dormência *in vitro* de *C. neoformans*, permitindo a obtenção de um grande número de células dormentes, já que a obtenção *in vivo* gera uma quantidade muito reduzida de leveduras com esse fenótipo (Hommel *et al.*, 2019). Esse protocolo baseia-se em cultivar o fungo em meio YPD até o estágio de crescimento estacionário, quando já começa a haver limitação nutricional. Posteriormente a cultura é submetida a uma limitação de O₂, sendo mantida em hipóxia por 7 a 8 dias, quando é possível recuperar as células VBNC (Fig. 1). Essas, podem ser reativadas quando cultivadas com 10% de SFB ou ácido pantotênico (Hommel *et al.*, 2019; Castro, R. 2019), molécula envolvida no *quorum sensing* e precursor de acetil-Coenzima A (CoA) (Albuquerque *et al.*, 2013). Quando a hipóxia é mantida por mais de 8 dias, começa-se a observar um grande número de morte celular, com leveduras menores, com degradação da parede celular e a presença de dois vacúolos internos (Fig. 1).

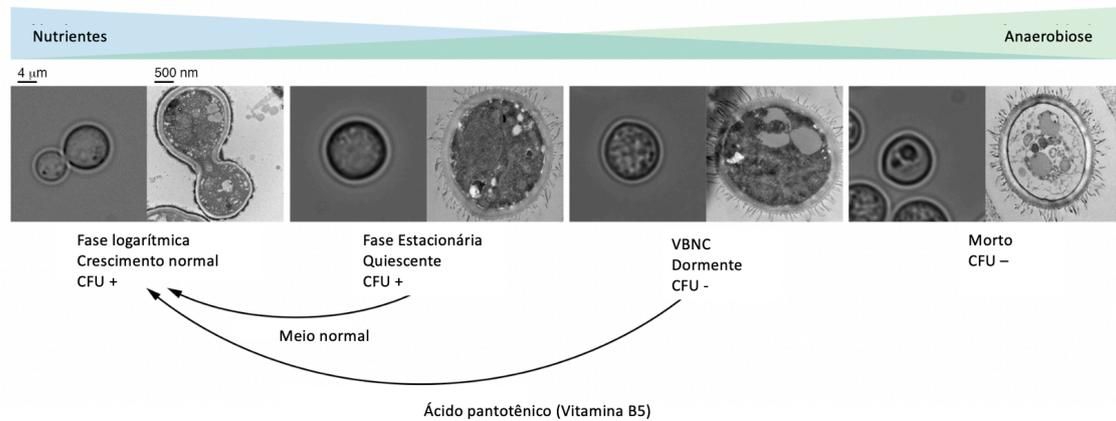


Figura 1. Figura adaptada de Alanio, A. 2020: Representação esquemática da evolução fenotípica e morfológica de *C. neoformans* durante progressivo cultivo sob estresse nutricional e anaerobiose (8 dias).

1.2 Justificativa

Resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa em parceria com o Instituto Pasteur, Paris (Castro, R. 2019) mostraram que a interação e fagocitose seguida de exocitose por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos (BMDM) levam a reativação de leveduras dormentes, aumentando a sua culturabilidade. Tal reativação é inibida quando os macrófagos são classicamente ativados para um perfil M1 com lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas (LPS) e IFN- γ , o que está diretamente relacionado com a maior produção NO pelos macrófagos. Considerando tais resultados, resolvemos abordar neste trabalho como as leveduras dormentes de *C. neoformans* induzidas previamente *in vitro* se comportam em um contexto de infecção *in vivo* e se a produção de IFN- γ e NO também influencia a reativação dessas células nestas condições. Essas análises são importantes pois aprofundam o conhecimento sobre a infecção latente de *C. neoformans* e dos mecanismos envolvidos em sua reativação, já que essa é a causa mais prevalente do desenvolvimento da doença em pacientes que sofrem de imunodeficiência. Além disso, essas descobertas podem servir de arsenal para o desenvolvimento de tratamentos inovadores e eficientes para a criptococose.

1.3 Objetivos

1.3.1 Geral:

- Analisar a reativação de células dormentes de *C. neoformans* em modelos *in vitro* e *in vivo*.

1.3.2 Específicos:

- Analisar os mecanismos envolvidos na reativação de leveduras dormentes de *C. neoformans* após infectar macrófagos ativados para um perfil M1;
- Analisar a culturabilidade de leveduras dormentes de *C. neoformans* após internalização por *Acanthamoeba castellanii*;
- Analisar a reativação de leveduras dormentes de *C. neoformans* em camundongos C57BL/6 selvagens ou deficientes na produção de NO ou IFN- γ imunocompetentes ou imunossuprimidos via tratamento com dexametasona;
- Analisar a reativação de leveduras dormentes de *C. neoformans* em camundongos Balb/c nude.

1.4 Metodologia:

1.4.1 Cultivo fúngico:

Foi utilizado neste trabalho o fungo *C. neoformans* H990 (variação *grubii*), gentilmente cedido pelo professor Arturo Casadevall, o qual era mantido armazenado em freezer -80 graus celsius (°C) com meio YPD (1% extrato de levedura (BD), 2% peptona (BD) e 2% dextrose (Sigma), pH 6,5) e 30% de glicerol. Na semana anterior a cada experimento, uma alíquota era descongelada e plaqueada em meio YPD ágar e incubada por três dias a 30 °C. Após os 3 dias, com auxílio de uma alça era feita uma raspagem da placa de uma região com várias colônias a fim de manter o fenótipo da população fúngica e esse agregado era inoculado em frasco ventilado com 10 mililitros (mL) de YPD líquido por 22h em agitação de 150 rotações por minuto (RPM) a 30 °C. Após esse tempo o fungo atingia a fase de crescimento estacionário (Stat1), era contado em hemocitômetro para ser usado nos experimentos. Já que após a indução de dormência, o *C. neoformans* continua apresentando 1% de culturabilidade, como controle, em alguns experimentos também utilizamos o fungo morto por calor (heat killed - HK), submetendo-o a aquecimento por 1h a 75 °C acrescido de 1% de Stat1 (HK + Stat).

1.4.2 Indução de dormência em *C. neoformans*

Após a o crescimento do fungo por 22h, foram inoculados 100 microlitros (μL) do Stat1 para cada um dos dois frascos contendo 10 mL de YPD líquido, o qual foi incubado por 20 horas (h) em agitação de 150 RPM a 30 °C. Após as 20h de crescimento o fungo atingia novamente o crescimento estacionário (Stat2), os frascos foram acondicionados em um saco plástico hermeticamente selado contendo um gerador de hipoxia (< 0,1% de oxigênio) (GENbag anaero, Biomérieux), e incubada durante 7 dias a 30 °C, em repouso (Hommel *et al*, 2019). A culturabilidade e viabilidade fúngica foi monitorada a cada experimento a fim de confirmar o fenótipo de células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC) (Hommel, B *et al*, 2019).

Para análise da culturabilidade, o fungo foi lavado com tampão fosfato (PBS) e 1×10^4 células foram plaqueadas em placa de YPD ágar e incubadas por 3 dias a 30 °C. Após os 3 dias, as colônias foram contadas, representando o número de leveduras

cultiváveis em relação ao número inicial inoculado e se prosseguia com o experimento quando a culturabilidade atingia um máximo de 5% do inóculo inicial.

A checagem da viabilidade celular era feita por meio de citometria de fluxo utilizando a sonda LIVE/DEAD Fixable Green (488 nanômetros (nm)/530 nm) (Invitrogen) na concentração 1:1000 em 10^6 - 10^7 células durante 20 minutos a temperatura ambiente e no escuro.

Para o controle da culturabilidade e capacidade de reativação das leveduras dormentes, 1×10^4 leveduras eram incubadas em 20 mL de meio mínimo [MM (15 milimolar (mM) dextrose, 10 mM $MgSO_4$, 29,4 mM KH_2PO_4 , 13 mM glicina e 3 μ M tiamina)] com 10% de SFB ou somente MM, distribuídos em placa de 96 poços e incubados por 5 dias a 30 ° C. Após os 5 dias, contavam-se os poços em que houve crescimento fúngico e empregava-se a seguinte fórmula para determinação da culturabilidade (C) e reativação (R):

$$C = 1 - \frac{(1-xy)}{100} \quad R = \frac{Csfb}{Cmm}$$

Em que x = poços com crescimento positivos; y = poços totais; Csfb = C na placa com 10% de SFB; e Cmm = C na placa só com MM.

1.4.3 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos

Para obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 de 8 a 12 semanas de idade foram retirados e seus interiores lavados com Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (Sigma-Aldrich). As células foram centrifugadas ($300 \times g$, 5 min, 4 ° C), ressuspensas em tampão de lise de hemácias (Red Blood Cell Lysis Buffer; Sigma-Aldrich), lavadas e semeadas na densidade de 2×10^6 células/placa de Petri em 10 mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) com 50 microgramas (μ g)/mL de gentamicina, 20% de SFB e 30% de meio condicionado de fibroblastos L929 (LCCM). As placas foram mantidas em atmosfera de CO_2 a 5% e temperatura de 37 ° C por 7 dias. Após 4 dias de cultivo, foram adicionados mais 10 mL do mesmo meio completo para diferenciação utilizado no primeiro dia. No sétimo dia, os macrófagos diferenciados foram lavados com meio aquecido a 37 ° C e coletados usando TrypLE™ Express (Gibco). Em seguida, as células

foram lavadas, ressuspensas em RPMI-1640 com 10% de SFB e 5% de LCCM e plaqueadas na densidade de 1×10^6 /mL, sendo mantidas por 24h em estufa com 5% de CO₂ antes dos estímulos ou infecções.

1.4.4 Obtenção de Vesículas Extracelulares de Macrófagos e ensaio de reativação

Para o isolamento de vesículas extracelulares (EV) de macrófagos, após a diferenciação com LCCM, os BMDMs foram plaqueados a 1×10^6 células/mL em frasco T182 cm² com RPMI-1640 e 10% de SFB por 24 h a 5% de CO₂. Para evitar a contaminação com EVs derivadas do SFB, este foi previamente tratado para eliminação de suas EVs (Kornilov, R *et al*, 2018). Para isso, o SFB inativado por calor (Gibco) foi filtrado em membrana de 0,22 µm e posteriormente ultrafiltrado em um sistema Amicon (Merck Millipore) em membrana de 100 kilodalton (kDa). O filtrado resultante foi confirmado quanto à depleção de EVs por meio do Micro BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) e foi utilizado no cultivo dos BMDM normalmente.

Após o cultivo dos BMDM por 24h a 37 ° C em atmosfera de CO₂ a 5%, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 300 x g para retirada de debris e filtrado em membrana de 0,22 µm. O filtrado foi então ultracentrifugado ($100.000 \times g$ a 4°C) por 1 h, e o pellet resultante foi lavado em PBS e ultracentrifugado mais uma vez. O pellet contendo EVs foi ressuspensado em 1 mL de PBS, quantificado utilizando o kit Micro BCA Protein Assay (Marina, C. *et al* 2020) e armazenado a -20°C. Para analisar o efeito das EVs na reativação das células dormentes, essas foram incubadas a 10 µg/mL em MM com células VBNC para análise da cinética de crescimento usando um espectrofotômetro Eon BioTek a 600 nm por 5 dias. Também foram testados outros componentes que poderiam estar presentes nas EVs induzindo a reativação: Polietileno Glicol Monoestearato de Sorbitano (Tween) 80 (0,1 mM, 1 mM e 10 mM) e L-Lysina (1mM) (Zeng, B. *et al*, 2012) e como controle negativo foi utilizado MM e como positivo o ácido pantotênico (125 µM);

1.4.5 Infeção de Macrófagos com células dormentes de *C. neoformans*

Após a diferenciação e plaqueamento dos macrófagos, os grupos foram tratados ou não (controle negativo) com apenas LPS (100 nanogramas (ng)/mL) e IFN γ (50 ng/mL) ou concomitantemente com aminoguanidina (Ag - 1mM), um inibidor da produção de NO por meio da inibição da expressão de iNOS, por 24h a 37 ° C a 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com meio RPMI aquecido e o tratamento foi repostado nas mesmas concentrações, exceto o estímulo com o LPS (aumentado para 500 ng/mL). Após a lavagem e contagem dos fungos dormentes (DCn), estes foram incubados por 30 minutos a 37 ° C com o anticorpo 18B7 anti-GXM (10 μ g/mL) para opsonização e posteriormente adicionados às células na proporção de 5 fungos para 1 macrófago (multiplicidade de infecção - MOI: 5). A placa foi mantida a 37 ° C com 5% de CO₂ por 24h. As células foram lavadas após 2h com meio RPMI para retirar as leveduras não fagocitadas e a placa foi incubada por mais 22h. Após esse período de infecção, as leveduras presentes no ambiente extracelular foram quantificadas e 1×10^4 leveduras plaqueadas para análise da culturabilidade.

1.4.6 Infeção de *Acanthamoeba castellanii* com células dormentes de *C. neoformans*

Células de *A. castellanii* gentilmente cedidas pela professora Patrícia Albuquerque (Universidade de Brasília) foram mantidas em cultura a 30 ° C em meio YPD diferencial para *Acanthamoeba* (extrato de levedura 0,1%, peptona 2% e dextrose 1,8%) e plaqueadas em placa de 24 poços na densidade de 1×10^6 células/mL em YPD. Após as células aderirem à placa (3h), foram adicionadas as leveduras dormentes na proporção de 5 leveduras para 1 célula de *A. castellanii*. Após 2h de interação, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado mais meio YPD. Após 24h de infecção, o sobrenadante foi coletado e as células aderidas lisadas com triton 0,05%. Ambos foram quantificados em câmara de Neubauer e foram plaqueadas 1×10^4 leveduras por placa de YPD ágar para análise da culturabilidade.

1.3.7. Quantificação de Óxido Nítrico

Para quantificação indireta da produção de NO pelos macrófagos infectados, o sobrenadante foi coletado e utilizado para quantificação de NO_2^- , subproduto da degradação de NO no meio de cultura, via método de Griess. Para isso, utilizou-se uma solução de Griess composta por sulfanilamida (1%), H_3PO_4 (5%) e NEED (1%). Em uma placa de 96 poços foram adicionados 25 μL de sobrenadante dos macrófagos infectados e 25 μL de solução de Griess, permanecendo em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, analisou-se a absorvância dos poços em espectrofotômetro a 540 nm de comprimento de onda.

1.3.8. Ensaio de reativação de *C. neoformans* dormente utilizando sistema de barreira física do tipo “transwell”

A fim de definir se para reativação do DCn era necessária fagocitose pelos macrófagos ou se somente o contato ou meio condicionado seriam suficientes para induzir a reativação, foram realizados experimentos utilizando o sistema “transwell”. Esse sistema é um recipiente do tamanho de um poço de uma placa de 24 poços com poros de 0,4 μm no fundo que se insere no poço da placa de cultivo. Isso permite que se faça um cultivo no poço inferior e um cultivo diferente no poço superior, permitindo a troca de compostos extracelulares, sem que haja contato físico entre os cultivos. Foram realizados no Instituto Pasteur, em parceria com o Dr. Raffael Castro, experimentos contendo os grupos: BMDM e DCn opsonizado com 18B7 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), permitindo fagocitose (com contato físico e com fagocitose); macrófagos e DCn sem 18B7 (fagocitose reduzida, mas com contato físico); e BMDMs no poço inferior e DCn no poço superior (sem contato físico). Na UnB, também foram realizados experimentos utilizando “transwell” para mostrar a influência de um fungo ativo H99-Stat (poço inferior) na reativação do DCn (poço superior).

1.3.9. Ensaio de extrusão de *C. neoformans* por citometria

A fim de analisar se as leveduras reativadas presentes no meio extracelular após infecção dos BMDMs estavam realizando exocitose, utilizamos leveduras marcadas com Calcofluor White para posterior análise por citometria de fluxo da proporção intra / extracelular com o passar do tempo (Bürgel, P. *et al*, 2020). Para isso, marcamos as

leveduras Stat, HK + 1% Stat e DCn com a sonda fluorescente Calcofluor White (10 µg/mL) por 10 minutos em temperatura ambiente e lavamos três vezes com PBS. As leveduras foram opsonizadas com o anticorpo 18B7 como descrito anteriormente e adicionadas aos BMDM utilizando MOI 5:1. Após 2h de infecção o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas com PBS morno para retirada das leveduras não fagocitadas. O PBS resultante da última lavagem foi coletado para quantificação de leveduras extracelulares no tempo de 2h. As células deste grupo foram então lisadas com SDS 0,05% para coleta das leveduras intracelulares. O mesmo foi repetido nos tempos de 6h, 12h e 24h após a infecção, com a diferença que o sobrenadante era coletado sem realizações de lavagens prévias, para posterior quantificação das leveduras extracelulares. Após cada coleta, as leveduras foram fixadas com paraformaldeído a 1% e armazenadas em local escuro a 4 ° C, para posterior leitura no citômetro de fluxo “BD LSRFortessa” (BD) no filtro de fluorescência “Pacific Blue”, com excitação no laser UV. Para análise, foi selecionada uma população homogênea com morfologia característica de leveduras de *C. neoformans* e alta fluorescência de Calcofluor White, caracterizando a população parental de fungos, para diferenciar daquelas resultantes de proliferação celular. A coleta de dados era realizada durante 1 min por tubo, o que permitiu calcular o número de leveduras / mL.

1.3.10. Quantificação de citocinas

O sobrenadante dos macrófagos infectados foi coletado para quantificação de citocinas utilizando-se o kit de ensaio Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex acoplado ao sistema Luminex 200, de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad). Quando indicado, os níveis de IL-1 β e IL-6 ou pro-IL-1 β presentes no sobrenadante celular ou nas amostras de lisado celular, respectivamente, foram avaliados pelo ensaio de imun absorção enzimático (ELISA) de acordo com as diretrizes do fabricante (Invitrogen). Experimento realizado no Institut Pasteur, Paris pelo Dr. Raffael Castro.

O sobrenadante do macerado dos pulmões e cérebros retirados dos animais infectados foi utilizado para quantificação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1- β e IFN- γ por meio do método de ELISA (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante.

1.3.11. Camundongos

Foram utilizados camundongos (*mus musculus*) – linhagem C57BL/6 selvagem (WT), camundongos Balb/c nude disponibilizados pela Universidade Católica de Brasília (UCB) e camundongos C57BL/6 B6.129S7-Ifng (gene Ifng deletado - Δ Ifng) cedidos pelo professor Milton Oliveira, da Universidade Federal de Goiás, e B6.129P2-Nos3tm1Unc/J (gene Nos3 deletado - Δ iNOS) cedidos pelo professor João Santana, da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

Os animais foram mantidos no biotério da Universidade de Brasília com água e comida *ad libitum* e utilizados para experimentação quando atingiam a idade entre 8 e 12 semanas de idade. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o projeto aprovado pelo Conselho de Ética da Universidade de Brasília (SEI n.º 23106.113772/2020-80), segundo as diretrizes do Conselho Brasileiro de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

1.3.12. Indução de Imunossupressão utilizando dexametasona

A fim de induzir um estado imunossupressivo, camundongos foram submetidos ao tratamento com dexametasona (Déxium – Chemitec), iniciando-se três dias antes da infecção e repetido a cada 24h até o fim do experimento. O tratamento era feito de forma intraperitoneal com a injeção de 20 mg/kg de animal (Chan, J. *et al*, 2016; An, G. *et al*, 2020). Para comprovação do fenótipo imunossuprimido, coletamos sangue dos animais via plexo retro orbital, o qual foi utilizado para quantificação das células sanguíneas em hemocítmetro, enquanto o soro foi utilizado para quantificação de IL-10 pelo método de ELISA.

1.3.13. Infecção dos camundongos

Antes da infecção, os animais foram anestesiados via intramuscular com uma solução de Ketamina injetável (Vetnil) e Xilazina (Ceva). Realizou-se uma solução estoque de anestésico contendo 120 μ L de Xilazina, 120 μ L de Ketamina e 560 μ L de PBS. O animal era pesado e seu peso em gramas era multiplicado por 5 para determinar o volume em microlitros da solução a ser administrada. A infecção foi feita de forma intratraqueal com abertura do tecido do pescoço utilizando bisturi estéril (CIRUBLADE) seguido pela injeção de 40 μ L de PBS contendo 1×10^5 células de *C. neoformans*, sendo

um grupo infectado com o fungo Stat, outro com o fungo HK + 1% Stat, representando o controle de culturabilidade do DCn, e outro com DCn. Os camundongos foram eutanasiados após 7 ou 14 dias, quando seus pulmões e cérebros retirados para análise histopatológica, macerados para quantificação de carga fúngica por contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) e de citocinas por ELISA.

1.3.14. Análise estatística

As figuras apresentadas nos resultados desse trabalho (sessão 1.4) são representativas de no mínimo 3 replicatas técnicas e biológicas realizadas. Em todos eles foram realizados testes estatísticos do tipo one-way ou two-way ANOVA utilizando o software GraphPad Prism, versão 9.0.

1.4. Resultados

1.4.1 Macrófagos promovem a reativação de células dormentes de *C. neoformans* por meio da produção de vesículas extracelulares

Como já demonstrado anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Castro, R. 2019), ao infectar macrófagos derivados de medula (BMDM) com leveduras dormentes de *C. neoformans* (DCn) por 24h, ocorre a reativação do crescimento fúngico. Isso é demonstrado pelo aumento da culturabilidade das leveduras coletadas do meio extracelular após 24h em relação ao grupo sem macrófagos (RPMI + SFB) (Figura 2A). Tal reativação é significativamente reduzida quando os macrófagos são estimulados previamente com LPS e IFN- γ , induzindo a ativação dos macrófagos para um perfil pró-inflamatório M1 (Fig. 2A). A redução da culturabilidade é acompanhada por uma maior produção de óxido nítrico (NO) (Fig. 2B) e volta a crescer quando os macrófagos são tratados com o inibidor da produção de NO (aminoguanidina - Ag), também previamente estimulados com LPS e IFN- γ . Isso demonstra a provável influência do NO em evitar a reativação do DCn ou em provocar a morte das leveduras. Além disso, esse resultado demonstra que um macrófago não inflamatório (não tratado) é mais favorável para permitir a reativação fúngica, provavelmente devido a uma menor produção de compostos microbicidas no fagolisossomo do que macrófagos M1 (Subramani, A. *et al*, 2020).

A fim de analisar se a indução da reativação fúngica ocorre por algum mecanismo específico do macrófago, escolhemos um micro-organismo unicelular com características estruturais similares aos macrófagos, incluindo a capacidade fagocítica. Escolhemos então o *A. castellanii*, um importante predador de *C. neoformans*, que contribuiu evolutivamente para a adaptabilidade do fungo à interação intracelular com macrófagos (Steenbergen, J. N *et al*, 2001). Observamos que o comportamento do fungo após a infecção das amebas foi o oposto do observado com os macrófagos (Fig. 2C), pois tanto as leveduras não internalizadas (extracelulares – AmE) quanto as que haviam sido internalizadas (Intracelulares – AmI) apresentaram uma redução na culturabilidade comparadas com as que estavam no meio sem amebas (YPD). Isso indica uma resistência imposta pelas amebas que evita a reativação do DCn, diferente do observado na interação com os macrófagos, em que há a retomada da proliferação fúngica, indicando que esse comportamento é específico da relação com macrófagos.

Para tentar entender se é necessário que haja fagocitose para induzir a reativação ou se ocorre por algum composto secretado pelos macrófagos, inoculamos o DCn em poços contendo um sistema transwell com membrana de $0,4 \mu\text{m}$ (Fig. 2D). Isso permitia uma separação física entre macrófagos e fungos, evitando a fagocitose, mas permitindo a passagem de compostos secretados. Incluímos também como controle a presença ou não do anticorpo 18B7, para analisar se esse exercia alguma influência no processo. Observamos então, que quando havia fagocitose (grupo ii), a culturabilidade final era significativamente maior do que quando não havia (grupos i, iii e iv). Embora em menor grau, a culturabilidade também aumentou nos grupos contendo macrófagos (iii e iv) em relação ao que não continha (i), independentemente do contato físico entre macrófagos e fungos, indicando que a reativação também é influenciada por compostos secretados pelos macrófagos (Fig. 2D).

Além disso, analisamos se a presença de um fungo fisiologicamente ativo (Stat) induziria a reativação do DCn e, para isso, também utilizamos o sistema transwell, adicionando o DCn na câmara superior e BMDM infectados ou não com H99 Stat na câmara inferior (Fig. 2E). Observamos então que a presença do Stat não estimulou a reativação do DCn, já que a culturabilidade dos grupos contendo H99 Stat não foi maior do que o que continha somente RPMI (Fig. 2E). Isso indica que aparentemente não há um fenômeno de quorum sensing tão expressivo entre leveduras já ativas e as que permanecem dormentes em termos de indução de reativação.

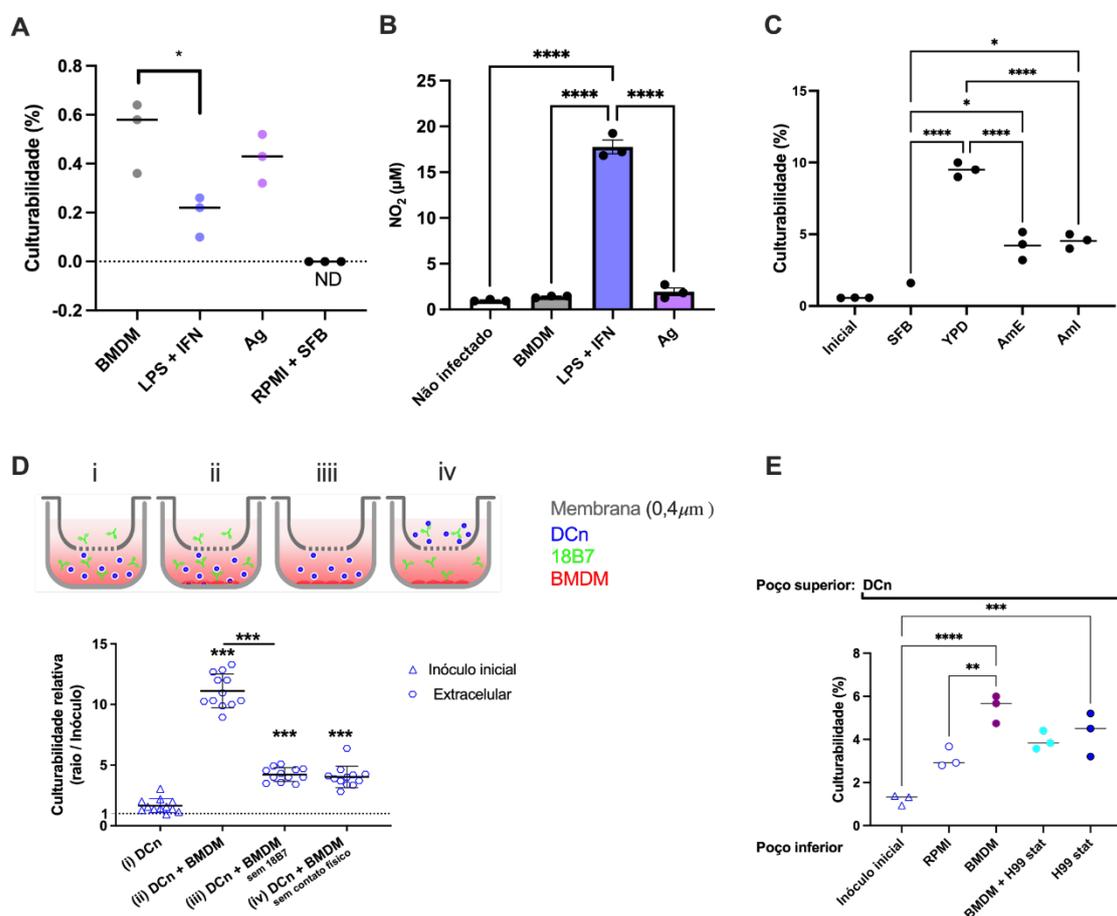


Figura 2. *C. neoformans* dormente é reativado após ser fagocitado por macrófagos com perfil anti-inflamatório. Médias e SEM da (A) culturabilidade de leveduras dormentes (DCn) de *C. neoformans* extracelulares após a infecção de macrófagos (BMDM) previamente estimuladas com LPS (500 ng/mL) e IFN (50 ng/mL) ou aminoguanidina (Ag) (1mM) empregando MOI 5 por 24h a 30 °C. Duas horas após a infecção, as leveduras não fagocitadas foram removidas da cultura (lavadas). (B) Quantificação da concentração de NO₂ no sobrenadante dos macrófagos utilizados na Figura 1A. (C) Culturabilidade de leveduras DCn após infecção de *A. castellanii* em YPD por 24h a 30 °C empregando MOI 5. AmE representa a culturabilidade das leveduras extracelulares e AmI das leveduras intracelulares. (D) Metodologia de ensaio com sistema transwell representando barreira física com poros de 0,4 µm entre poços superior e inferior, permitindo a passagem de compostos secretados. Em i, DCn no poço inferior com RPMI e 18B7; em ii, BMDM infectadas com DCn opsonizados com 18B7 (com fagocitose); em iii, BMDM e DCn não opsonizados com 18B7 (sem fagocitose e com contato físico); e em iv, DCn opsonizados no poço superior sem contato físico com os BMDM no poço inferior. Eixo y representa a culturabilidade do DCn 24h após o cultivo inicial em relação à culturabilidade de 2h (E) Culturabilidade do DCn coletado de poço superior de sistema transwell com poros de 0,4 µm que permite a passagem de compostos secretados pelas células presentes no poço inferior: BMDM, H99 em crescimento estacionário (stat) ou BMDM + H99 stat. Foi realizada análise estatística do tipo one-way anova, no qual * representa P < 0,05 e **** representa P < 0,0001. ND representa abaixo do limite de detecção do método.

Como constatamos que para que haja maiores taxas de reativação é necessário que haja fagocitose e que as leveduras estejam presentes no meio extracelular ao final das 24h de infecção, quisemos confirmar se estas estavam realizando processo de vomocitose

(exocitose não lítica). Para isso, infectamos os BMDM com *C. neoformans* Stat, HK, HK + 1% Stat e DCn marcados com Calcofluor White e coletamos os fungos nos meios intra e extracelular nos períodos de 2h, 6h, 12h e 24h depois. Em análise por citometria de fluxo, selecionamos os fungos com alta fluorescência de Calcofluor White, representando a população de células que não se dividiu (Figura 3A e 3B).

Observamos também uma redução no número de leveduras parentais intracelulares após 24h em todos os fungos, indicando a saída ou morte intracelular dessas leveduras (Fig. 3A). Entretanto, só observamos aumento significativo de leveduras parentais extracelulares nos grupos Stat ou DCn (Fig. 3B), indicando que essas leveduras estavam provavelmente realizando vomocitose e se mantendo viáveis no meio extracelular, enquanto as HK estavam sendo degradadas no meio intracelular. Além disso, não vimos diferença entre o grupo HK e o grupo HK + 1% Stat, mas sim entre esses dois e o grupo DCn. Isso mostra que as leveduras DCn extracelulares são leveduras que reativaram no fagolisossomo e conseguiram realizar o processo ativo de saída dos macrófagos, e não apenas células persistentes do processo de indução de dormência.

Para começar a desvendar os mecanismos envolvidos na reativação, supomos se as vesículas extracelulares (EV) produzidas pelos macrófagos seriam fatores importantes nesse processo, pois poderiam estar carreando parte dos compostos bioativos secretados, além de apresentarem tamanho menor do que o poro do transwell. Isolamos então as EVs como descrito anteriormente e às incubamos com o DCn para análise da cinética de crescimento por 5 dias (Figura 3C e 3D). Observamos então que as EVs reduziam significativamente a latência do crescimento fúngico em relação ao meio mínimo (MM), assim como o ácido pantotênico, como já havia sido descrito anteriormente (Fig. 3C e 3D). Isso representa a quebra de latência induzida por esses compostos (Fig. 3D), indicando que alguns dos componentes secretados pelos macrófagos responsáveis pela reativação do DCn são liberados no interior de EVs. O ácido pantotênico foi utilizado como controle positivo pois já é bem descrito como um fator de reativação das VBNC de *C. neoformans* (Hommel *et al.*, 2019) e cogitamos que poderia também ser um constituinte das EVs. Além disso, Tween já foi utilizado para reativar VBNC de outros micro-organismos (Zeng, B. *et al.*, 2012) e por ser um composto rico em lipídeos, componente essencial na composição de EVs, testamos também a capacidade de esse

composto reativar as DCn de *C. neoformans*. Para isso, incubamos o DCn com Tween 80 em diferentes concentrações (Fig. 3D). Observamos que baixas concentrações desse composto (0,1 mM) também induzem a reativação do DCn e curiosamente, à medida que aumentamos a concentração do Tween, a latência é maior (Fig. 3C), podendo significar uma toxicidade devido ao excesso de lipídios.

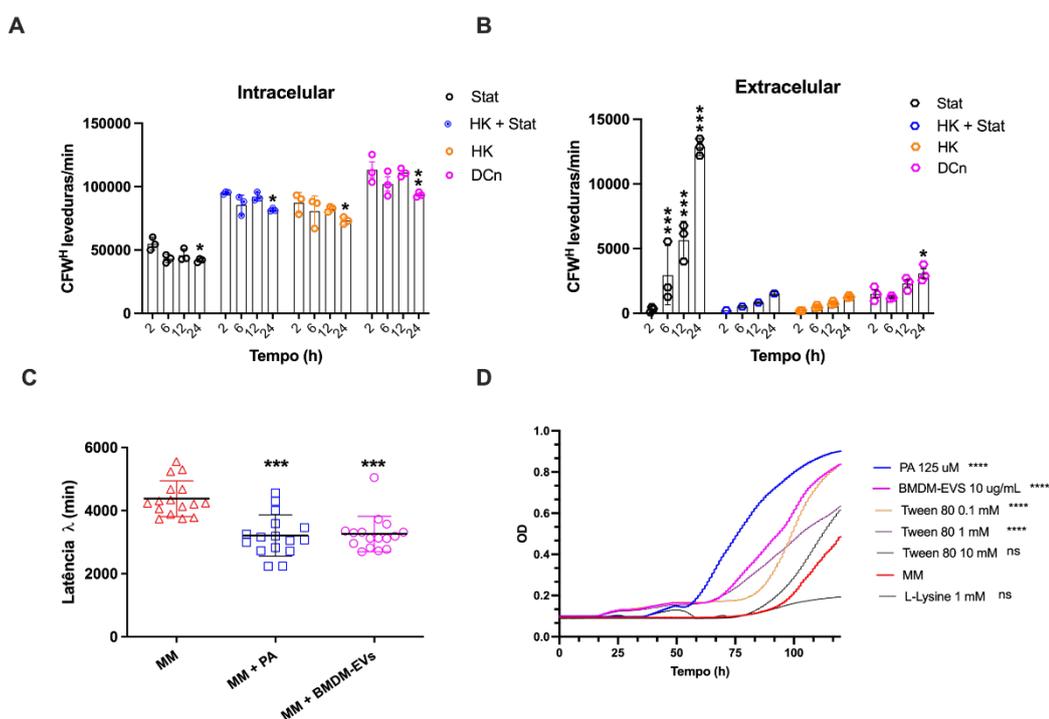


Figura 3. Macrófagos promovem a reativação de células dormentes de *C. neoformans* por meio da produção de vesículas extracelulares. (A e B) Processo de exocitose não lítica realizada por *C. neoformans* durante infecção de BMDM por 24h. Quantificação por citometria de fluxo de leveduras em crescimento estacionário (Stat), mortas por calor + 1% Stat (HK) e DCn parentais marcadas com Calcofluor White (CFW alto) no meio intracelular (A) e no meio extracelular (B) durante 24h de infecção de BMDM em MOI inicial 5. Análise estatística do tipo one-way anova, em que * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$ em relação ao tempo 2h. (C e D) Redução da latência de crescimento de *C. neoformans* dormente estimulado pelo cultivo com ácido pantotênico (PA) ou vesículas extracelulares de BMDM (BMDM-EV). (D) Cinética de crescimento realizada em espectrofotômetro Eon BioTek a 600 nm por 5 dias em que se realizou cultivo de DCn em meio mínimo (MM) com diferentes estímulos para reativação: ácido pantotênico (PA - 125 μ M); BMDM-EV (10 μ g/mL); Tween 80 (0,1 mM, 1 mM e 10 mM) e L-Lysina (1mM). Análise estatística do tipo one-way anova, na qual *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo somente com MM.**

Como vimos que a fagocitose de DCn estimula a reativação desse fungo, analisamos também como a infecção dos macrófagos estaria influenciando na produção de citocinas e quimiocinas, o que está diretamente relacionado com o orquestramento de uma resposta imune inata e quimiotaxia de outros leucócitos para o sítio de infecção. Para isso, realizamos a quantificação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de macrófagos pré-tratados com LPS (500 ng/mL) e infectados com *C. neoformans* em crescimento exponencial (E-Cn), estacionário (S-Cn) ou dormente (D-Cn) por meio da técnica luminex (Figura 4). Notamos que em todos os casos as infecções induziram um aumento na produção de quimiocinas ligante (CCL)2 e CCL4, as quais estão relacionadas com a quimiotaxia de monócitos e macrófagos para o sítio inflamatório. Entretanto, DCn induziu um aumento significativamente maior de CCL4 do que os fungos em crescimento ativo. Esse aumento pode indicar uma preferência do *C. neoformans* por macrófagos como sítio de infecção, já que são células importantes para manutenção de latência e disseminação da infecção para outros órgãos (Menten, P. *et al* 2002).

Ao mesmo tempo, houve um aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , TNF- α , IL-1 β e G-CSF induzido pelas formas de crescimento S-Cn e E-Cn, enquanto os macrófagos infectados com DCn não apresentaram tal aumento (Fig. 4B). Ademais, foi observado uma redução na produção de IL-12(p40) induzida por S-Cn e E-Cn, não acompanhada pelos macrófagos infectados com DCn (Fig. 4B). Esses resultados indicam uma estratégia utilizada pelo fungo dormente para não ativar os macrófagos durante sua infecção, evitando a morte do micro-organismo e manutenção da latência. Outro resultado interessante foi que o DCn foi o único capaz de estimular a produção da citocina IL-12(p70), ou seja, a citocina biologicamente ativa. Essa citocina está relacionada à ativação de linfócitos para um perfil Th1 e produção de IFN- γ (Mattner, F. *et al*, 1993).

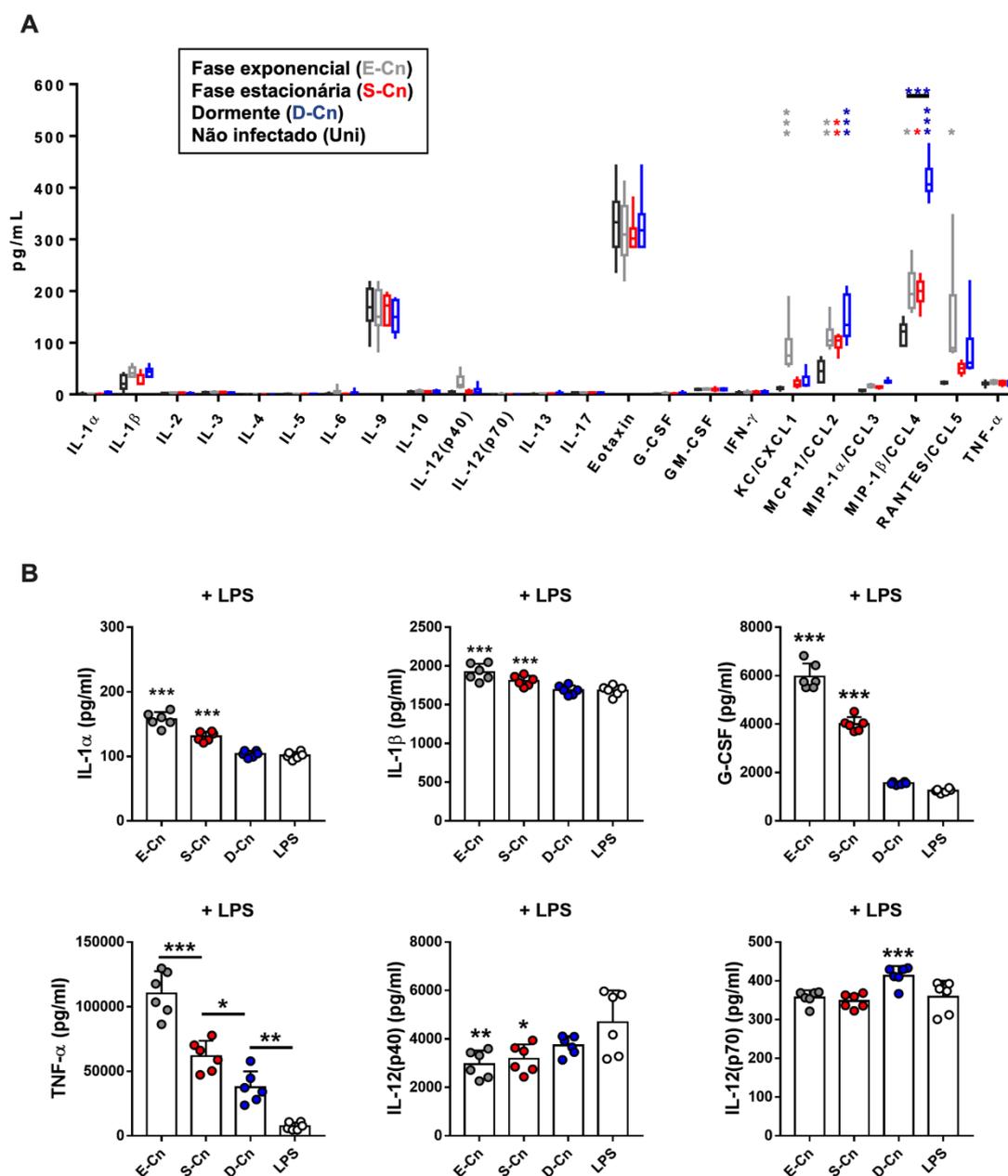


Figura 4. *C. neoformans* dormente induz uma maior produção de quimiocinas por macrófagos infectados. Médias e SEM de citocinas e quimiocinas detectadas no sobrenadante de macrófagos pré-ativados com LPS (500 ng/mL) infectados com *C. neoformans* em estágio de crescimento exponencial (E-Cn) estacionário (S-Cn) ou dormente (D-Cn) em MOI 5. Quantificação pela técnica de luminex (A) ou ELISA (B). Análise estatística do tipo one-way anova, no qual * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo não infectado (LPS).

1.4.2. C. neoformans não é reativado ao infectar camundongos imunocompetentes

Após a demonstração *in vitro* da importância dos macrófagos para a reativação do *C. neoformans* dormente, quisemos avaliar as condições para reativação do DCn *in vivo*. Para isso, utilizamos primeiramente camundongos WT e Δ iNOS a fim de analisar a possível influência da produção de NO na reativação de DCn também em um contexto de infecção *in vivo*, já que isso havia sido constatado nos modelos de infecção *in vitro*. Como controles, utilizamos o *C. neoformans* metabolicamente ativo, em crescimento estacionário (Stat) e o fungo morto por calor adicionado de 1% Stat (HK + Stat). Esse controle foi utilizado pois o DCn induzido *in vitro* apresenta cerca de 1% de culturabilidade inicial que poderia ser confundido com reativação.

Após 7 dias de infecção não houve diferença significativa entre a carga fúngica detectada nos pulmões dos camundongos WT infectados com *C. neoformans* DCn e seus respectivos controles positivo (Stat) e negativo (HK + 1% stat) (Figura 5A). Entretanto, nos camundongos Δ iNOS os animais infectados com Stat apresentaram uma carga fúngica pulmonar significativamente maior do que os outros dois grupos (Fig. 5A). Esse resultado se repetiu após 14 dias de infecção (Fig. 5B), em que os camundongos infectados com Stat apresentaram uma carga fúngica significativamente maior nos pulmões do que os demais grupos. Por sua vez, não houve diferença entre o grupo DCn e seu respectivo controle negativo (HK + Stat), indicando que não houve reativação expressiva do fungo dormente, apesar de que as leveduras conseguiram sobreviver e proliferar nos pulmões dos animais infectados (Fig. 5).

Além disso, também não houve diferença significativa entre os camundongos WT e Δ iNOS, demonstrando que nestas condições experimentais, a ausência de NO não altera capacidade de reativação fúngica ou mesmo da proliferação do fungo em crescimento ativo. Ademais, isso indica que independentemente do estágio metabólico fúngico, eles apresentam resistência ao NO produzido pelo organismo de forma semelhante, conseguindo se manter viável apesar da resistência do sistema imune. Em nenhum dos grupos foi detectada carga fúngica nos cérebros dos animais, indicando que em organismos imunocompetentes o *C. neoformans* tem mais dificuldade para chegar ao SNC. É importante considerar que a técnica utilizada foi a contagem de unidades

formadoras de colônia (CFU) e que poderia haver leveduras no tecido, apesar de não o suficiente para atingir o limite de detecção da técnica.

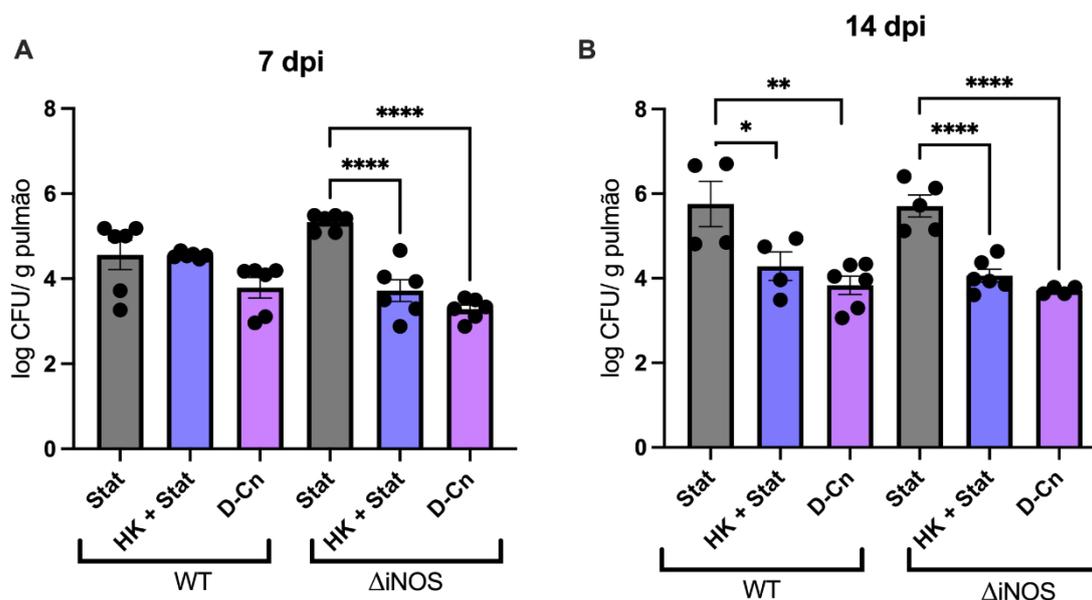


Figura 5. *C. neoformans* não é reativado ao infectar camundongos imunocompetentes. Médias com erro padrão (SEM) das cargas fúngicas pulmonares de camundongos C57bl/6 WT e ΔiNOS após 7 (A) e 14 dias (B) de infecção intratraqueal com 1×10^5 células de *C. neoformans* em estágio de crescimento estacionário (stat), 99% heat killed mais 1% estacionário (HK + Stat) ou dormente (DCn). Análise estatística do tipo one-way anova, no qual *** representa $P < 0,001$.

Embora não tenhamos constatado grandes diferenças nas cargas fúngicas pulmonares com 7 dias de infecção (dpi), houve um aumento significativo na produção de TNF- α nos pulmões dos camundongos infectados com HK + 1% Stat, tanto nos WT quanto nos ΔiNOS (Figura 6A). Esse padrão se repetiu na produção de IFN- γ nos pulmões dos camundongos WT (Fig. 6B) e nos cérebros dos camundongos ΔiNOS (Fig. 6F). Tal ativação deve ser proveniente do reconhecimento dos componentes intracelulares extravasados durante o aquecimento das leveduras HK ou à ausência dos mecanismos utilizados pelas leveduras vivas para inibir a produção de citocinas inflamatórias. É interessante observar também que houve um aumento da produção de IFN- γ nos pulmões dos camundongos ΔiNOS em relação aos camundongos WT quando infectados com Stat (Fig. 6B). Isso pode indicar um feedback do organismo para tentar suprir a falta de NO, produzindo IFN- γ em resposta à alta taxa de proliferação do Stat.

Além disso, a produção de IL-1 β foi maior nos pulmões dos camundongos infectados com Stat do que nos camundongos infectados com HK + 1% Stat ou com DCn, tanto nos WT quanto nos Δ iNOS (Fig. 6C). Isso demonstra a importância dessa citocina contra infecções por *C. neoformans*, que é mais ativada quando há infecção fúngica com altas taxas de proliferação celular, o que não é alterado na ausência de NO. Curiosamente, esse comportamento se inverteu no cérebro dos camundongos WT, em que DCn induziu um aumento significativo na produção de TNF- α e IL-1 β , sendo um indicativo da presença do DCn no cérebro (Fig. 6D e 6F). Por fim, não houve diferenças significativas na produção de IFN- γ nos cérebros dos animais infectados (Fig. 6E).

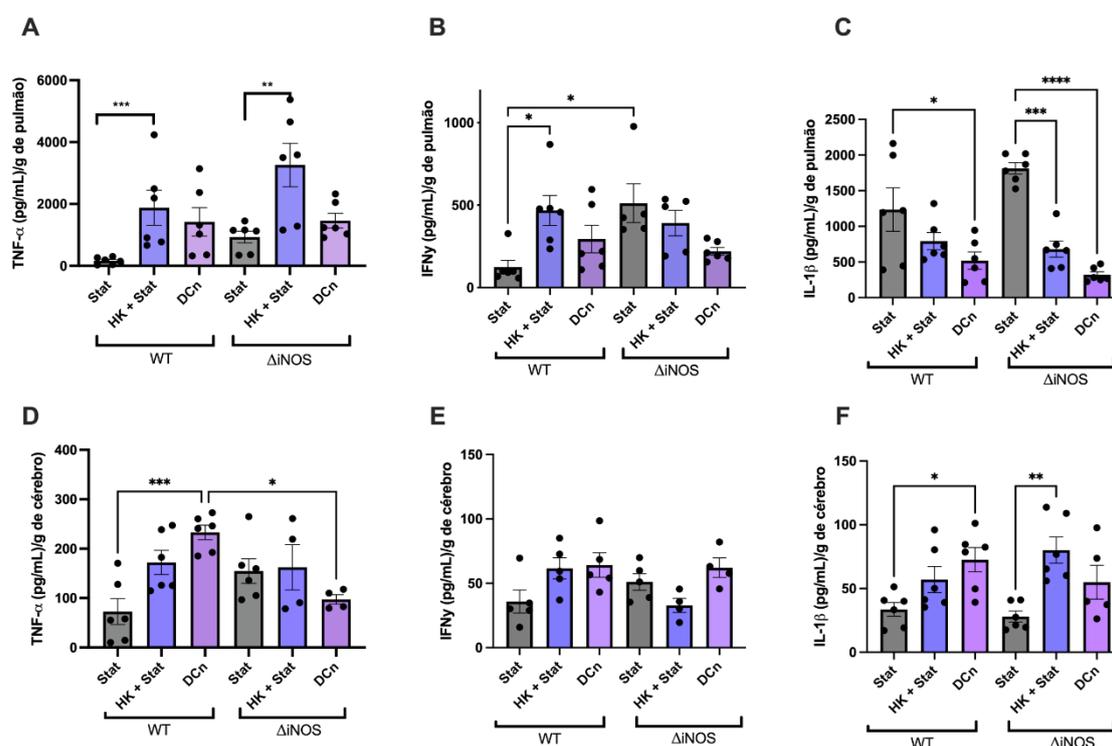


Figura 6. *C. neoformans* induz diferentes respostas inflamatórias nos pulmões de camundongos infectados dependendo de seu estado metabólico inicial após 7 dias de infecção. Médias e SEM de citocinas pró-inflamatórias presentes no macerado dos pulmões (A-C) e cérebros (D-F) de camundongos C57bl/6 WT e Δ iNOS infectados via intratraqueal com 1×10^5 células de *C. neoformans* em estágio de crescimento estacionário (Stat), 99% heat killed mais 1% estacionário (HK + Stat) ou dormente (DCn) e sacrificados após 7 dias de infecção (dpi). Análise estatística do tipo one-way anova, no qual * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Após 14 dias de infecção houve uma redução na produção da maioria das citocinas dosadas tanto nos pulmões quanto nos cérebros dos animais em relação aos camundongos eutanasiados com 7 dpi (Figura 7). Isso indica a adaptação do *C. neoformans* ao organismo do hospedeiro com o decorrer da infecção e a capacidade dessa espécie em modular a resposta imune, independentemente de estar em estado dormente. Com 14 dpi ainda notamos a diferença na produção de IL-1 β nos pulmões dos camundongos Δ iNOS infectados com Stat em relação aos infectados com DCn (Fig. 7C) e também a produção de TNF- α reduzida nos camundongos Δ iNOS infectados com DCn em relação aos infectados com HK + Stat (Fig. 7D). Esses resultados mostram a capacidade do DCn em estimular menos a resposta imune do hospedeiro, se mantendo inerte nessas condições e confirmando o que já havia sido demonstrado *in vitro* (Fig. 4B).

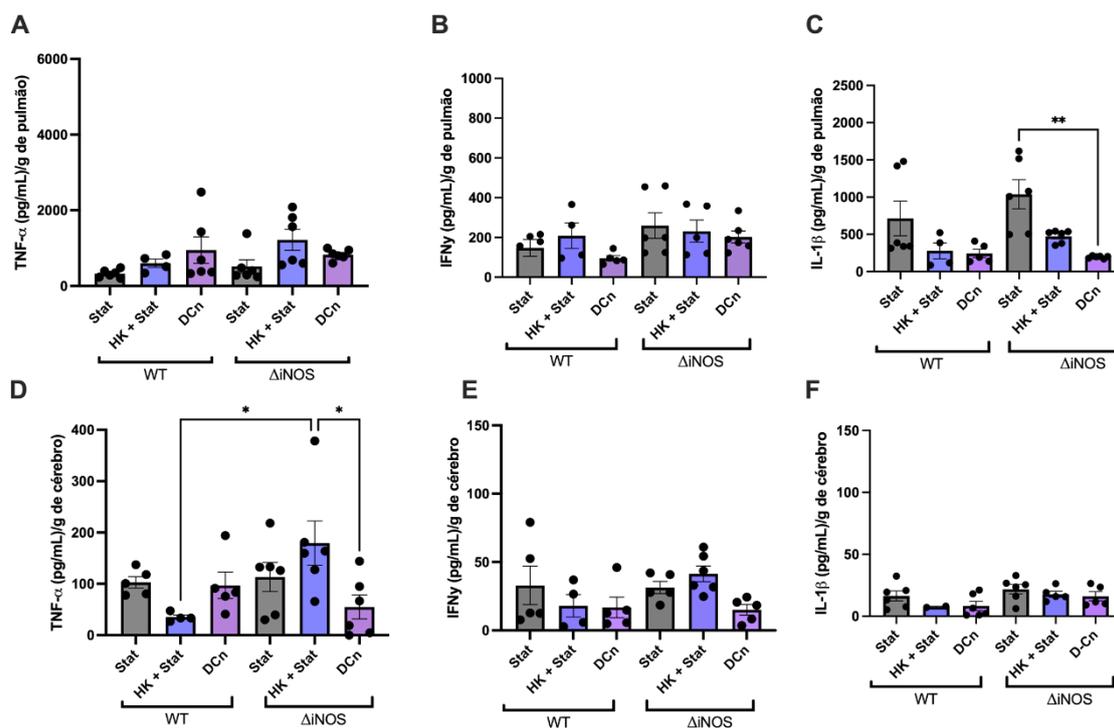


Figura 7. Após 14 dias de infecção por *C. neoformans*, há uma redução na produção de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões e cérebros. Médias e SEM de citocinas pró-inflamatórias detectadas no macerado dos pulmões (A-C) e cérebros (D-F) de camundongos C57bl/6 WT e Δ iNOS infectados via intratraqueal com 1×10^5 células de *C. neoformans* em estágio de crescimento estacionário (Stat), 99% heat killed mais 1% estacionário (HK + Stat) ou dormente (DCn) e sacrificados após 14 dias de infecção (dpi). Análise estatística do tipo one-way anova, no qual ** $p < 0,01$;

1.4.3. *C. neoformans* reativa durante disseminação para o sistema nervoso central em camundongos imunodeficientes

Como não houve diferenças significativas entre os grupos infectados com *C. neoformans* HK + Stat e os grupos infectados com DCn nos camundongos WT ou nos Δ iNOS imunocompetentes após 7 ou 14 dias de infecção, concluímos que não houve reativação significativa do *C. neoformans* dormente neste período. Portanto decidimos avaliar a reativação em camundongos imunossuprimidos, supondo que a resposta imune poderia estar impedindo a reativação fúngica.

Para isso, induzimos imunossupressão, por meio de tratamento com o fármaco dexametasona, em camundongos WT, Δ iNOS e Δ Ifng, iniciando três dias antes da infecção e sendo realizada diariamente durante todo o tempo de experimento. Observamos redução significativa na porcentagem de células pequenas, como linfócitos, e aumento da porcentagem de células médias e grandes, como monócitos e neutrófilos circulantes (Figura 8), indicando que o tratamento de imunossupressão mediada por dexametasona foi bem-sucedido (Chan, J.F.W. *et al*, 2016). Outro fator analisado foi a produção de IL-10 no soro dos camundongos infectados, indicativo de imunossupressão, apesar de não ser determinante para esse fenótipo, já que o mecanismo de ação da dexametasona é a redução do número de células T (An, G. *et al*, 2020). Somente os camundongos Δ Ifng apresentaram um aumento significativo na produção dessa citocina após o tratamento com dexametasona, indicando a maior suscetibilidade dessa linhagem ao tratamento (Fig. 8).

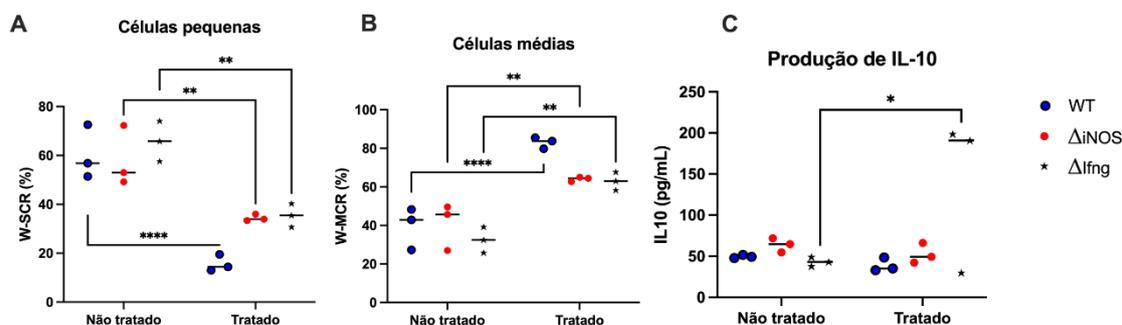


Figura 8. Tratamento com Dexametasona gera imunossupressão em camundongos tratados por 17 dias. Média e SEM da (A e B) quantificação celular e (C) produção de IL-10 quantificada por ELISA do

soro isolado do sangue retirado do plexo retro orbital de camundongos C57bl/6 WT, Δ iNOS ou Δ IFN γ tratados diariamente por 14 dias com Dexametasona via intraperitoneal na concentração de 25 mg/kg de animal. Análise estatística do tipo one-way anova, no qual * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Infectamos então os camundongos C57bl/6 WT e KOs com o *C. neoformans* dormente e seus respectivos controles 3 dias após o início do tratamento imunossupressor, eutanaziando-os após 14 dias de infecção para realização das análises. Não houve diferenças significativas entre as cargas fúngicas pulmonares dos camundongos infectados com HK + Stat e com DCn em nenhum dos grupos de camundongos (Figura 9A), indicando que não houve reativação expressiva nos pulmões mesmo na ausência de IFN- γ ou NO. No entanto, em todas as linhagens de camundongos, os infectados com Stat apresentaram uma carga fúngica pulmonar significativamente maior do que os infectados com DCn (Fig. 9A), confirmando a maior facilidade para esse fungo se proliferar em organismos imunossuprimidos e deficientes em IFN- γ ou NO (Lovchik, J. A. *et al*, 1995).

Também não observamos reativação do fungo dormente nos cérebros dos animais WT ou Δ iNOS, já que não houve diferença entre os infectados com HK + Stat e DCn (Fig. 9B). Entretanto, dentre os camundongos Δ Ifng, somente detectamos CFU no cérebro dos camundongos infectados com DCn, mostrando que esse fungo foi capaz de migrar para o cérebro desses animais e reativar nesse órgão. Coletivamente, nossos resultados indicam que a ausência de IFN- γ , combinada ao tratamento imunossupressor com dexametasona, favoreceu a migração e reativação do *C. neoformans* dormente. Entretanto, o NO não exerce função direta em impedir a reativação fúngica, levando a crer que esse processo deve ser desencadeado por outro mecanismo de ação também induzido pelo INF- γ .

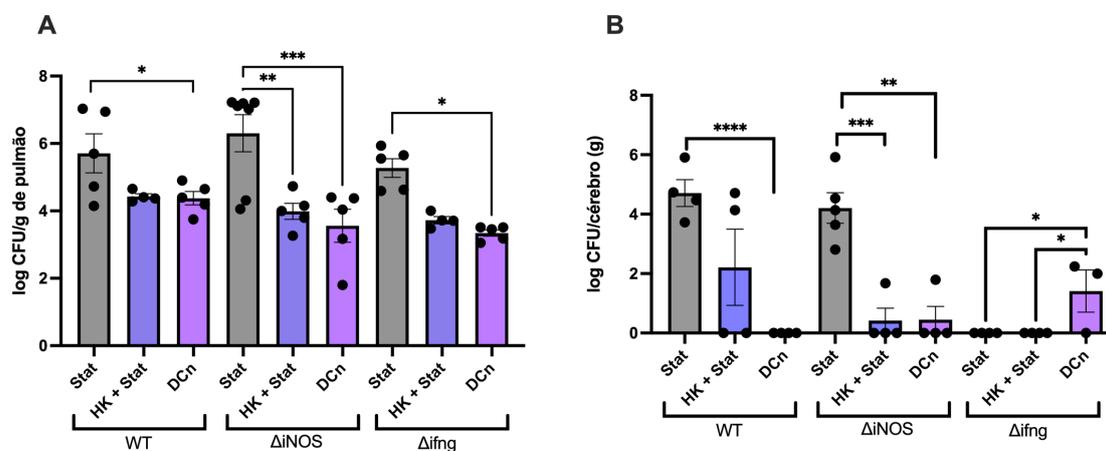


Figura 9. *C. neoformans* reativa durante migração para SNC em camundongos deficientes para IFN- γ . Médias e SEM das cargas fúngicas pulmonares (A) e cerebrais (B) de camundongos C57bl/6 WT, Δ iNOS ou Δ ifng tratados diariamente com 25 mg/kg de Dexametasona via intraperitoneal e infectados via intratraqueal 3 dias após o início do tratamento com 1×10^5 células de *C. neoformans* Stat, HK + Stat ou DCn e sacrificados após 14 dpi. Análise estatística do tipo one-way anova, no qual * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para avaliar se a reativação poderia ocorrer também em camundongos naturalmente imunodeprimidos, infectamos camundongos Balb/c nude com o fungo dormente e seus controles, nas mesmas condições anteriores. De forma semelhante à infecção dos camundongos deficientes em IFN- γ , não houve reativação do DCn nos pulmões dos camundongos Balb/c nude, já que não houve diferença entre os grupos infectados com HK + Stat e com DCn (Figura 10A). No entanto, a carga fúngica cerebral foi significativamente maior nos camundongos infectados com o fungo dormente do que nos infectados com HK + Stat e não houve diferença em relação à infecção com Stat (Fig. 10B). Esse resultado indica que, embora o fungo dormente não seja capaz de se multiplicar de forma tão eficiente nos pulmões quanto o fungo em fase de crescimento estacionária, ele apresenta tropismo pelo sistema nervoso central e capacidade de reativação e/ou proliferação no tecido cerebral. Esses resultados indicam retenção da virulência na forma dormente e maior facilidade para migrar para o SNC devido a seu estado menos ativo metabolicamente.

Ademais, houve uma maior produção de TNF- α nos pulmões dos animais infectados com DCn em relação aos outros grupos (Fig. 10C) e uma redução da produção de IL-1 β nos pulmões dos camundongos infectados com o fungo Stat (Fig. 10D). Não houve diferença na produção de IFN- γ pulmonar entre os grupos (Fig. 10E) e não houve

diferença na produção de nenhuma das citocinas testadas nos cérebros dos animais (Fig. 10C-E). Nota-se também que há uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias no cérebro em relação aos pulmões, o que pode ser um dos fatores que favorecem a sobrevivência e reativação do fungo dormente nesse órgão, já que dessa forma, enfrentam menos resistência do sistema imune do hospedeiro.

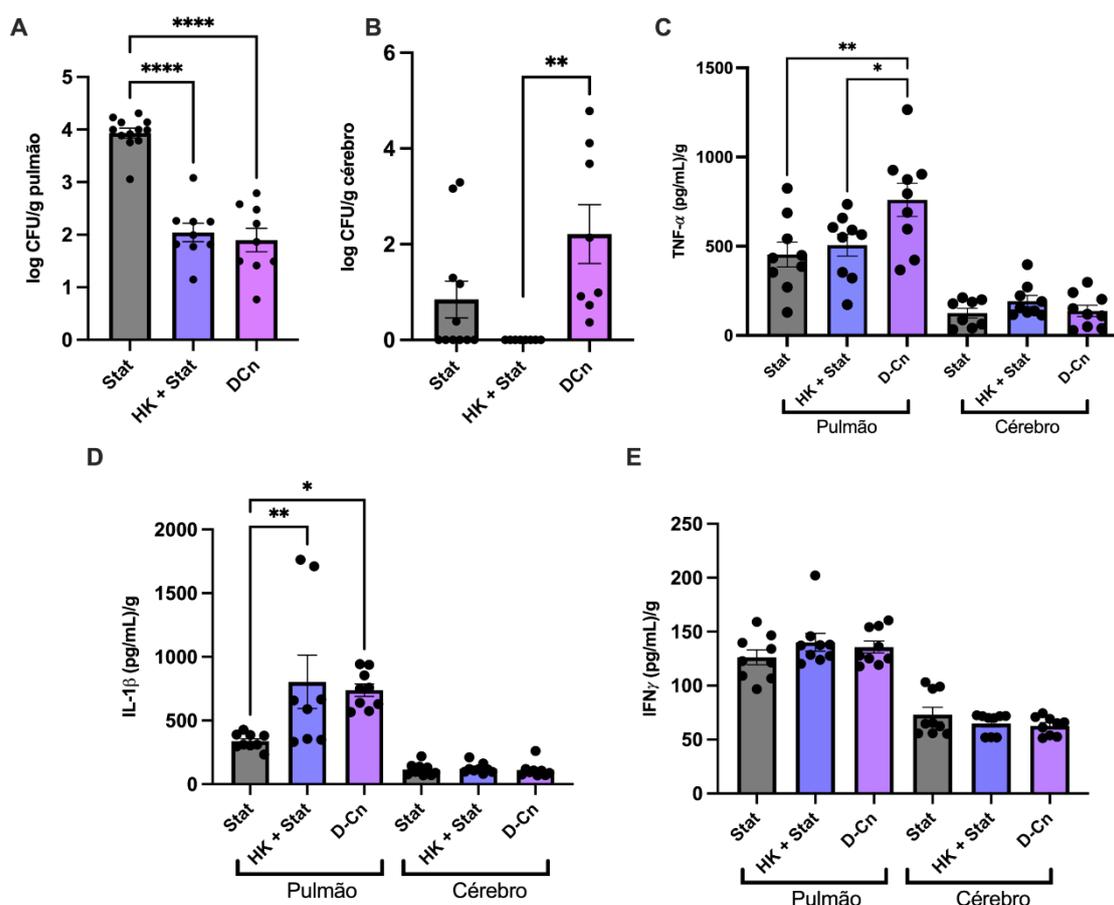


Figura 10. *C. neoformans* reativa durante migração para SNC em camundongos imunossuprimidos. Médias e SEM das cargas fúngicas pulmonares (A) e cerebrais (B) e citocinas pró-inflamatórias (C-E) de camundongos Balb/c nude infectados via intratraqueal com 1×10^5 células de *C. neoformans* Stat, HK + Stat ou DCn e eutanasiados após 14 dpi. Análise estatística do tipo one-way anova. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Valores representativos de três experimentos independentes.

Realizamos também análises histopatológicas dos pulmões e cérebros dos Balb/c nude infectados, órgãos mais afetados durante infecção criptocócica (Figura 11). Não observamos diferenças significativas nas características dos pulmões infectados, apesar de que parece haver um maior infiltrado celular nos pulmões infectados com DCn (Fig. 11C), observado pelas características mais densas na imagem, corroborando com os

dados que DCn estimula uma maior produção de quimiocinas por macrófagos infectados (Fig. 4A). Além disso, foram detectadas leveduras nas imagens dos cérebros infectados com Stat e DCn, mas não nas de HK + Stat (Fig. 11D-F), concordando com o observado nos resultados de CFU (Fig. 10B). Não foi observada a formação de granuloma nos tecidos, sendo necessária uma infecção mais prolongada para tal.

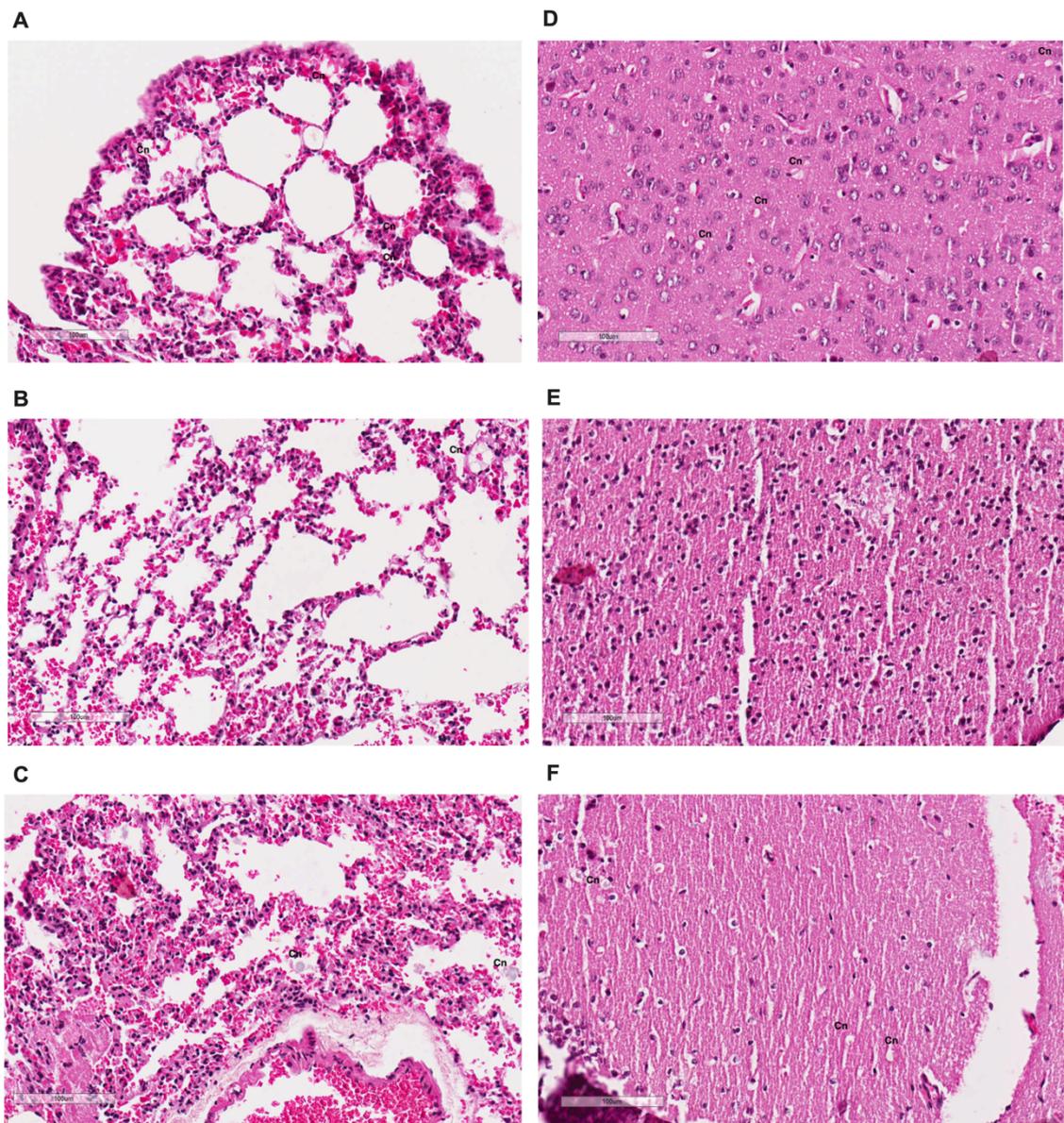


Figura 11. Infecção com *C. neoformans* não gerou alterações histopatológicas significativas nos pulmões e cérebros dependendo do estado metabólico do fungo. Imagens de lâminas histopatológicas coradas com hematoxilina-eosina de pulmões (A – C) e cérebros (D – F) de camundongos Balb/c nude infectados via intratraqueal com 1×10^5 células de *C. neoformans* Stat (A e D), HK + Stat (B e E) ou DCn (C e F) e sacrificados após 14 dpi. Cn representa a presença de *C. neoformans* no tecido.

1.5. Discussão

Foi demonstrado aqui que o fungo *C. neoformans* dormente é eficientemente reativado durante infecção *in vitro* e *in vivo* em organismos imunossuprimidos, o que provavelmente ocorre no interior de macrófagos, que os auxilia a chegar ao SNC e reestabelecer a infecção. Vimos também que esse processo é inibido pela presença da citocina IFN- γ , que impede a reativação das leveduras dormentes, provavelmente por meio do estímulo de uma resposta adaptativa efetiva do tipo Th1.

Observamos que os macrófagos são essenciais nesse processo, já que compostos e vesículas extracelulares liberadas por eles estimulam a reativação de *C. neoformans*, a qual é significativamente aumentada quando há fagocitose seguida de vomocitose de leveduras para o meio extracelular. Esse mecanismo não se repetiu em *A. castellanii*, indicando que são componentes específicos dos macrófagos que estimulam a reativação. Em bactérias da espécie *Legionella pneumophila* já havia sido constatado um comportamento contrário, em que células VBNC eram reativadas após interação com *A. castellanii*, mantendo sua virulência quando utilizadas para uma segunda infecção. Entretanto, não eram reativadas durante infecção de monócitos (Steinert, M. *et al*, 1997).

Macrófagos são a primeira linha de defesa inata ao *C. neoformans* e apresenta uma relação muito próxima com esse patógeno durante todo o período de infecção, já que este apresenta diversas estratégias para sobreviver no interior dos fagócitos (Tucker S. e Casadevall, A. 2002). Possivelmente a produção de vesículas extracelulares pelos macrófagos seja uma estratégia de defesa e sinalização para outras células circulantes, já que são uns dos principais responsáveis, junto com as células dendríticas, pela ativação do sistema imune adaptativo frente a este micro-organismo (Nelson, B. N. *et al*, 2020).

Vesículas extracelulares (EV) são estruturas lipídicas produzidas por praticamente todos os tipos celulares liberadas para o meio extracelular com diversas funções. Geralmente estão associadas com o transporte de biomoléculas como proteínas, RNAs, DNAs e lipídeos do meio intracelular para o meio extracelular, favorecendo a estabilidade e direcionamento dos compostos transportados (Wang, Y. *et al*, 2020). Essas moléculas, ao chegarem à célula alvo, podem desempenhar diversas funções, como regulação da expressão gênica ou de vias de sinalização. Em macrófagos, a produção de EVs já foi

amplamente estudada e apresenta diversas funções na mediação de processos inflamatórios, fibrose, câncer, assim como em processos infecciosos e reparação tecidual (Wang, Y. *et al*, 2020). Já foi demonstrado inclusive que macrófagos polarizados para um perfil M1 ou M2 produzem EVs com conteúdo diferenciado de miRNAs, induzindo respostas diferenciadas nas células alvo (Feinberg, M e Moore, K. 2016).

Essa diferença na produção de EVs dependente da polarização do macrófago pode ser um fator importante na reativação do *C. neoformans*. Aqui, utilizamos macrófagos diferenciados com meio condicionado de L929 e o tratamento com LPS e IFN- γ inibiu a reativação do fungo. A polarização dos macrófagos durante infecção com *C. neoformans* é extremamente importante para a progressão da doença, iniciando-se com a resposta dos macrófagos alveolares, que podem ou não levar a um quadro de pneumonia. Macrófagos polarizados para um perfil M1 estão associados a uma resposta protetora, caracterizados por uma alta produção de IFN- γ e de enzimas microbidas, incluindo NO sintase induzível (iNOS), que leva a produção de NO utilizando L-arginina como precursor (Granger, D. *et al*, 1998). Organismos saudáveis ao entrarem em contato com *C. neoformans* apresentam macrófagos com polarização M1, levando a ativação de linfócitos T CD4⁺ para um perfil Th1 protetor (Zhang, Y. *et al*, 2009).

Do contrário, a polarização M2 geralmente está presente em respostas do tipo Th2, em que há uma alta produção de IL-4 e gera macrófagos com um perfil mais anti-inflamatório, não protetor na criptococose (Zhang, Y. *et al*, 2009). Estes macrófagos não conseguem matar *C. neoformans* de forma efetiva, o que está relacionado com a redução na expressão de iNOS e aumento de arginase (Gordon S. e Martinez F. 2010). Além disso, já foi mostrado que, durante infecção, *C. neoformans* consegue modular a polarização para um perfil Th2 por meio da produção de urease, favorecendo sua sobrevivência (Osterholzer, J. *et al*, 2009).

Já havia sido demonstrado anteriormente o papel do ácido pantotênico na reativação de leveduras VBNC de *C. neoformans* (Hommel, B. *et al*, 2019). Essa molécula, conhecida popularmente como vitamina B5, é um precursor do Acetil-CoA, sendo um componente da coenzima A e da proteína transportadora de acil (ACP), componente importante para a síntese de ácidos graxos. Dessa forma, ela é importante

para a o metabolismo de ácidos graxos, carboidratos e proteínas, sendo indispensável para o funcionamento do organismo dos seres vivos, sendo obtida por meio da alimentação no caso dos mamíferos (Said, H. 2004). Além disso, o ácido pantotênico foi detectado no meio condicionado de *C. neoformans* e quando adicionado ao meio de cultivo estimulou significativamente o crescimento fúngico, o que também foi observado quando se adiciona no meio de cultivo de bactérias. Esses fatores contribuem para a hipótese de que seja uma molécula de quórum sensing (Albuquerque, A. *et al*, 2015). (Amachi, T. *et al*, 1970).

Dessa forma, o ácido pantotênico é uma molécula presente tanto no metaboloma de macrófagos quanto de micro-organismos e poderia estar sendo aproveitada para que as VBNC de *C. neoformans* reativassem seu crescimento. Nesse trabalho, consideramos a possibilidade de essa molécula estar sendo secretada no interior de EVs pelos macrófagos infectados ou em sua forma livre, em conjunto com outras moléculas secretadas. Apesar de não haver evidências na literatura da presença de ácido pantotênico em EVs de macrófagos, já havia sido descrita a presença dessa molécula em EVs produzidas por hepatócitos (Kostallari, E. *et al*, 2021). Além disso, foi observada o aumento da concentração de metabólitos em macrófagos tratados com LPS, dentre os quais também o ácido pantotênico em relação a macrófagos não tratados (Fei, F. *et al*, 2016). Isso vai de encontro à nossa hipótese, já que quando tratamos os macrófagos com LPS e IFN- γ , houve inibição da reativação. Dessa forma, são necessárias mais análises do conteúdo interno das EVs de BMDM para assegurar os componentes específicos responsáveis pela reativação.

Observamos que a reativação foi significativamente maior quando houve fagocitose seguida de vomocitose das leveduras para o meio extracelular, o que demonstra que algum componente do fagolisossomo deve ser importante para esse processo. O fato de as leveduras dormentes realizarem menos vomocitose do que as em crescimento estacionário provavelmente se dá em função da menor produção de urease que elas apresentam, já que essa é uma molécula importante no processo de exocitose de *C. neoformans* (Castro, R. 2019; Fu, M. *et al*, 2018). Durante o processo de reativação também foi observada uma maior produção de quimiocinas CCL2 e CCL4 responsáveis pela atração de outros macrófagos (Menten, P. *et al* 2002). Isso é favorável ao fungo, já

que este se mantém viável no interior dos macrófagos e os utiliza como sítio de reativação. Além disso, observamos que o DCn induziu uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias do que o fungo em crescimento estacionário nas análises *in vitro* e uma maior produção de TNF e IFN- γ nos pulmões dos camundongos infectados nas análises *in vivo*. Esses resultados demonstram uma maior capacidade do DCn em modular negativamente a resposta imune dos macrófagos, permitindo sua sobrevivência nesse local, apesar de não ser tão efetivo em modular a resposta imune sistêmica durante infecção *in vivo*.

A capacidade do *C. neoformans* em modular a resposta imune já foi relatada diversas vezes, tanto evitando seu reconhecimento por meio da cápsula, quanto por meio da secreção de enzimas que driblam os mecanismos de ação microbicidas ou mesmo alterando a produção de citocinas (Almeida, F. *et al*, 2015). Foi visto anteriormente que *C. neoformans* libera moléculas de forma livre ou no interior de EVs capazes de inibir a ativação do inflamassoma NLRP3 e dos mecanismos subsequentes associados a resposta imune inata (Bürgel, P. *et al*, 2020; Marina, C. *et al*, 2020). Além disso, *C. neoformans* inibe a produção de NO por macrófagos alveolares pré-estimulados com LPS e IFN- γ , evitando o principal mecanismo de ação responsável pela eliminação de patógenos fúngicos intracelulares (Kawakami K. *et al*, 1997). Ademais, quando entra em contato com células NK, inibe a transcrição e secreção de GM-CSF e TNF- α , responsáveis também pela ativação de macrófagos (Murphy, J. *et al*, 1997).

Também foi demonstrado anteriormente o alojamento de *C. neoformans* em nódulos subpleurais e linfonodos drenantes em autópsias de pacientes tanto imunocompetentes quanto imunossuprimidos, apresentando a hipótese segundo a qual os granulomas pulmonares são possíveis locais de alojamento e persistência do fungo *C. neoformans* (Baker, R. D., 1976). Além disso, estudos indicam que macrófagos alveolares são um importante sítio para a manutenção desses fungos no pulmão, mantendo-os protegidos do sistema imune (Goldman, D. L. *et al*, 2000; Lindell, D. M. *et al*, 2006). Em nossos resultados, embora tenhamos observado a persistência do fungo no pulmão do hospedeiro murino ao longo do tempo, não encontramos a formação de granulomas pulmonares contendo leveduras. Isso pode ser explicado pelo tempo de infecção reduzido, já que a formação de granulomas está mais associada a infecções prolongadas ou

persistentes ou devido ao modelo murino utilizado, já que ratos apresentam maior suscetibilidade ao desenvolvimento de granulomas do que camundongos (Goldman, D. *et al*, 1996).

Observamos então que as leveduras dormentes de *C. neoformans* reativam durante infecção de macrófagos na ausência de estímulos característicos de uma resposta Th1, o que ocorre no caso de organismos imunocomprometidos e que a partir daí, conseguem realizar exocitose, permitindo a migração para outras células e órgãos. Sabe-se que os macrófagos são as principais células responsáveis pela entrega de leveduras ao tecido cerebral por meio do mecanismo chamado “cavalo de Troia” (Santiago-Tirado, F. *et al*, 2017; Casadevall, A. 2010). Isso ocorre, pois as células da barreira hematoencefálica não reconhecem os macrófagos infectados como deletérios, permitindo a sua passagem.

Entretanto, este fungo também consegue migrar de forma livre no sangue, chegando ao SNC por meio dos capilares cerebrais (Shi, M. *et al*, 2010). Além disso, já foi mostrado que as leveduras conseguem cruzar a barreira hematoencefálica por meio de transcitose, em que conseguem passar entre as células do endotélio cerebral. Para isso, as leveduras expressam o gene *Filobasidiella neoformans* polissacarídeo sintase (CPS1), responsável pela produção de ácido hialurônico, essencial para a aderência das leveduras ao tecido endotelial (Jong, A. *et al*, 2008). Concordando com isso, o tecido cerebral apresenta altas taxas de inositol, o que induz uma maior expressão de CPS1 pelas leveduras, favorecendo sua entrada no tecido cerebral (Liu, T. *et al*, 2013). Ademais, também foi mostrado que a enzima fosfolipase B induz maiores taxas de transcitose em modelos sintéticos de células endoteliais (HBMEC) (Maruvada, R. *et al*, 2012).

No entanto, a forma de entrada utilizando o mecanismo “cavalo de troia” mostrou-se predominante no caso de pacientes imunodeficientes, como pacientes com AIDS. Isso foi explicado como sendo devido à maior capacidade dos macrófagos realizarem fagocitose em casos de imunossupressão, o que está relacionado com a regulação do gene *Myocilina* (MYOC). Esse gene, codifica a proteína homônima, responsável por modular o citoesqueleto de macrófagos (Li, H. *et al*. 2022). No tecido cerebral, as principais células responsáveis pelo controle de infecções são os macrófagos residentes, chamados micróglia. Essas, também são ativadas principalmente via IFN- γ e MHC-II, que induzem

uma resposta pró-inflamatória, utilizando NO como mecanismo de ação (Chen, Y. *et al*, 2022). Entretanto, o cérebro é um órgão com considerável menor número de mecanismos pró-inflamatórios do que os demais órgãos do corpo, com a maioria das linhas de defesa presentes na barreira hematoencefálica, de forma que conseguindo atravessar a barreira, o fungo consegue sobreviver e se multiplicar no tecido enfrentando menos obstáculos imunológicos (Stolp, H. B. *et al*, 2013).

Análises imuno-histoquímicas de ratos infectados com *C. neoformans* mostraram que a infecção leva a um aumento na produção de IFN- γ , GM-CSF e TGF- β , acompanhada da indução da expressão de iNOS. Tal aumento dá-se principalmente em granulomas pulmonares e atinge seu nível máximo após duas semanas de infecção e depois reduz no caso de uma infecção pulmonar persistente (Goldman, D. L. *et al*, 2000; Godman, D. L. *et al*, 1996). Além disso, já foi mostrado que camundongos deficientes no receptor de IFN- γ apresentam uma taxa de mortalidade significativamente maior do que camundongos selvagens após 5 semanas de infecção. Tal mortalidade é acompanhada por um aumento na carga fúngica nos pulmões, baço e cérebro e redução na produção de quimiocinas. Entretanto, o infiltrado celular foi significativamente maior nos camundongos KO do que nos WT (Chen, G.H. *et al*, 2005).

Em nosso trabalho não vimos diferença na carga fúngica pulmonar de camundongos imunossuprimidos deficientes na produção de iNOS ou IFN- γ após duas semanas de infecção. Da mesma forma, Chen e colaboradores não viram diferenças na carga fúngica pulmonar com esse tempo de infecção (Chen, G.H. *et al*, 2005), indicando que o mecanismo de ação dessa citocina está mais relacionado com um tempo prolongado de infecção e com a resposta adaptativa. Além disso, dentre os camundongos Δ IFN- γ , os únicos que apresentaram carga fúngica cerebral foram os infectados com DCn. Tal resultado indica que a ausência dessa citocina, assinatura da resposta Th1, deve favorecer a migração cerebral e reativação do fungo dormente, confirmando a importância dessa resposta adaptativa na proteção do hospedeiro frente à infecção criptocócica (Mukaremera, L. *et al*, 2017).

Dessa forma, há grandes diferenças quanto ao desenvolvimento da criptococose dependendo do funcionamento do sistema imune do organismo. Em pacientes

imunocompetentes, raramente há disseminação do *C. neoformans* para o cérebro, causando apenas sintomas pulmonares leves e sendo facilmente eliminados. Já em pacientes imunossuprimidos, geralmente não são registrados sintomas pulmonares e a doença só é detectada quando já está disseminada no SNC, causando meningoencefalite (Shi, M. *et al*, 2012; Dromer *et al*, 2007). Esses fatores explicam a maior migração para o tecido cerebral no caso de hospedeiros imunocomprometidos, o que está de acordo com o fato de termos detectado o aumento de carga fúngica cerebral nos camundongos deficientes em linfócitos T (nude) e nos imunossuprimidos com dexametasona.

Por fim, observou-se a retenção da virulência após a reativação do DCn, já que este colonizou o cérebro de camundongos imunodeficientes de forma eficaz, conseguindo progredir com a infecção. Isso também ocorre em espécies de bactérias, que retêm a virulência após a reativação, como é o caso da *Mycobacterium tuberculosis* (Lotoux, A. *et al*, 2022). Entretanto, alguns patógenos perdem a virulência após a reativação, como é o caso de células VBNC de *Vibrio spp*, que requerem sucessivas infecções em camundongos após a reativação para recuperarem seus mecanismos de virulência (Baffone, *et al*, 2003).

Os resultados desse capítulo mostraram então que *C. neoformans* é capaz de sobreviver no interior de macrófagos e retomar seu crescimento a partir de um estágio de infecção latente, em que o fungo mantém sua virulência. Essa reativação provavelmente é estimulada por compostos presentes no fagolisossomo do macrófago e por compostos secretados por essa célula, no interior de vesículas ou de forma livre. Além disso, foi visto que o fungo apresenta tropismo pelo SNC, onde consegue reativar e sobreviver de forma eficiente e que esse processo é inibido na presença de IFN- γ em organismos imunocompetentes. É importante ressaltar que esses dados ainda estão sendo trabalhados para uma futura publicação em artigo científico.

Capítulo 2 - Metabolismo celular e mitocondrial de macrófagos infectados *Cryptococcus neoformans* dormente

2.1 Introdução

Como visto no capítulo 1, a resposta imune ao *C. neoformans* é iniciada principalmente por macrófagos alveolares residentes, acompanhada por macrófagos e monócitos derivados. Estes, são responsáveis pela eliminação do fungo e sinalização para o sistema imune adaptativo (Baker, R. D. *et al*, 1976). Os macrófagos são células fagocíticas mononucleadas da resposta imune inata responsáveis por diversas funções de defesa do organismo contra infecções, assim como controle da homeostase tecidual e regulação de processos inflamatórios (Varol, C. *et al*, 2015). Para que desempenhem cada uma dessas funções, são necessárias modulações metabólicas específicas em seu metabolismo de glicose, ácidos graxos e aminoácidos (Luke A. *et al*, 2016).

Sabe-se que o metabolismo mitocondrial exerce funções essenciais durante diferenciação e modulação da resposta imune de macrófagos, incluindo modulações no metabolismo oxidativo, no potencial de membrana ou no ciclo do ácido cítrico (CAC). Além disso, também podem ser observadas mudanças na estrutura da mitocôndria ou liberação de ROS ou de DNA mitocondrial (Coelho, C. *et al*, 2014; Wang, Y. *et al*, 2021). Mitocôndrias são organelas celulares responsáveis pela respiração celular e geração de energia para a célula, gerando adenosina trifosfato (ATP) a partir de adenosina difosfato (ADP) e apresentam algumas características únicas dentre as organelas. Dentre essas características, destaca-se a presença de membrana com duas camadas lipídicas e material genético próprio, que é transcrito por maquinaria própria. Sua membrana interna é formada por vilosidades que contêm a cadeia transportadora de elétrons composta por cinco complexos enzimáticos e dois carreadores de elétrons: citocromo C (Cyt c) e ubiquinona (CoQ) (Figura 12) (Rose, S e Bennuri, C. 2018).

Para a conversão de ADP em ATP, as mitocôndrias realizam um processo chamado fosforilação oxidativa. O processo se inicia no citoplasma celular com a oxidação de substratos, como glicose e ácidos graxos, gerando acetil-CoA, que é levado até a matriz mitocondrial, sendo metabolizado no CAC e gerando os doadores de elétrons:

Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NADH) e Dinucleótido Flavina Adenina (FADH₂). Estes, doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, iniciando-se pelos complexos I e II respectivamente. Os elétrons são transportados até o complexo III pela CoQ e até o complexo IV pelo Cyt c, que reduz O₂ em H₂O. Durante o transporte de elétrons, os complexos bombeiam H⁺ da matriz para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico. Por sua vez, o complexo V (ATP sintase) transporta H⁺ a favor do gradiente, gerando energia para fosforilar o ADP e gerar ATP. Ao mesmo tempo, proteínas desacopladoras (UCP) permitem o fluxo de H⁺ pela membrana, funcionando como válvula de escape (Fig. 12). Muitas vezes, o processo de transporte de elétrons é incompleto, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que servem como sinalizadores celulares, mas que podem causar estresse oxidativo quando em doses altas (Rose, S e Bennuri, C. 2018).

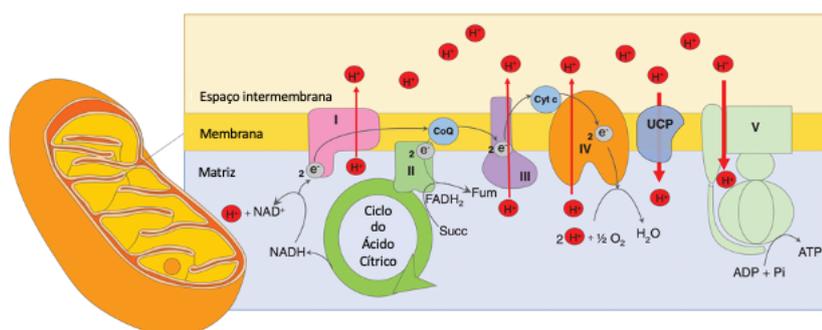


Figura 12. Figura adaptada de Rose, S e Bennuri, C. 2018. Fisiologia da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, consistindo em cinco complexos enzimáticos (I, II, III, IV e V) e dois carreadores de elétrons (citocromo C – Cyt c e ubiquinona – CoQ). Os carreadores de elétrons NADH e FADH₂ são gerados pelo Ciclo do Ácido Cítrico e doam elétrons para os complexos I e II respectivamente. Os elétrons são transportados até o complexo III pela CoQ e até o complexo IV pelo Cyt c, que reduz O₂ em H₂O. Durante o transporte de elétrons, os complexos bombeiam H⁺ da matriz para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico. Por sua vez, o complexo V (ATP sintase) transporta H⁺ a favor do gradiente, gerando energia para fosforilar o ADP e gerar ATP. Ao mesmo tempo, proteínas desacopladoras (UCP) permitem o fluxo de H⁺ pela membrana, funcionando como válvula de escape.

Além disso, alguns sinais de estresse intracelular levam à permeabilização da membrana mitocondrial, que levam ao extravasamento de proteínas tóxicas para o citosol, que são reconhecidos como sinais de danos (DAMP) pelos receptores intracelulares NLR, levando à ativação do inflamassoma NLRP3. De fato, a liberação de ROS é um dos principais responsáveis pela ativação desse inflamassoma e bloqueios nos complexos I

ou III da cadeia transportadora de elétrons causam despolarização mitocondrial acompanhada por uma maior ativação do inflamassoma NLRP3. Além disso, quando tal ativação ocorre, há uma migração do inflamassoma para a região perinuclear, colocalizando-se com mitocôndrias e retículos endoplasmáticos (Tschopp, J. 2011). Ademais, quando o inflamassoma é ativado, além de clivar pró-IL1 β , a caspase 1 cliva algumas enzimas glicolíticas como aldolase e piruvato quinase, ativando o metabolismo de glicose. Ao mesmo tempo, a ativação do inflamassoma está relacionado com a redução do metabolismo de lipídeos, induzindo uma maior formação de adipócitos e maior resistência à insulina (Tschopp, J. 2011).

Após a fagocitose, a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos é uma das principais estratégias de resposta imune inata frente a *C. neoformans*, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Essas, juntamente com as quimiocinas produzidas por células adjacentes e com o reconhecimento de antígenos endógenos ou exógenos determinam as características dos macrófagos presentes nos tecidos. Estes, estimulam variações na expressão gênica e moléculas de superfície que determinam as variações em suas funções (Varol, C. *et al*, 2015). A maioria das células imunes são derivadas de células hematopoiéticas provenientes da medula óssea que se diferenciam nas diferentes células a partir da transcrição do gene Myb. Entretanto, observou-se recentemente que alguns macrófagos presentes no fígado, epiderme e cérebro de camundongos apresentam origem embrionária e se diferenciam geneticamente e fenotipicamente daqueles provenientes da medula óssea (Luke A. *et al*, 2016). As principais quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de monócitos do sangue para o tecido infectado são CCL2 e CCL4, que convocam monócitos inflamatórios expressando altos níveis de Ly6C em sua superfície. Estes, após a entrada no tecido, se diferenciam em macrófagos inflamatórios (Carlin, L. *et al*, 2013).

Sabe-se que os macrófagos reprogramam seu metabolismo de acordo com as características do tecido, como disponibilidade de nutrientes ou reconhecimento de antígenos por meio do reconhecimento de PAMPs e DAMPs. Essas mudanças no metabolismo celular têm como objetivo principal a regulação da concentração de ATP, responsável pelo fornecimento de energia para a célula por meio da síntese de macromoléculas. Dentre essas alterações, também estão incluídas alterações na síntese

de lipídeos e nucleotídeos, expressão gênica e sinalização celular (Artyomov, M. *et al*, 2016). Tal reprogramação metabólica está diretamente relacionada com a polarização de macrófagos para um perfil inflamatório M1, caracterizado pela alta produção de citocinas pró-inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio (ROS); ou para um perfil reparador e anti-inflamatório M2, caracterizados pela produção de citocinas anti-inflamatórias e responsáveis por processos de angiogênese ou fibrose (Zhang, Y. *et al*, 2009). Os macrófagos são rotineiramente classificados como M1 quando são classicamente ativados para uma resposta microbicida ou como M2 quando são alternativamente ativados para um perfil de regulação da homeostase e reparo tecidual. Entretanto, há uma grande diversidade de fenótipos que podem ser expressos entre M1 e M2 dependendo dos estímulos apresentados pelas células do sistema imune inato ou adaptativo. Esses estímulos também regulam o imunometabolismo de formas variadas, direcionando-o para uma resposta mais efetiva para o contexto apresentado (Mosser, D. e Edwards, J. 2008; Murray, P. *et al* 2014).

Geralmente, macrófagos pró-inflamatórios se caracterizam por serem muito glicolíticos, enquanto os reparadores apresentam um maior consumo de ácidos graxos e realização de fosforilação oxidativa (Artyomov, M. *et al*, 2016). Dessa forma, macrófagos M1 apresentam uma alta taxa de consumo de glicose de forma aeróbica, associada à alta produção de ATP e biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. Além disso, há supressão da fosforilação oxidativa mitocondrial devido ao bloqueio do ciclo do ácido cítrico em dois estágios, levando ao acúmulo de citrato, que é transportado das mitocôndrias para o citosol. No citosol, o citrato pode ser convertido em malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase, o qual é utilizado na síntese de ácidos-graxos, responsável pelo remodelamento da membrana plasmática e síntese de organelas (Artyomov, M. *et al*, 2016). Ademais, o aumento de citrato no citosol está relacionado a uma maior expressão de *Acod1* (antes conhecido como *Irg1*), responsável pela expressão da enzima aconitase decarboxylase 1, que leva à produção do metabólito mitocondrial itaconato (Coelho, C. 2022).

O itaconato é um metabólito com funções antimicrobianas efetivo em concentrações milimolares, que são potencializadas em pH ácido e que estimula a formação de lisossomos a partir ativação do fator de transcrição TFEB (Michelucci, A. *et*

al 2013; Duncan D. *et al*, 2021; Zhang Z. *et al*, 2022). Esses fatores geram a hipótese de que essa molécula é liberada no fagolisossomo de macrófagos infectados e apresentam efeito sinérgico com outras moléculas antimicrobianas liberadas nesse local, levando a potencialização de seus efeitos. Apesar de não bem elucidados os mecanismos efetores microbicidas do itaconato, sabe-se que sua produção é induzida por estímulos pró-inflamatórios como LPS e IFN- γ além de moléculas provenientes de parede celular fúngica (Coelho, C. 2022). Além disso, o itaconato desempenha funções imunorregulatórias no organismo, apresentando principalmente função anti-inflamatória. Para isso, o itaconato estimula a via da pentose-fosfato, que leva a um aumento na atividade NADPH oxidase, que leva a uma maior produção de ROS, que por sua vez, aumenta a expressão do gene anti-inflamatório A20, que reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias (Zhu, X. *et al*, 2021). Dessa forma, essa molécula é extremamente importante no processo de “shift” metabólico responsável pela polarização de macrófagos.

É interessante observar também que o metabolismo energético de macrófagos varia de acordo com o órgão de origem e estímulos prévios. Ao interagir com LPS, células mieloides ativam a via da glicólise, levando a liberação de lactato. Há também uma inibição do metabolismo de carbono mitocondrial, levando ao acúmulo de metabólitos mitocondriais que regulam a expressão de enzimas glicolíticas. Esse processo leva a um aumento na síntese de lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (Van Den Bossche, J. *et al*, 2016; Tannahill, G. *et al*, 2013). Além disso, o tratamento com LPS leva a uma supressão da respiração mitocondrial, o que pode significar uma quebra no CAC. Curiosamente, ao tratar macrófagos peritoneais com LPS, observa-se um aumento de fosforilação oxidativa mitocondrial, ao contrário do observado com os macrófagos derivados de medula óssea. Isso indica que o CAC e a cadeia fosforilativa são desacopladas nesses macrófagos e que macrófagos derivados de órgãos diferentes apresentam diferentes respostas metabólicas a estímulos. Além disso, macrófagos derivados de medula apresentam uma homogeneidade maior, por terem sua diferenciação induzida *in vitro*, com estímulos controlados, enquanto macrófagos peritoneais apresentam um conjunto de macrófagos e monócitos com características variadas, incluindo macrófagos M1 e M2 (Artyomov, M. *et al*, 2016).

Além disso, já foi mostrado que durante polarização para M2, macrófagos aumentam a síntese de poliaminas, o metabolismo de ferro e a oxidação de ácidos graxos. Esses fatores estão associados a um aumento do catabolismo de glutamina, já que a privação desse aminoácido ou inibição da N-glicosilação reduz a polarização M2 e a produção de quimiocina CCL22. Ademais, durante polarização para M1, observou-se uma redução da atividade da enzima Idh, responsável pela conversão de isocitrato em α -cetoglutarato, representando o ponto de fragmentação do CAC. Esse ponto de parada é responsável pelo aumento da produção de itaconato durante polarização dos macrófagos para um perfil pró-inflamatório M1 (Jha, A. *et al*, 2015).

Dessa forma, o reconhecimento de antígenos provenientes de patógenos também geram diferentes respostas inflamatórias e mudanças metabólicas nas células imunes. Assim, após o reconhecimento de PAMPs, há uma reprogramação do metabolismo celular de macrófagos e células dendríticas, sendo necessária a ativação de vias alternativas para obtenção de glicose, o que fornece uma maior disponibilidade energética para que essas células consigam realizar suas funções inflamatórias e microbicidas (O'Neill, L.A. *et al*, 2016). Tal regulação metabólica ainda não é bem descrita em relação à resposta a infecções fúngicas. Entretanto, estudos anteriores mostraram que macrófagos infectados com *Aspergillus fumigatus* têm seu metabolismo de glicose aumentado por meio da ligação da melanina fúngica ao cálcio intracelular, bloqueando a sinalização via calmodulina e induzindo a via da glicólise e o fator indutor de hipóxia 1 (HIF1- α) (Gonçalves, S. *et al*, 2020).

De forma semelhante ao observado com *A. fumigatus*, dados de sequenciamento de RNA (RNAseq) obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram que macrófagos infectados com *C. neoformans* em estágio de crescimento estacionário, exponencial ou em estado dormente apresentaram uma expressão diferenciada de genes relacionados ao metabolismo celular (Figura 13). As formas estacionária ou exponencial do fungo induziram a expressão de um maior número de genes envolvidos na resposta inflamatória, enquanto alguns genes foram induzidos apenas pela forma dormente, como aqueles relacionados positivamente ao sequestro de triglicerídeos, síntese de óxido nítrico, quimiotaxia de macrófagos e hidrólise de ATP associada ao transporte de prótons.

A indução da expressão de genes responsáveis pela atração de macrófagos corrobora com o aumento de quimiocinas detectados por ELISA no capítulo 1, responsáveis também pela quimiotaxia de monócitos circulantes (Fig. 4). Ademais, os genes alterados sugerem a capacidade do DCn em modular as características do macrófago ao seu favor, favorecendo a permanência intracelular da levedura e permitindo a manutenção de sua forma latente até que o ambiente esteja favorável para sua reativação e proliferação. Considerando tais resultados preliminares, analisamos fenotipicamente como o metabolismo dos macrófagos é regulado durante a infecção com os diferentes estados fisiológicos de *C. neoformans*, incluindo o fungo após indução de dormência *in vitro*.

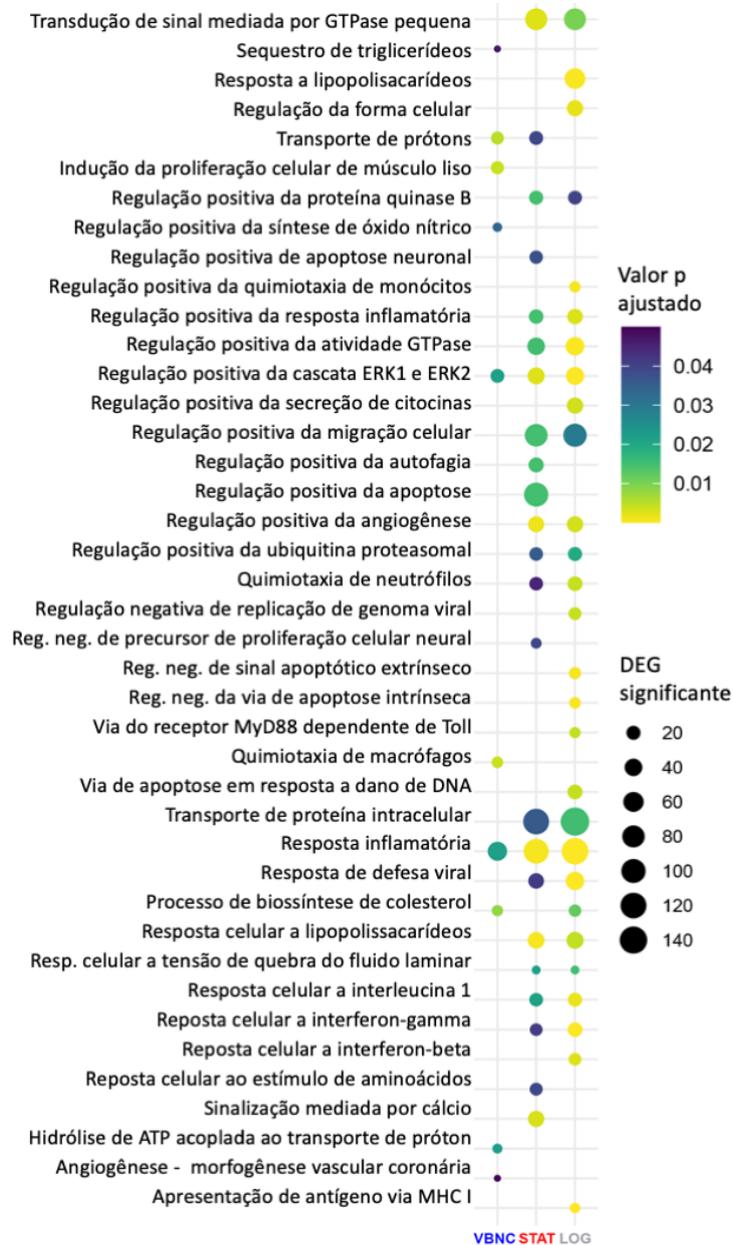


Figura 13. Análise de ontologia gênica para identificação de processos biológicos de genes diferencialmente expressos no macrófago desafiado com *C. neoformans* dormente (VBNC), em crescimento estacionário (STAT) ou logarítmico (LOG) por 6h analisados a partir dos dados de RNA-seq dos macrófagos infectados. Figura adaptada de Castro, 2019.

2.2 Objetivos

2.2.1 Geral:

- Analisar o metabolismo celular de macrófagos infectados com *C. neoformans* dormente (Ensaio realizado no MRC CMM – Universidade de Exeter, Reino Unido, sob supervisão da professora Dra. Carolina Coelho).

2.2.2 Específicos:

- Análise do perfil mitocondrial dos macrófagos infectados;
- Análise do metabolismo mitocondrial e energético por meio dos equipamentos Oroboros e Seahorse;
- Análise da expressão dos genes relacionados ao metabolismo de glicose e ácidos graxos;

2.3 Metodologia

2.3.1 Cultivo fúngico:

O fungo utilizado neste trabalho foi o *C. neoformans* H990 (variação *grubii*), gentilmente cedido pelo professor Arturo Casadevall e o mutante B-4551FOA (*ura5Δ*), deficiente em uracila, no qual era utilizado um meio de cultivo suplementado com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de uracila. Ambos eram mantidos armazenados em freezer -80°C com meio YPD e 30% de glicerol. Na semana anterior a cada experimento, uma alíquota era descongelada e plaqueada em meio YPD ágar (15g/L) e incubada por 3 dias a 30°C . Após os 3 dias, com auxílio de uma alça era feita uma raspagem da placa de uma região com várias colônias a fim de manter o fenótipo da população fúngica e esse agregado era inoculado em frasco ventilado com 10 mL de YPD líquido por 22h em agitação de 150 RPM a 30°C . Após esse tempo o fungo atingia a fase de crescimento estacionário (Stat1), era contado em hemocitômetro para ser usado nos experimento. Como controle em alguns experimentos também utilizamos o fungo morto por calor (heat killed - HK), submetendo-o a aquecimento por 1h a 75°C . A indução de dormência foi realizada da mesma forma descrita na metodologia do capítulo 1 (item 1.3.2).

2.3.2 Infecção dos macrófagos

Após a diferenciação dos macrófagos derivados de medula realizada como descrito no capítulo 1 (item 1.3.3), 1×10^6 células/mL foram plaqueadas em RPMI com 10% de SFB e ficaram descansando de 18h a 24h a 37°C e 5% de CO_2 para aderência dos macrófagos. No caso da análise de despolarização mitocondrial foram feitos grupos pré-tratados com LPS (500 ng/mL) e $\text{IFN}\gamma$ (50 ng/mL). Após as 24h de aderência dos macrófagos e pré-ativação, foram adicionados os fungos (MOI 5) diluídos e previamente opsonizados com 18B7 anti-GXM (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 minutos e as análises foram feitas após 24h de infecção.

2.3.3. Análises por citometria de fluxo

Para análise da despolarização mitocondrial, 1h antes do fim do experimento foi adicionado tetramethylrhodamine-methyl-ester-perchlorate (TMRM – ThermoFisher) na concentração de 400 ng/mL e 15 minutos antes do fim do experimento foi adicionado CCCP1 (50 μM) em um dos grupos experimentais como controle de despolarização. Para

análise da produção ROS e quantificação mitocondrial, 30 minutos antes do fim do experimento foi adicionado CellroX green (Invitrogen) na concentração de 5 μ M e mitotracker green na concentração de 50 nM e a placa foi mantida a 37 °C.

Para quantificação da captação de ácidos graxos, 1h antes do fim do experimento o meio do sobrenadante celular foi trocado por meio sem SFB e foi adicionado BODIPY FL C16 (25 ng/ml). Para a quantificação da captação de glicose, o meio foi trocado por PBS e foi adicionado 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2NBDG) (50 μ M) (ambos da ThermoFisher), um análogo da glicose, e a placa foi mantida a 37 °C.

Após o fim do experimento, as células foram lavadas com meio aquecido e coletadas utilizando PBS com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (10 mM) e lidocaína (4 mg/mL) gelado. As células foram então lavadas e ressuspensas em Anti-Mouse CD16/CD32 (Fc Block - BD Biosciences) (4 μ L/mL em PBS com EDTA 2mM) e ficaram em repouso no gelo por 15 minutos. Foi feita então marcação por mais 15 minutos com CD45-APC anti-mouse (Biolegend) para marcar os macrófagos e Live-dead (Zombie Nir – BioLegend) para identificar as células vivas. As células então foram analisadas em citômetro de fluxo (Accuri C6 plus – Universidade de Exeter).

2.3.4. Análises de oximetria em equipamento Oroboros

Para análises de oximetria, os macrófagos diferenciados foram plaqueados em placas de petri bipartidas na densidade de 1×10^6 células/mL de RPMI com 10% de SFB (5 mL por poço) e permaneceram em repouso por 24h. No dia seguinte, as células foram infectadas com *C. neoformans* DCn, Stat ou HK + Stat previamente opsonizados com 18B7 anti-GXM (10 μ g/mL) por 30 minutos. Após 24h de interação a 37 °C e 5% de CO₂, as células foram coletadas utilizando TrypLE™ Express, lavadas, ressuspensas em meio RPMI sem SFB e contadas. Foram analisadas na densidade de 1×10^6 células/mL no equipamento Oroboros pela dra. Paula Bellozi sob supervisão da prof. dra. Andreza de Bem (Laboratório de Bioenergética e Metabolismo – UnB). Para inibição dos complexos mitocondriais foram utilizadas as drogas oligomicina (1 μ g/mL) para inibição da ATP-sintase, Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP - 13 μ M) para desregulação do gradiente de prótons, rotenona (1 μ M) e antimicina A (1 μ M) para inibição dos complexos

1 e 3 respectivamente (52-Gnaiger, E. 2020). Com a inibição dos complexos mitocondriais um a um é possível notar variações no metabolismo mitocondrial em função das condições celulares analisadas, no caso a infecção com diferentes condições do *C. neoformans*.

2.3.5. Análises de oximetria em equipamento Seahorse

Para obtenção de um resultado mais detalhado, também realizamos a oximetria dos macrófagos infectados utilizando o Seahorse (Agilent) com auxílio da dra. Ana Miguel Cruz, orientada pelo Dr. Craig Beall e supervisão da dra. Carolina Coelho (MRC CMM, Exeter - UK). Neste equipamento, a análise é realizada em placa, permitindo que os macrófagos permaneçam aderidos durante o experimento, que é mais semelhante ao seu estado fisiológico. Além disso, a placa permite que vários poços com várias condições sejam analisados ao mesmo tempo, enquanto no Oroboros são realizadas apenas duas análises por vez em câmeras onde as células ficam em suspensão, sob agitação.

Para esse experimento, após prévia titulação, macrófagos diferenciados foram plaqueados na densidade de $7,5 \times 10^4$ células por poço de uma placa de 96 poços XF96 (Agilent) com 80 μ L de meio completo para diferenciação de macrófagos e mantida a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24h, foi feita a infecção com as leveduras (MOI 2) previamente osonizadas com 18B7 e a placa foi incubada por mais 24h. No dia seguinte, as células foram lavadas com meio aquecido e foi adicionado meio XF Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM -Agilent) suplementado com glicose (10 mM), glutamina (2mM) e piruvato (1mM) e a placa foi incubada por 1h a 37 °C sem CO₂, quando então a placa foi analisada no equipamento. Os inibidores utilizados foram: oligomicina (1 μ M), FCCP (1,5 μ M) e rotenona e antimicina (0,5 μ M) (kit Mitostress – Agilent). As concentrações celulares e de drogas foram selecionadas após titulação.

Para análise do metabolismo energético, as células foram preparadas da mesma forma, mas foi utilizado o kit Mitofuel (Agilent), o qual utilizam-se os inibidores UK5099, que bloqueia a entrada de piruvato na célula e conseqüentemente a glicólise; etomoxir, que bloqueia a entrada de palmitato e conseqüentemente o ciclo do ácido cítrico e o metabolismo de ácidos graxos; e o BPTES, que bloqueia a entrada de glutamato na célula, interferindo no metabolismo de glutamina. A capacidade de utilizar a molécula

como combustível ou a dependência daquela molécula foram calculados segundo mostrado na Figura 14. Para determinação da dependência do uso de glutamina, usa-se primeiro o inibidor de glutaminase II, BPTES, que bloqueia a entrada de glutamato na célula e posteriormente, usa-se os outros dois inibidores UK5099 e o etomoxir. Dessa forma, o quanto o consumo de O₂ (OCR) reduz ao inibir os metabolismos representa a importância dessas moléculas para a célula analisada. Para análise da capacidade de utilizar a glutamina, usa-se primeiro os outros dois inibidores e por último o BPTES, permitindo observar como a célula reage tendo apenas glutamina como fonte de energia. O mesmo é realizado para os outros dois combustíveis: Para análise da dependência de glicose, usa-se primeiro UK5099 e depois BPTES e etomoxir e para a capacidade, usa-se primeiro BPTES e etomoxir e depois UK5099; Para a análise da dependência de ácidos graxos, usa-se primeiro etomoxir e depois UK5099 e BPTES e para a capacidade, usa-se primeiro UK5099 e BPTES e por último etomoxir.

Após a análise de Mitostress ou Mitofuel, as células eram lisadas com NaOH (1mM) e a concentração proteica era dosada utilizando solução de Bradford segundo instruções do fabricante (Bio-Rad) para normalização do número de células.

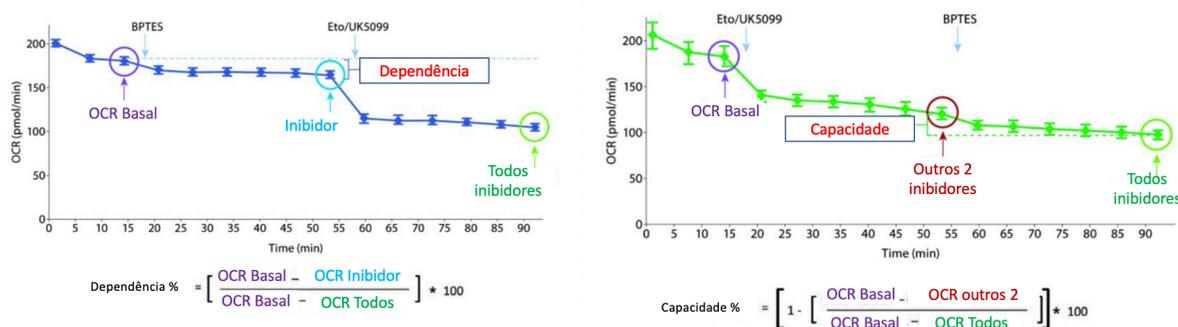


Figura 14. Cálculo para determinação dos valores de Dependência ou Capacidade de utilização de glutamina pela célula analisada. Para determinação da dependência do uso de glutamina, usa-se primeiro o inibidor de glutaminase II, BPTES, que bloqueia a entrada de glutamato na célula e posteriormente, usa-se os outros dois inibidores UK5099, bloqueador de glicólise e o etomoxir que bloqueia o metabolismo de ácidos graxos. Dessa forma, o quanto o consumo de O₂ (OCR) reduz ao inibir os metabolismos representa a importância dessas moléculas para a célula analisada. Para análise da capacidade de utilizar o metabólito, usa-se primeiro os outros dois inibidores e por último o inibidor de glutamina, permitindo observar como a célula reage tendo apenas glutamina como fonte de energia. O mesmo é realizado para os outros dois combustíveis. Figura retirada do manual de utilização do kit Mitofuel (Agilent).

2.3.6. Análise da expressão gênica

Para análise da expressão gênica dos macrófagos infectados com DCn, macrófagos BMDM foram plaqueados em placa de 6 poços na densidade de 1×10^6 /mL e incubados a 37°C e 5% de CO₂ por 24h. No dia seguinte, foram infectados em MOI 5 com *C. neoformans* DCn; HK +1% Stat; ou Stat opsonizados com 18B7 (10 µg/mL). Após 24h, as células foram lavadas com meio RPMI aquecido e lisadas com 1 mL de Tryzol por triplicata. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio e homogeneizado para separação do RNA do Tryzol e centrifugado a 12.000 g, por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, em que foi adicionado 500 µL de isopropanol para precipitação do RNA, homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 ° C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado novamente e ressuscitado em 30 µL de água livre de RNase. O RNA foi quantificado em nanofotômetro NanoPhotometer P330 (IMPLEN) e sua integridade foi analisada por meio de gel de agarose (Figura 21A). O RNA foi então convertido em DNA cíclico (cDNA) por meio do kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi então amplificado e quantificado por meio de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR) em tempo real em equipamento StepOne (Applied Biosystems) utilizando os primers de genes de *mus musculus* relacionados ao metabolismo celular discriminados na Tabela 1 e o marcador Sybr green em mastermix (Promega), segundo as recomendações do fabricante.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para quantificação da expressão gênica de macrófagos infectados com *C. neoformans* por RT-qPCR

Gene	Proteína	Sequência 5' - 3'
NM_Eno1_For	Enolase1	gggtggattcgcacctaac
NM_Eno1_Rev	Enolase1	atccatgccaatgacaacct
NM_slc2a6_For	Carreador de soluto da família 2, membro 6	aggatgctgacgggcttt
NM_slc2a6_Rev	Carreador de soluto da família 2, membro 6	gggtgcaatctcagacacg
NM_Slc2a1_For	Carreador de soluto da família 2, membro 1	gtcggcctctttgtaatcg

NM_Slc2a1_Rev	Carreador de soluto da família 2, membro 1	ttggagaagcccataagcac
NM_HK2_1_For	Hexoquinase 2	ttcacettctccttccttg
NM_HK2_1_Rev	Hexoquinase 2	ccctttgtccacttgaggag
NM_Echdc3_For	Domínio contendo enoil coenzima A hidratase 3	atacaggggaggggaacgact
NM_Echdc3_Rev	Domínio contendo enoil coenzima A hidratase 3	gtatgggcagcacctcactt

2.4. Resultados

2.4.1. C. neoformans dormente não causa despolarização mitocondrial em macrófagos derivados de medula nem altera a produção de espécies reativas de oxigênio ou a quantificação mitocondrial celular

Considerando a importância da mitocôndria no desenvolvimento de diversos mecanismos de defesa celular, avaliamos a influência da infecção com células dormentes de *C. neoformans* (DCn) na despolarização mitocondrial de macrófagos. Para isso, analisamos em citômetro de fluxo a fluorescência de células marcadas com TMRM após a infecção por 24h. Para isso, utilizamos macrófagos derivados de medula (BMDMs), mas também realizamos ensaios pilotos com macrófagos de linhagem J774 e macrófagos isolados de lavado bronquioalveolar (BAL), considerando que J774 é mais responsiva a despolarização mitocondrial do que BMDM (Coelho, C. *et al*, 2015). Além disso, sabe-se que a infecção pulmonar por *C. neoformans* se inicia em macrófagos alveolares (Baker, R. D. *et al*, 1976), os quais devem ser importantes para a incubação do DCn e para sua reativação e migração para outros órgãos.

Como esperado, tanto a infecção com *C. neoformans* em crescimento estacionário como o tratamento com LPS e IFN- γ induziram uma despolarização, observada pela redução na mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de TMRM (Figura 15B). No entanto, o DCn e o controle HK + 1% Stat não interferiram na polarização mitocondrial, sendo um indicativo de como o DCn pode se manter silencioso no interior dos macrófagos, sem causar sua ativação tanto quanto o estacionário. Além disso, aparentemente houve uma pequena despolarização mitocondrial induzida pela forma estacionária e dormente nas células J774 (Fig. 15C) e por todas as formas fúngicas nos macrófagos BAL (Fig.15D). Entretanto, são necessárias mais replicatas biológicas para a condução da análise estatística e confirmação da influência da infecção nessas células.

Além disso, avaliamos a produção de ROS (Fig. 15E) e quantificação mitocondrial (Fig. 15F) nos macrófagos infectados ou não e não encontramos diferenças entre os grupos. Entretanto, o grupo infectado com DCn se comportou de forma mais semelhante ao grupo não infectado, apresentando uma média menor na quantidade de mitocôndrias e um menor desvio padrão. Tal resultado era esperado, já que a infecção de

macrófagos com *C. neoformans* não altera significativamente a produção de ROS (Coelho, *C. et al*, 2015), indicando que a forma dormente conservou essa estratégia para se manter silenciosa no meio intracelular.

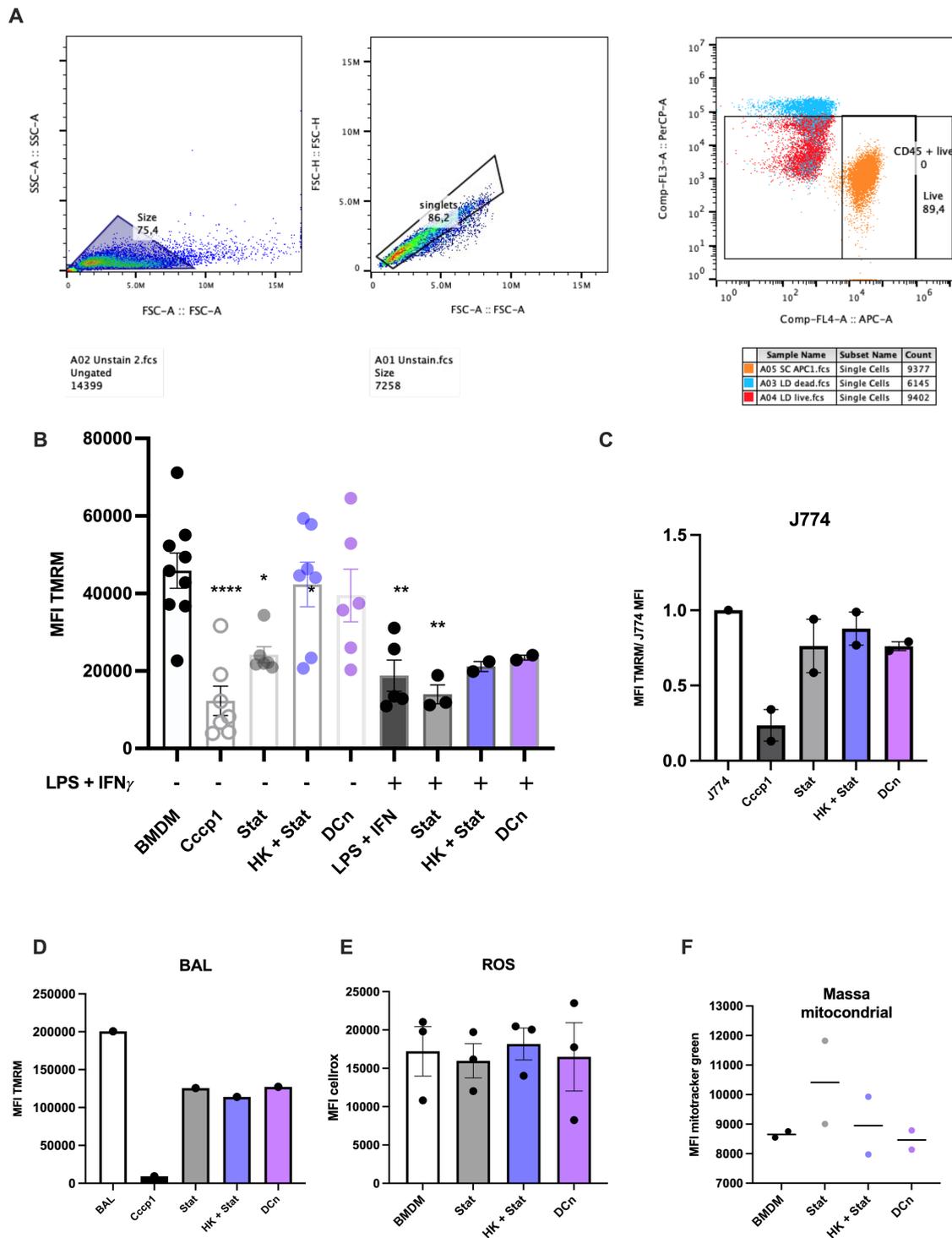


Figura 15. *C. neoformans* dormiente não causa despolarização mitocondrial em macrófagos infectados. Estratégia de “gate” para separação das células marcadas com CD45-APC e Zombie-NIR (Live-dead) (A). Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de TMRM (B - D), CellroX green (E) ou mitotracker green (F) em macrófagos BMDM (A, D e E), J774 (C) ou derivados de lavado broncoalveolar (BAL) (D) infectados com *C. neoformans* stat, HK + stat ou DCn. Em (B), células também tratadas com LPS (500 ng/mL) e IFN- γ (50 ng/mL) e CCCP1 (50 μ M) adicionado 15 minutos antes do fim do experimento. Análise estatística do tipo one-way anova, em que * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo BMDM. Figura A é representativa de três experimentos independentes.

2.4.2. *C. neoformans* dormiente não altera significativamente o metabolismo mitocondrial de macrófagos infectados

Análises do metabolismo mitocondrial de macrófagos infectados com *C. neoformans* DCn ou seu controle negativo (HK + 1% Stat) por oximetria, realizadas no equipamento Oroboros, mostraram que o DCn não induziu mudanças significativas no perfil respiratório mitocondrial destas células (Figura 16). Testamos a análise utilizando a infecção com o controle positivo em crescimento estacionário (Stat), porém este inóculo, uma vez que retoma o crescimento, possui um metabolismo energético extremamente alto e quando analisado juntamente com os macrófagos, o fungo camufla a respiração dos macrófagos e as drogas utilizadas nas concentrações previamente tituladas para os macrófagos são insuficientes para inibir a respiração fúngica. Por esse motivo, decidimos analisar somente a influência do DCn e do HK + 1% Stat na respiração mitocondrial.

É possível observar na Fig. 16A e 16B que o controle HK + 1% Stat induz um aumento significativo na respiração basal desses macrófagos, ou seja, na respiração basal 24h após infecção. Tal resultado pode estar relacionado à maior resposta inflamatória induzida por HK+1% Stat, como já mostrado no capítulo 1, já que as leveduras mortas não apresentam capacidade imunoregulatória como as vivas. Apesar disso, nenhum dos dois fungos induziu mudanças significativas na liberação de H^+ (Fig. 16C) ou na produção de ATP (Fig. 16F), calculados pela redução da respiração ao máximo quando se adiciona oligomicina, um inibidor da ATP sintase que causa um extravasamento de H^+ subutilizados na cadeia fosforilativa. Também não houve alteração na respiração máxima mitocondrial (Fig. 16D) induzida pela adição de CCCP no sistema, um desacoplador do transportador de prótons na cadeia transportadora de elétrons.

Além disso, não houve alteração no consumo de O₂ residual (Fig. 16E), quantificado após a inibição dos complexos 1 e 3 mitocondriais pelas drogas rotenona e antimicina, que causam o colapso da cadeia transportadora. Essa inibição permite a dosagem do consumo de O₂ não mitocondrial, derivado de fenômenos oxidativos em outras organelas, podendo estar relacionado também a produção de ROS. Por fim, não houve mudança na capacidade respiratória de reserva (Fig. 16G), calculada a partir dos valores de respiração máxima menos a basal, ou na capacidade de acoplamento entre o fluxo de O₂ e a produção de ATP, calculada por meio da fórmula: [respiração máxima (E) – liberação de H⁺ (L)]/E. Dessa forma, a infecção com *C. neoformans* DCn não alterou o metabolismo energético mitocondrial de forma significativa, indicando mais uma vez a capacidade desta forma fúngica se manter silenciosa no interior celular, modulando negativamente a ativação do macrófago.

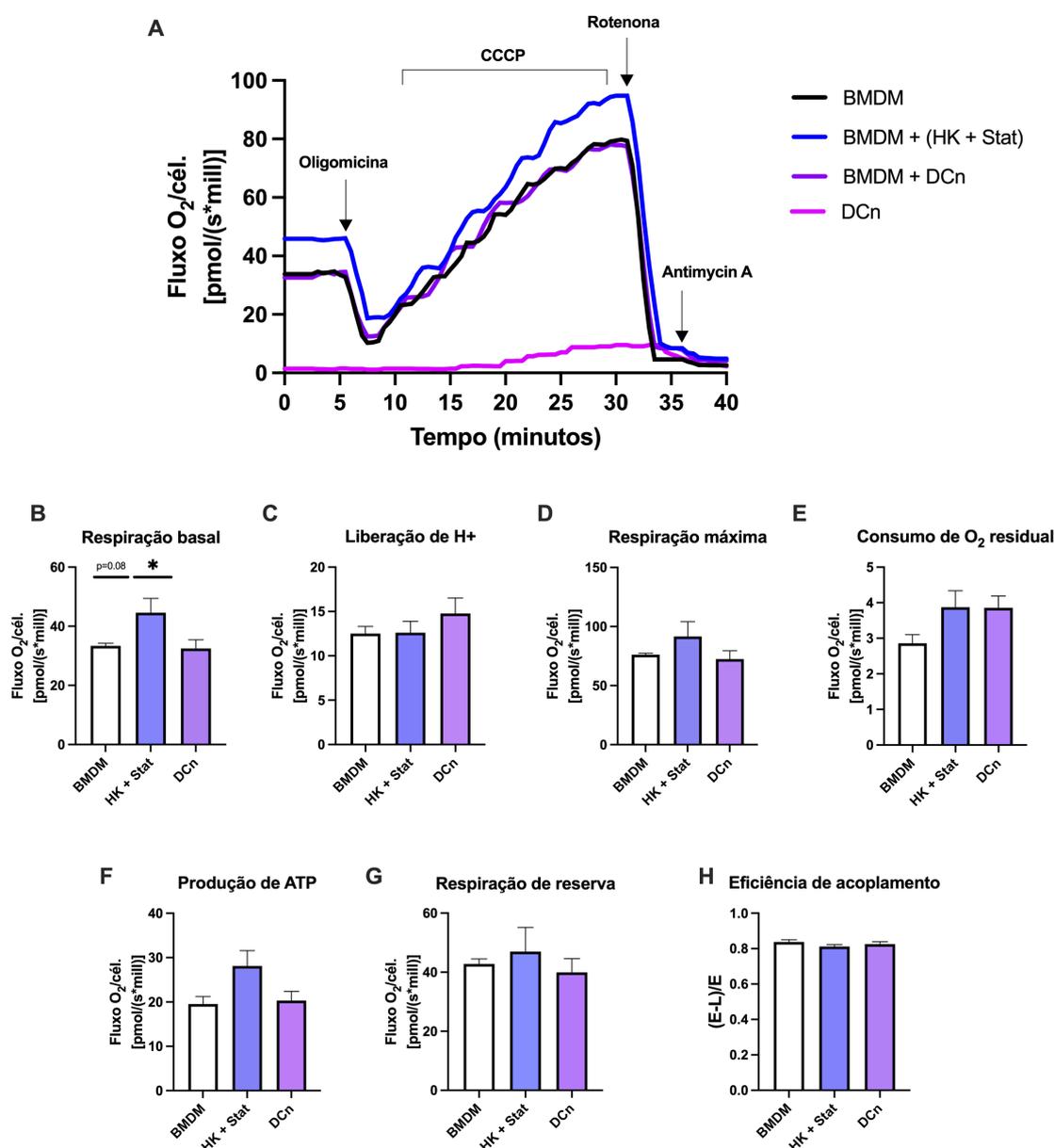


Figura 16. *C. neoformans* dormente não altera significativamente o perfil respiratório de macrófagos infectados. Perfil respiratório de macrófagos por milhão de células (BMDM) infectados com HK + 1% Stat (HK + Stat) ou DCn (MOI 2) por 24h a 37°C (A) e análises derivadas dos valores detectados de consumo de O_2 (Oroboros). Análise estatística do tipo one-way anova. * $p < 0,05$; Valores representativos de três experimentos independentes. E representa capacidade máxima respiratória e L, liberação de prótons.

A fim de obter um resultado mais abrangente acerca do metabolismo mitocondrial, que permitisse a análise de várias condições concomitantemente e em uma condição mais parecida com o estado fisiológico do macrófago, realizamos a análise também no equipamento Seahorse (Agilent). Primeiramente, realizamos a titulação da densidade celular necessária para obter uma detecção significativa do consumo de O_2 pelo

equipamento (Figura 17A) e decidimos utilizar a densidade celular mais alta testada ($7,5 \times 10^4$ células/poço). Também realizamos a titulação da concentração necessária de inibidores para induzir primeiro uma respiração máxima seguida por uma mínima (Fig. 17A) e vimos que era efetivo utilizar $1 \mu\text{M}$ de oligomicina e $1,5 \mu\text{M}$ de FCCP.

Tentamos então realizar a análise da infecção com leveduras *C. neoformans* Stat e notamos mais uma vez que este fungo retoma rapidamente uma alta taxa metabólica e camufla a respiração do fagócito, mesmo em concentrações muito baixas, enquanto o DCn apresenta consumo de O_2 próximo a zero, não interferindo na detecção da taxa de consumo do macrófago (Fig. 17B). Como forma de utilizar o controle positivo Stat na análise apesar dos desafios encontrados, testamos adicionar o antifúngico anfotericina B ($0,5 \mu\text{g/mL}$) (Nosanchuk, J. D. *et al*, 1999) 2h antes da análise para matar o fungo e consequentemente inibir a respiração do patógeno (Fig. 17C). O tratamento foi bem-sucedido no quesito de inibir a respiração fúngica, mas perturbou o metabolismo dos macrófagos, inibindo seu consumo de O_2 e a resposta aos inibidores mitocondriais.

Outra estratégia foi a utilização do mutante *ura5 Δ* , o qual é auxotrófico para uracila e necessita da suplementação do meio com $50 \mu\text{g/mL}$ desta base nitrogenada para que se replique. Dessa forma, a ausência de uracila reduz a respiração fúngica, permitindo a análise de oximetria dos macrófagos infectados, o utilizado meio suplementado durante as 24h de infecção e, uma hora antes da análise, o meio era substituído por meio XF DMEM sem uracila (Fig. 17C). Tal estratégia foi eficaz, já que o consumo de O_2 pelo *ura5 Δ* foi muito menor do que fungo wild-type e do que o consumo dos macrófagos não infectados, permitindo analisar separadamente a respiração de cada um dos tipos celulares.

Para justificar a possibilidade de utilizar o *ura5 Δ* em detrimento do H990, confirmamos que o crescimento intracelular dos dois fungos durante a infecção dos macrófagos é equivalente (Fig. 17D). Já que o *ura5 Δ* apresenta uma proliferação extracelular significativamente menor que a estirpe H990 em meio suplementado (Fig. 17D), o uso de *ura5 Δ* facilita a lavagem e retirada da maioria das leveduras extracelulares antes das análises no Seahorse, gerando uma menor interferência na análise, e permitindo estudar a resposta de macrófago infectado. Entretanto, entendemos que esse mutante não

é perfeito para a análise, já que possui uma respiração residual mesmo na ausência de uracila e seguimos buscando um mutante que permita manipular mais a respiração mitocondrial. Dessa forma, consideramos pertinente a utilização do *ura5Δ* como estratégia para estudar a influência de um *C. neoformans* Stat no metabolismo energético mitocondrial do macrófago infectado enquanto desenvolvemos um mutante ideal. Além disso, não foi possível a adequação do protocolo de indução de dormência para o *ura5Δ*, impossibilitando o uso da mesma estirpe para todas as análises de oximetria.

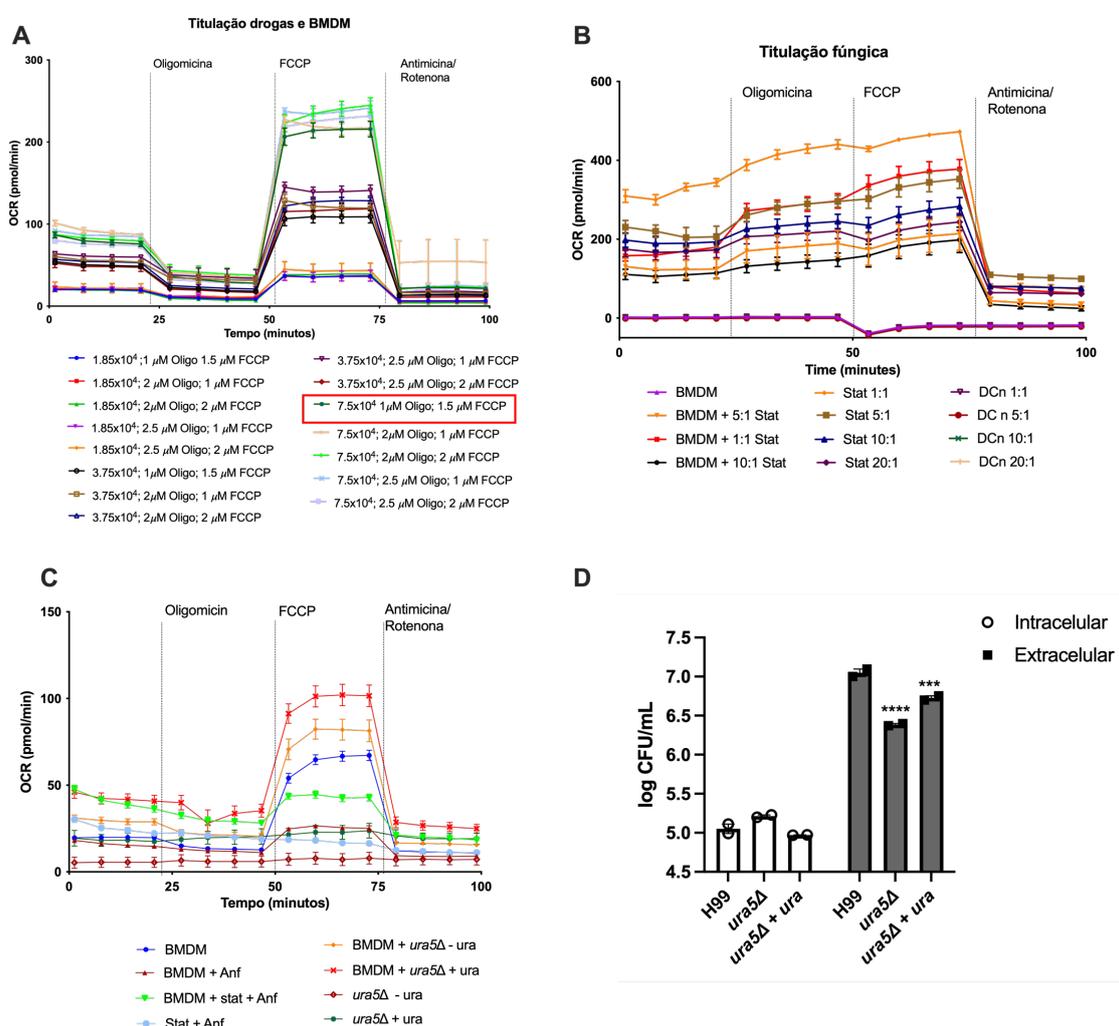


Figura 17. *C. neoformans* dormente não altera significativamente o perfil respiratório de macrófagos infectados. Consumo de O₂ mitocondrial medido durante a titulação da densidade celular de macrófagos (BMDM) e de drogas utilizadas para inibir os complexos da cadeia transportadora de elétrons destas células (A). Consumo de O₂ mitocondrial medido durante a titulação da densidade de fungos em crescimento estacionário (Stat) ou dormente (DCn) ao infectar ou não BMDM (B). Consumo de O₂ mitocondrial de BMDM infectados com Stat e tratados com 0,5 μg/mL de anfotericina B (Anf) ou infectados com o mutante *ura5Δ* e suplementado ou não com 50 μg/mL de uracila (ura) durante as 24h de infecção (C). Quantificação de unidades formadoras de colônias (CFU) fúngicas intracelular ou extracelular de *C. neoformans* H99 ou

ura5Δ após a infecção de BM (MOI 2) por 24h (D). Análise estatística do tipo two-way anova * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao H99.

Após a realização das análises do consumo de O_2 pelos macrófagos infectados, notamos mais uma vez um aumento na respiração basal induzida pela infecção o com HK + 1% Stat (Figura 18A e C), assim como um aumento na liberação de prótons (Fig. 18D) e na produção de ATP (Fig. 18G), que havia parecido aumentar nas análises no Oroboros, apesar de não apresentar valores significativos (Fig. 16F). Em contrapartida, o *ura5Δ* em crescimento estacionário induziu um aumento significativo na liberação de H^+ (Fig. 18D) e na respiração não mitocondrial (Fig. 18F), o que pode estar indicando adaptação dos macrófagos ou ser derivado do *Δura5* se manter parcialmente ativo ainda que na ausência da suplementação com uracila, mantendo uma respiração não mitocondrial. Esta diferença requer o uso de um controle preciso de respiração de *C. neoformans*, via mutantes, ou futuros desenvolvimentos técnicos que diferenciem respiração apenas de macrófagos. Já o DCn, apenas induziu um pequeno aumento na liberação de H^+ (Fig. 18D). Entretanto, todos os fungos induziram um aumento significativo ($p < 0,01$) na acidificação extracelular do meio (ECAR) (Fig. 18B), indicando a realização de glicólise aeróbica pelos macrófagos infectados (Gnaiger, E. 2020).

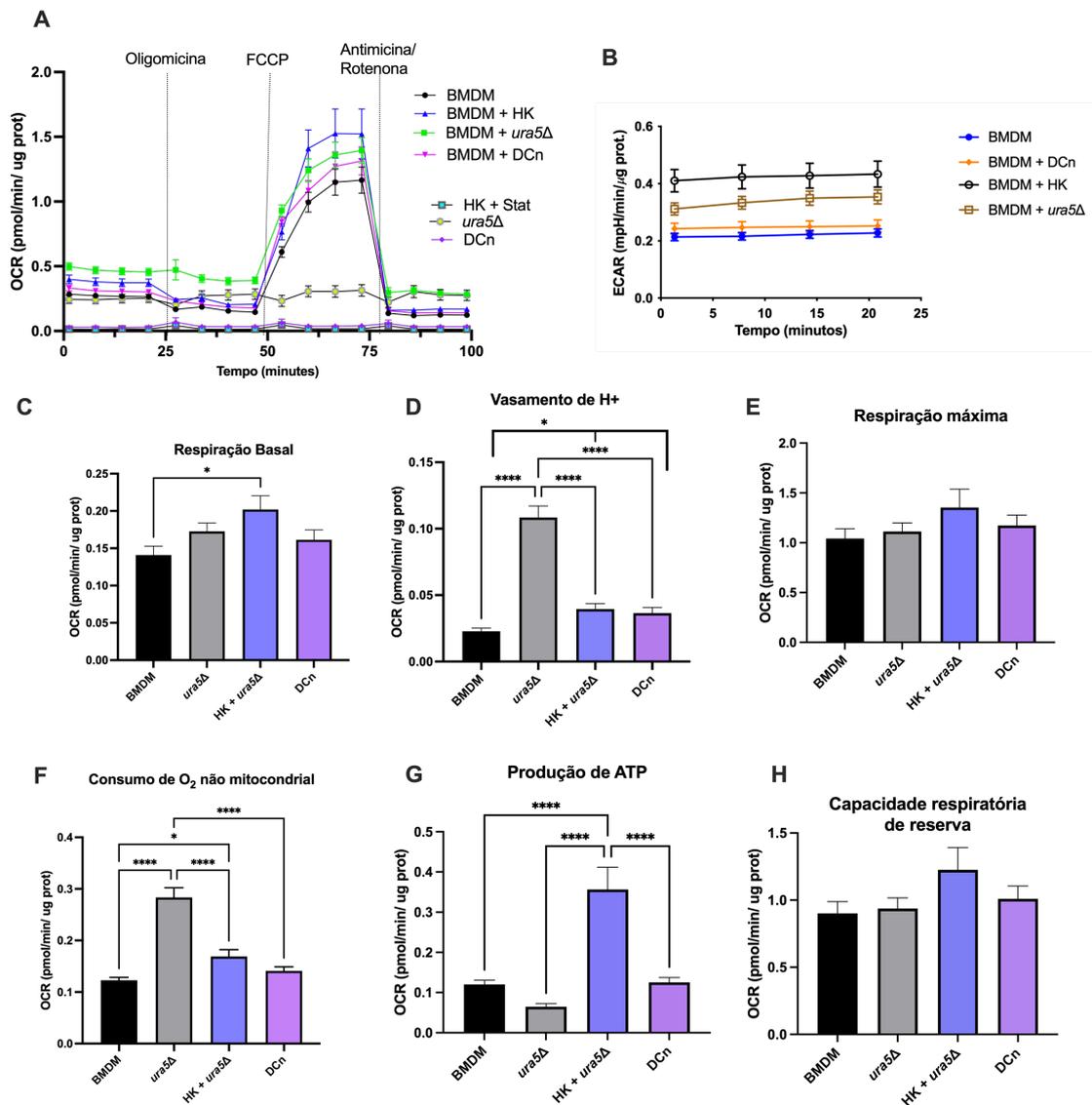


Figura 18. *C. neoformans* em crescimento estacionário altera padrões respiratórios de macrófagos infectados, enquanto dormente não os altera significativamente. Consumo de O₂ (OCR) (A) e acidificação extracelular (ECAR) (estatística em relação ao grupo BMDM) (B) (normalizados por concentração proteica) de macrófagos (BMDM) infectados por 24h com *C. neoformans ura5Δ*, HK + 1% Stat ou DCn (MOI 2) avaliado em equipamento Seahorse. Parâmetros metabólicos calculados a partir dos valores de OCR detectados (C-H). Análise estatística do tipo one-way anova *p < 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. Figura representativa de ao menos 3 replicadas biológicas, com pelo menos 8 poços de cada condição por experimento.

2.4.3. C. neoformans dormente altera o metabolismo de ácidos graxos de macrófagos infectados

Posteriormente, foi realizado um RT-qPCR para quantificação de importantes genes do metabolismo celular: enolase1 (*eno1*), que codifica uma enzima glicolítica; carreador de soluto da família 2, membro 6 (*slc2a6*), facilitador do transporte de glicose através da membrana lisossomal; carreador de soluto da família 2, membro 1 (*slc2a1*), importante no transporte de glicose transmembrana; hexoquinase 2 (*hk2*), envolvido na regulação negativa da permeabilidade da membrana mitocondrial e do processamento metabólico de ROS; domínio contendo enoil coenzima A hidratase 3 (*echdc3*), envolvido no metabolismo de ácidos graxos e na resposta celular a estímulos com insulina. Estes genes foram escolhidos por terem sua expressão alterada em trabalhos anteriores envolvendo macrófagos infectados com fungos (Gonçalves, S. *et al*, 2020).

Como esperado, o Stat induziu a expressão dos genes relacionados ao metabolismo em taxas significativamente mais altas do que o DCn ou HK + Stat (Figura 19B), já que é um fungo metabolicamente ativo e que conseqüentemente, gera maior ativação no macrófago. Entretanto, DCn induziu positivamente a expressão dos genes *eno1*, *slc2a6*, *slc2a1* e *echdc3*, mas não de *hk2*, ao contrário do HK + Stat, que somente induziu a expressão do gene *hk2* (Fig. 19B). Os genes super-expressos estão relacionados ao metabolismo de glicose e ácidos graxos, mostrando que o fungo dormente ativa, ainda que em taxas reduzidas, o metabolismo dessas moléculas, possivelmente servindo de fonte de energia para ele próprio durante a sua persistência no fagolisossomo.

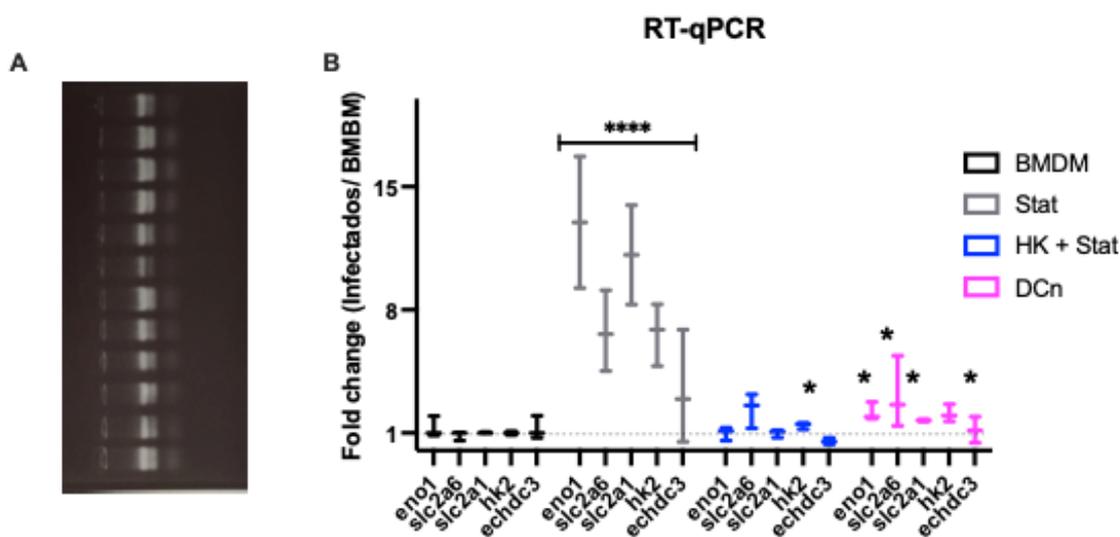


Figura 19. *C. neoformans* dormente induz a expressão de genes relacionados ao metabolismo celular de macrófagos infectados. A) Gel de agarose mostrando a integridade do RNA utilizado para quantificação por RT-qPCR. B) Fold change da quantificação da expressão gênica (Ct) de macrófagos infectados com *C. neoformans* Stat, HK + Stat ou DCn por 24h a 37°C. Para o cálculo do fold change, subtraíu-se o valor de Ct obtido com a quantificação do gene constitutivo β -actina (Δ Ct) e então subtraíu-se o valor obtido dos macrófagos não infectados ($\Delta\Delta$ Ct), que foi então adicionado à fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Análise estatística do tipo two-way anova * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ diferentes do grupo não infectado (BMDM).

Conforme o aumento ECAR, indicando aumento de glicólise induzido pela infecção fúngica (Figura 18B), realizamos um experimento preliminar para detectar as fontes de energia utilizadas pela mitocôndria, usando o kit Mitofuel (Seahorse -Agilent). Detectamos uma alteração no metabolismo energético desencadeado tanto pela infecção com o mutante *ura5* Δ , quanto com DCn (Figura 20). A infecção com o mutante *ura5* Δ induziu um aumento significativo na capacidade dos macrófagos utilizarem fontes energéticas diferentes de glutamina (Fig. 20A) e glicose (Fig. 20C), ao mesmo tempo em que induziu uma grande dependência da utilização de ácidos graxos (Fig. 20B) e redução da dependência de glutamina (Fig. 20A).

Já o DCn induziu alterações mais sutis e contrárias ao *ura5* Δ no metabolismo energético do fagócito. Este fungo induziu uma redução na capacidade de utilizar glutamina (Fig. 20A) e ácidos graxos (Fig. 20B), além de uma redução na dependência de utilização de ácidos graxos (Fig. 20B). Tais resultados indicaram respostas metabólicas antagônicas entre a infecção com *ura5* Δ e com DCn, mostrando que DCn

induz uma resposta metabólica no hospedeiro significativamente menos ativa do que *ura5Δ*, o que corrobora com os demais resultados apresentados anteriormente.

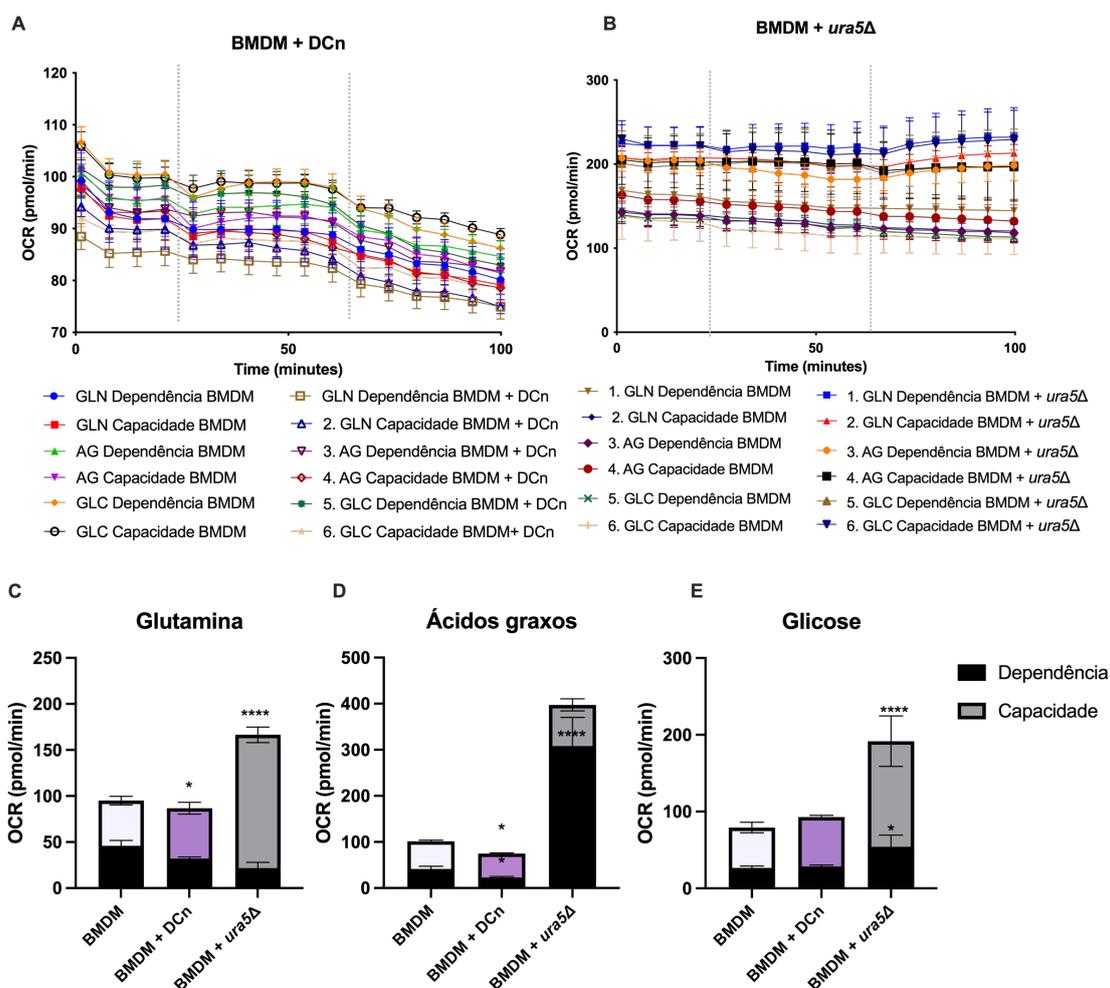


Figura 20. *C. neoformans* altera a dependência e a capacidade de utilização de fontes de energia pelos macrófagos infectados. Taxa do consumo de O₂ (OCR) de macrófagos (BMDM) infectados com DCn (A) ou *ura5Δ* (B) por 24h. Capacidade e dependência de utilização de glutamina (C), ácidos graxos (D) ou glicose (E) como formas de combustível para o metabolismo celular de BMDM infectados com DCn ou *ura5Δ*, calculados a partir dos valores de OCR. Análise estatística do tipo one-way anova * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ em relação ao BMDM. Figura representativa de duas replicatas biológicas, contendo ao menos 7 poços por condição.

A fim de obter informações mais detalhadas sobre o metabolismo energético dos macrófagos infectados e tratados ou não com LPS e IFN- γ , adicionamos moléculas de glicose ou ácido graxo (palmitato) ligados a um fluoróforo (2-NBDG e Bodipy FL C16 respectivamente) ao fim da infecção para detectar posteriormente a captação dessas moléculas pelos fagócitos (Figura 21). Notamos então um aumento significativo na

captação de glicose induzido pelo tratamento com LPS e IFN- γ , como descrito anteriormente (Artyomov, M. *et al*, 2016). Tal captação de glicose foi inibida na infecção com Stat, demonstrando a capacidade do fungo em crescimento estacionário em regular a resposta do macrófago ao estímulo pró-inflamatório. Entretanto, o fungo não induziu alterações na captação de glicose pelo macrófago não tratado (Fig. 21A). Esse resultado em conjunto com a Fig. 20C demonstram que macrófago infectado com *C. neoformans* pode utilizar glicose como fonte primária de energia, mas é estimulado para utilizar fontes alternativas.

O mesmo não ocorreu na infecção com o HK + Stat ou com o DCn, já que estes não inibiram o aumento da captação causado pelo tratamento com LPS e IFN- γ e nem alteraram a captação em relação aos não tratados (Fig. 21A). Já a captação de ácidos graxos não foi alterada pelo tratamento sozinho com LPS e IFN- γ , mas aumentou significativamente no tratamento concomitante à infecção com DCn (Fig. 21B). Além disso, apesar de a infecção com DCn ou HK + Stat não alterar a captação de ácidos graxos pelo macrófago não tratado, eles induziram uma captação maior do que a observada na infecção com Stat (Fig. 21B). Tal resultado difere daquele observado na Fig. 20B, em que observamos um aumento na dependência de ácidos graxos pelos macrófagos infectados com *ura5* Δ (Stat), indicando que podem estar sendo utilizadas vias distintas de utilização de ácidos graxos em cada análise. Entretanto, tal resultado está de acordo com Castro *et al.*, 2019 (Fig. 13), que demonstrou a indução de genes relacionados ao sequestro de triglicerídeos nos macrófagos infectados com DCn mas não nos infectados com formas do fungo metabolicamente ativas.

Realizamos também análises por microscopia para observar a formação de agregados lipídicos pelos macrófagos infectados e pré-tratados com LPS e IFN- γ adicionando Bodipy FL C16 nas duas últimas horas de infecção e realizando a lavagem 30 minutos após a adição, para retirada das moléculas não internalizadas (Fig. 21 D). Observamos então que os macrófagos infectados com DCn induziram uma captura e formação de agregados lipídicos significativamente maior do que os grupos não infectados ou infectados com o fungo Stat ou HK + Stat (Fig. 21C e D). Esses dados indicam a preferência do DCn pelo consumo de lipídeos, já que induz a captação de ácidos graxos pelos macrófagos, enquanto as análises de oximetria (Fig. 20) indicam que esses

lipídeos não estão sendo utilizados para alimentar a cadeia respiratória. Dessa forma. É possível que os ácidos graxos sejam essenciais para a sobrevivência/manutenção do fungo dormente, ou mesmo para o processo de reativação do *C. neoformans* no fagolisossomo. Esses resultados estão de acordo com Nolan, S. e colaboradores, que mostraram a capacidade do *C. neoformans* ativo em obter lipídeos de fontes exógenas e acumulá-lo em seu citoplasma, favorecendo a proliferação fúngica e maiores taxas de exocitose não lítica (Nolan, S. *et al*, 2017).

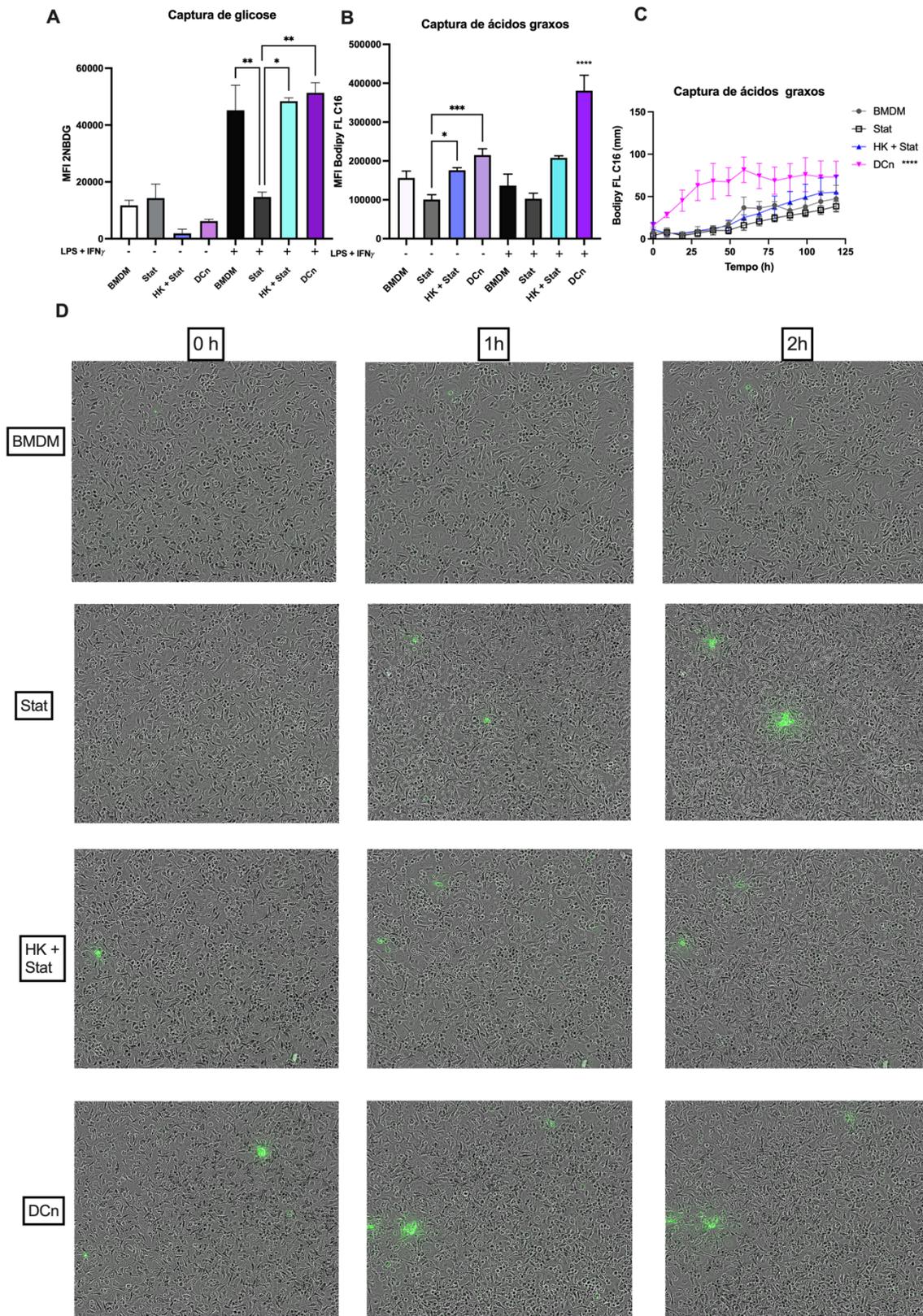


Figura 21. *C. neoformans* estacionário modula negativamente a captação de glicose de macrófagos pré-ativados, enquanto odormente induz aumento na captação de ácidos graxos. A e B: Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) detectadas em citômetro de fluxo de 2NBDG (A) e Bodipy FL C16 (B)

de macrófagos (BMDM) previamente tratados com LPS (500 ng/mL) e IFN- γ e infectados com DCn, HK + Stat ou Stat em MOI 5 por 24h a 37°C, separadas a partir da marcação com CD45-APC e Zombie-NIR (Live-dead); **C e D**: Captação de ácidos graxos por BMDMs, pré-ativados com LPS e IFN- γ , nas duas últimas horas de infecção com *C. neoformans* DCn, HK + Stat ou Stat nas mesmas condições das fig. A e B. Quantificação de pontos fluorescentes em mm (Bodipy FL C16) internalizados pelos BMDM calculados a partir das imagens geradas pelo microscópio Celcytex (Sytena) em aumento 10X (**D**) e calculados pelo software Cellcyte Studio (**C**). Análise estatística do tipo one-way anova * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (diferente de todos os demais grupos).

2.3. Discussão

Considerando os resultados apresentados neste capítulo, notamos que células dormentes de *C. neoformans* modificam significativamente menos o metabolismo de macrófagos infectados do que leveduras em crescimento estacionário, especialmente o metabolismo mitocondrial. Esse comportamento é esperado, já que células VBNC apresentam um metabolismo significativamente reduzido, levando a uma menor ativação da resposta imune (Hommel, B. *et al*, 2019). Apesar de iniciarem o processo de reativação ao infectarem os macrófagos, como mostrado no capítulo 1, esse processo ocorre de forma gradual, o que deve evitar uma ativação exacerbada dos fagócitos. Além disso, esse processo de reativação de forma gradual que não ativa significativamente a resposta imune é benéfico para o *C. neoformans*, pois permite a maior disseminação pelo organismo sem que seja detectado e consiga progredir com a infecção. Isso explica por que a maioria dos casos de criptococose são desencadeados por reativação de infecções latentes e não por novas infecções (Dromer, F. *et al*, 2007).

Dessa forma, foi visto que as leveduras em crescimento estacionário induzem uma ativação significativamente maior do que as dormentes, visto que em estudos anteriores já havia sido demonstrado que a infecção de macrófagos com esse fungo em fase estacionária causa despolarização mitocondrial (Coelho, C. *et al*, 2015). Aqui, observamos que o *C. neoformans* estacionário induz despolarização mitocondrial, apesar de não alterar significativamente seu metabolismo, enquanto as leveduras HK induzem aumento na respiração basal. Para além disso, *C. neoformans* inibe alterações metabólicas causadas por LPS e IFN- γ , em linhas com trabalhos prévios mostrando que *C. neoformans* consegue prevenir ativação do macrófago. Esse processo parece ser iniciado pela secreção da proteína CPL1, que induz o direcionamento para uma resposta predominantemente do tipo Th2 em detrimento da Th1 (Dang, E. *et al*, 2022). Isso indica

uma estratégia de virulência das leveduras viáveis em inibir processos inflamatórios em resposta a fagocitose fúngica, que se mantém nas leveduras dormentes. Além disso, esse resultado corrobora com o RNA-seq dos macrófagos infectados com VBNC de *C. neoformans* que apresentam uma maior expressão de genes relacionados à hidrólise de ATP associada ao transporte de prótons (Castro, R. 2019).

O estudo de Coelho e colaboradores mostrou também que a resposta mitocondrial antifúngica ao *C. neoformans* varia de acordo com as características do macrófago utilizado, já que macrófagos peritoneais e macrófagos de linhagem J774 apresentam uma despolarização mitocondrial significativamente maior do que macrófagos derivados de medula (BMDM) (Coelho, C. *et al*, 2015). Outros estudos já haviam mostrado que macrófagos peritoneais ativados com LPS apresentam resposta metabólica diferenciada à BMDM, provavelmente devido a variabilidade de estímulos que levam a diferenciação *in vivo* desses macrófagos, o que não ocorre no caso dos BMDM. Também está demonstrado que a diferença entre os macrófagos se deve a um desacoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e o Ciclo do Ácido Cítrico no caso dos BMDM (Artyomov, M. *et al*, 2016).

Como descrito anteriormente, a produção de ROS mitocondrial é a principal fonte dessas moléculas no organismo e é advinda da elétrons que não completaram a cadeia fosforilativa mitocondrial e acabam integrando as ROS. Essas moléculas desempenham função de sinalização celular, mas quando em níveis elevados, podem ser tóxicos para a mitocôndria e para a célula e, sabe-se que sua produção é aumentada geralmente quando há uma disfunção mitocondrial. Entretanto, observou-se também que despolarizações mitocondriais transitórias levam a um aumento da produção de ROS, o que é desencadeado por um aumento no pH da matriz mitocondrial (Aklima, J. *et al*, 2021). Curiosamente, a infecção com *C. neoformans* causa despolarização mitocondrial em macrófagos infectados, apesar de não acompanhada pelo aumento na produção de ROS, como já havia sido demonstrado por Coelho e colaboradores. No caso dessa infecção, a despolarização parece ser mediada por óxido nítrico (NO) em vez de ROS (Coelho, C. *et al*, 2015).

Além disso, já foi mostrado que o tratamento de macrófagos com LPS e IFN- γ causa hiperpolarização mitocondrial, podendo levar a disfunção da respiração celular, que é representado aqui como redução de seu potencial de membrana. Isso ocorre pois LPS induz a transcrição do regulador de Interferon fator-1 (IRF-1), que leva a maior produção de ROS, depleção de ATP, consumo de superóxido dismutase e acúmulo de malondialdeído, um indicador de estresse oxidativo (Deng, S. *et al*, 2017). Esse tratamento também induz redução na respiração mitocondrial e aumento da acidificação extracelular em células da micróglia, indicando a realização de glicólise em detrimento da respiração oxidativa mitocondrial. Ademais, induz um aumento da expressão do transportador de glicose GLUT-1, sendo o responsável pela captura de glicose nessas células, o que é importante para que elas consigam realizar fagocitose (Wang, L. *et al*, 2019).

Ademais, sabe-se que a captura de glicose no citoplasma está relacionada a um aumento da glicólise celular e que macrófagos com perfil inflamatório M1 utilizam glicose para produzir lactato, o que está associado a um processo de glicólise aeróbica (Krawczyk C. *et al*, 2010). Isso explica a maior captura de glicose pelos macrófagos tratados com LPS e IFN- γ , o que é inibido por *C. neoformans* em crescimento estacionário, mas não pelo dormente ou o inativado. Esse comportamento pode explicar uma estratégia ativa de virulência utilizada pelo patógeno, em que ele inibe sinalização inflamatória intracelular, regulando a captura de glicose. Ao mesmo tempo, a infecção por *C. neoformans* aumenta significativamente a capacidade do macrófago em utilizar fontes alternativas de energia (Tucey, T. *et al*, 2018). Do contrário, o dormente não altera a captura de glicose pelos macrófagos infectados.

Não observamos alterações significativas no consumo de glicose pelos macrófagos infectados com o *C. neoformans* dormente nem em sua capacidade ou dependência do uso dessa molécula. Entretanto, detectamos um aumento na expressão dos genes *enol*, *slc2a1* e *slc2a6*, relacionados à captura e metabolismo de glicose em macrófagos após a infecção por 24h, apesar de não alterar tanto quanto os fungos em crescimento estacionário. Isso difere de Castro, R. 2019, que não encontrou diferença na expressão desses genes após 6h de infecção com o fungo dormente (Castro, R. 2019). Esses dados mostram que, com o passar do tempo e com o processo de reativação do

DCn, há uma crescente modificação do metabolismo mitocondrial a favor do fungo dormente, permitindo que haja compostos necessários à sua sobrevivência, mas não o suficiente para gerar uma resposta inflamatória exacerbada (Tucey, T. *et al*, 2018).

O metabolismo de lipídios em macrófagos já foi relacionado à função inflamatória diversas vezes em trabalhos anteriores. Foi mostrado que macrófagos ativados com IL-4 produzem agregados lipídicos no citoplasma, os quais estão relacionados a uma resposta inflamatória eficiente, produção de citocinas e despolarização mitocondrial (Castoldi, A. *et al*, 2020). O mesmo é observado em macrófagos ativados com IFN- γ , acompanhado por um aumento de glicólise, com maior captura de glicose e liberação de lactato (Rosas-Ballina, M. *et al*, 2020). A formação de agregados lipídicos se deve à produção de NO derivado de iNOS, o qual inibe a respiração celular e conseqüentemente a degradação de ácidos graxos, priorizando o uso de glicose (Rosas-Ballina, M. *et al*, 2020).

Nesse trabalho observamos que células dormentes de *C. neoformans* não alteram significativamente o metabolismo de glicose, ao menos nas primeiras horas de infecção, apesar de induzir alterações no metabolismo de lipídeos. Observamos uma redução na dependência de ácidos graxos pelos macrófagos infectados, acompanhada por um aumento na captura de ácidos graxos e na formação de agregados lipídicos, principalmente quando tratados com LPS e IFN- γ previamente. Esses resultados concordam com o RNA-seq realizado por Castro, R. 2019, que detectou um aumento na expressão de genes relacionados ao sequestro de triglicerídeos nos macrófagos infectados com células VBNC de *C. neoformans*, mas não com leveduras em crescimento estacionário. Castro, R. 2019 também observou uma super-expressão de genes relacionados à síntese de NO, molécula que pode estar auxiliando na formação dos agregados lipídicos observados (Rosas-Ballina, M. *et al*, 2020).

O acúmulo de ácidos graxos no citoplasma de macrófagos também é observado quando estes são infectados com *M. tuberculosis*, já que este patógeno utiliza principalmente ácidos graxos como fonte de energia para seu crescimento durante a infecção, induzindo um *shift* metabólico nos macrófagos, estimulando a realização de glicólise aeróbica (Laval, T. *et al*, 2021). A indução do acúmulo de ácidos graxos também

é observada na infecção com *M. tuberculosis* dormente e é acompanhado por uma maior expressão de genes relacionados ao estresse redutor e β -oxidação (Laval, T. *et al*, 2021).

O interior dos macrófagos, em especial o fagolisossomo, é nutricionalmente escasso em glicose, que habitualmente é o composto mais facilmente assimilado pelas células (Laurian, R. *et al*, 2020). Dessa forma, os patógenos intracelulares foram selecionados com o passar da evolução a utilizar compostos alternativos e modificar seu metabolismo em resposta ao meio estressor. Isso já foi observado em *C. albicans*, que inicialmente ativa as vias da gluconeogênese e degradação de ácidos graxos, genes ativados especificamente durante infecção de macrófagos, sem homólogos conhecidos, o que reforça a teoria de que foram selecionados evolutivamente (Lorenz M. *et al*, 2004). Em contrapartida, os macrófagos infectados com *C. albicans* também alteram seu metabolismo para um perfil glicolítico, pró-inflamatório, com maior produção de lactato e consumo de glicose, além de um aumento de fosforilação oxidativa e glutaminólise. Além disso, as alterações metabólicas diferem quando os macrófagos são infectados com leveduras ou hifas, modulados pelas lectinas do tipo C (CLR) (Pellon, A. *et al*, 2022).

Nossa hipótese é que *C. neoformans* dormente estaria induzindo a captura de lipídeos como estratégia de sobrevivência no fagolisossomo até sua reativação, já que essas leveduras apresentam preferência pelo consumo de lipídeos em relação a outras fontes de energia (Hommel et al 2019). Hommel e colaboradores observaram que após o período de hipóxia para indução de dormência, leveduras VBNC de *C. neoformans* apresentam uma expressão reduzida de 47 proteínas integrantes de ciclos da degradação de ácidos graxos, do glioxilato e da neogluco-gênese em relação ao fungo estacionário. Após análise enriquecida, observaram uma prevalência da regulação das vias do metabolismo de ácidos graxos e β -oxidação nas leveduras VBNC. Viram também que a deleção das proteínas integrantes a essas vias reduzia a resistência das leveduras ao tempo de hipóxia, perdendo viabilidade, o que também foi observado com leveduras de *S. cerevisiae*. Provavelmente a regulação dessas vias permite a manutenção da integridade da membrana durante o período de estresse (Hommel et al 2019).

Essas características metabólicas justificam porque a adição de ácido pantotênico no meio estimula a reativação de leveduras de *C. neoformans*, já que o ácido pantotênico

é o precursor do Acetil-CoA, um importante integrante do metabolismo de ácidos graxos. E, durante a infecção, esse fungo modula a ativação de três diferentes vias para produção de Acetil-CoA, a via da β -oxidação de ácidos graxos, acetato e citrato, mostrando mais uma vez a importância dessa fonte de energia para o *C. neoformans* (Kretschmer, M. *et al*, 2012). Entretanto, não podemos descartar a importância do metabolismo de glicose durante a infecção por *C. neoformans*, já que a depleção de enzimas glicolíticas causa prejuízo em sua virulência, evitando a persistência das leveduras no SNC. Entretanto, elas conseguem sobreviver nos pulmões do hospedeiro mesmo na ausência dessas enzimas, mostrando a capacidade de utilizar fontes energéticas alternativas nesse órgão (Price, M. *et al*, 2011).

Dessa forma, aparentemente o DCn induz um *shift* metabólico nos macrófagos infectados modificando-os para um perfil glicolítico, apesar de que em níveis significativamente menores do que o fungo em crescimento estacionário. Esse mecanismo é esperado, já que normalmente moléculas de DAMP e PAMP, como LPS e IFN- γ ou partículas fúngicas mortas induzem um metabolismo glicolítico, pró-inflamatório (Rosas-Ballina, M. *et al*, 2020). Ao mesmo tempo, o fungo induz a captura de ácidos graxos e a formação de agregados lipídicos no citoplasma que servem de fonte de energia para o crescimento fúngico durante o processo de reativação. Paralelamente, já foi mostrado que a infecção de macrófagos alveolares com *C. neoformans* por 2h leva a uma maior expressão de TNF- α , acompanhado por um *shift* metabólico que estimula o maior uso de lipídios pelos macrófagos, a partir da super-expressão de FABP4 (Nelson, B. *et al*, 2022).

3. Considerações Finais

De modo geral observamos com este trabalho que o *C. neoformans* é capaz de sair de seu estado dormente de forma eficiente, sendo este processo acelerado ou estimulado pela interação com macrófagos M2. Tal mecanismo também é observado durante infecção de camundongos imunodeprimidos, no qual este fungo apresenta tropismo para o sistema nervoso central, onde é efetivamente reativado, conseguindo colonizar o tecido, processo inibido pela presença de IFN- γ . Além disso, observamos que este fungo não altera significativamente o metabolismo dos macrófagos infectados nas primeiras horas de infecção. Entretanto, induz alterações no metabolismo de lipídeos e maior captura de ácidos graxos além de alterar a expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose e ácidos graxos. Essa alteração pode estar relacionada com o início de sua reativação no interior celular, que necessita de uma maior disponibilidade energética, enquanto mantém a maioria dos mecanismos inflamatórios silenciados, aumentando suas chances de sobrevivência.

Ressalta-se que mais experimentos serão realizados a fim de obter uma resposta mais completa sobre o metabolismo dos macrófagos infectados com a forma dormente do *C. neoformans* e como este pode influenciar em sua reativação. A continuidade no estudo de células VBNC de *C. neoformans* assim como nos mecanismos envolvidos em sua reativação são essenciais para o desenvolvimento futuro de novos tratamentos à criptococose. Isso se justifica, pois a maioria dos casos da doença se dão devido à reativação de uma infecção latente que ressurge quando o organismo apresenta supressão de seus mecanismos imunes. Além disso, o estudo do imuno-metabolismo frente a essa infecção é essencial para a compreensão da relação parasito-hospedeiro, podendo também ser regulada farmacologicamente para evitar a progressão da doença.

4. Produção acadêmica

- **Marina, C.L.**; Bürgel, P.H.; Agostinho, D.P.; Zamith-Miranda, D.; Las-Casas, L.d.O.; Tavares, A.H.; Nosanchuk, J.D.; Bocca, A.L. Nutritional Conditions Modulate *C. neoformans* Extracellular Vesicles' Capacity to Elicit Host Immune Response. *Microorganisms* 2020, 8, 1815. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111815>

- Souza, A. C. O., Favali, C., Soares, N. C., Tavares, N. M., Jerônimo, M. S., Junior, P. H. V., **Marina, C. L.**, Santos, C., Brodskyn, C., & Bocca, A. L. (2019). New role of *P. Brasiliensis* α -glucan: Differentiation of non-conventional dendritic cells. *Frontiers in Microbiology*, 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02445>

- Bürgel, P.H., **Marina, C.L.**, Saavedra, P.H., Albuquerque, P., de Oliveira, S.A.M., Veloso Janior, P.H. D.H., Castro, R.A.D., Heyman, H. M., Coelho, C., Cordero, R. J. B., Casadevall, A., Nosanchuk, J. D., Nakayasu, E. S., May, R. C., Tavares, A. H., and Bocca, A. L. (2020). *Cryptococcus neoformans* Secretes Small Molecules That Inhibit IL-1 β Inflammasome-Dependent Secretion. *Mediators of Inflammation*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3412763>

- Oliveira, F. F. M., Paes, H. C., Peconick, L. D. F., Fonseca, F. L., **Marina, C. L. F.**, Bocca, A. L., Homem-de-Mello, M., Rodrigues, M. L., Albuquerque, P., Nicola, A. M., Alspaugh, J. A., Felipe, M. S. S., & Fernandes, L. (2020). Erg6 affects membrane composition and virulence of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103368>

- de Oliveira, S. A. M., Reis, J. N., Catão, E., Amaral, A. C., Souza, A. C. O., Ribeiro, A. M., Faccioli, L. H., Carneiro, F. P., **Marina, C. L. F.**, Bürgel, P. H., Fernandes, L., Tavares, A. H., & Bocca, A. L. (2021). β 2 Integrin-Mediated Susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* Experimental Infection in Mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.

- Las-Casas, L. de O., **Marina, C. L. F.**, de Castro, R. J. A., Coelho, L. C., Bão, S. N., de Hoog, G. S., Vicente, V. A., Fernandes, L., & Bocca, A. L. (2022). Pathogenicity and Growth Conditions Modulate *Fonsecaea* Extracellular Vesicles' Ability to Interact With Macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.879018>

5. Referências Bibliográficas

- 1- Adams, D.O. (1976) The granulomatous inflammatory response. A review *AmJ Pathol.*; 84(1): 164-92; Pub Med Central. PMID:937513 PMCID:PMC2032357.
- 2- Aklima, J., Onojima, T., Kimura, S., Umiuchi, K., Shibata, T., Kuraoka, Y., Oie, Y., Suganuma, Y., & Ohta, Y. (2021). Effects of Matrix pH on Spontaneous Transient Depolarization and Reactive Oxygen Species Production in Mitochondria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.692776>
- 3- Alanio, A. (2020). Dormancy in cryptococcus neoformans: 60 years of accumulating evidence. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 130, Issue 7, pp. 3353–3360). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI136223>
- 4- Alanio, A., Vernel-Pauillac, F., Sturny-Leclère, A., And Dromer, F. (2015) *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. *MBio*. v.6, n. 2, p. e02580-14
- 5- Albuquerque, P., Nicola, A. M., Nieves, E., Paes, H. C., Williamson, P. R., Silva-Pereira, I. (2014). And Casadevall, A. Quorum sensing-mediated, cell density- dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*. v.5, n. 1, p. e00986-13.
- 6- Almeida, F. and Wolf, J. M. (2015). Virulence-Associated Enzymes of. *Eukaryotic Cell*, 14(12), 1173–1185. <https://doi.org/10.1128/EC.00103-15>.Address
- 7- Amachi, T., Imamoto, S., Yoshizumi, H. and Senoh, S. (1970) Structure and synthesis of a novel pantothenic acid derivative, the microbial growth factor from tomato juice. *Tetrahedron Lett.* 1970:4871–4874.
- 8- An, G.; Tang, Y.; Mo, B.; Ran, M.; He, X.; Bao, J.; Zhou, Z. (2020) Characterization of a Murine Model for *Encephalitozoon hellem* Infection after Dexamethasone Immunosuppression. *Microorganisms* 8, 1891. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121891>
- 9- Artyomov, M.N., Sergushichev, A. and Schilling, J. D. (2016) Integrating immunometabolism and macrophage diversity. *Seminars in Immunology*, vol. 28, no. 5, pp. 417–424.
- 10- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Campana R, Falzano L, Donelli G. (2003) Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *Int J Food Microbiol.* 15;89(1):31-9. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00102-8. PMID: 14580971.
- 11- Baker R.D. The primary pulmonary lymph node complex of cryptococcosis. *Am J Clin Pathol.* 1976 Jan;65(1):83-92. doi: 10.1093/ajcp/65.1.83. PMID: 1246992.
- 12- Baker, R.D., Haugen, R.K. (1955) Tissue Changes and Tissue Diagnosis in Cryptococcosis. *AmJ ClinPathol* 25:14–24. <https://doi.org/10.1093/ajcp/25.1.14> PMID:14349908
- 13- Beale, M.A., Sabiiti, W., Robertson, E. J., Fuentes-Cabrejo, K.M., O’Hanlon, S.J., Jarvis, J.N., Loyse, A., Meintjes, G., Harrison, T.S., May, R.C., Fisher, M.C. and Bicanic, T. (2015). Genotypic diversity is associated with clinical outcome and phenotype in cryptococcal meningitis across Southern Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003847>
- 14- Bekondi, C., Bernede, C., Passone, N., Minnsart, P., Kamalo, C., Mbolidi, D., Germani, Y. (2006). Primary and opportunistic pathogens associated with meningitis in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus sero- status. *Int J Infect Dis.* v.10. 387–395.
- 15- Bergsbaken, T., Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2009) Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 99–109
- 16- Brunet, K., Alanio, A., Lortholary, O., Rammaert, B. (2018) Reactivation of dormant/latent fungal infection. *Journal of Infection.* v.77. 463–468
- 17- Bürgel, P.H., Marina, C.L., Saavedra, P.H., Albuquerque, P., de Oliveira, S.A.M., Veloso Junior, P.H. D.H., Castro, R.A.D., Heyman, H. M., Coelho, C., Cordero, R. J. B., Casadevall, A., Nosanchuk, J. D., Nakayasu, E. S., May, R. C., Tavares, A. H., and Bocca, A. L. (2020). *Cryptococcus neoformans* Secretes Small Molecules That Inhibit IL-1 β Inflammasome-Dependent Secretion. *Mediators of Inflammation*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3412763>

- 18- Carlin, L.M., Stamatiades, E.G., Auffray, C. *et al.* (2013) *Nr4a1*-dependent Ly6C^{low} monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal,” *Cell*, vol. 153, no. 2, pp. 362–375.
- 19- Casadevall, A. (2010). Cryptococci at the brain gate: Break and enter or use a Trojan horse? *Journal of Clinical Investigation*, 120(5), 1389–1392. <https://doi.org/10.1172/JCI42949>
- 20- Casadevall, A., Perfect, J.R. (1998). *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington, DC.
- 21- Castoldi, A., Monteiro, L. B., van Teijlingen Bakker, N., Sanin, D. E., Rana, N., Corrado, M., Cameron, A. M., Hässler, F., Matsushita, M., Caputa, G., Klein Geltink, R. I., Büscher, J., Edwards-Hicks, J., Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2020). Triacylglycerol synthesis enhances macrophage inflammatory function. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17881-3>
- 22- Castro, Raffael Júnio Araújo (2019). Investigação de potenciais sítios reservatórios para a infecção criptocócica latente e o papel dos macrófagos na dormência de *Cryptococcus neoformans*. Tese (Doutorado) Curso de Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília.
- 23- Chan, J. F. W., Zhang, A. J., Chan, C. C. S., Yip, C. C. Y., Mak, W. W. N., Zhu, H., Poon, V. K. M., Tee, K. M., Zhu, Z., Cai, J. P., Tsang, J. O. L., Chik, K. K. H., Yin, F., Chan, K. H., Kok, K. H., Jin, D. Y., Au-Yeung, R. K. H. and Yuen, K. Y. (2016). Zika Virus Infection in Dexamethasone-immunosuppressed Mice Demonstrating Disseminated Infection with Multi-organ Involvement Including Orchitis Effectively Treated by Recombinant Type I Interferons. *EBioMedicine*, 14, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.017>
- 24- Chaskes, S., Tyndall, R.L., Richmond, V. and Little, G. N. (1975). Pigment Production by *Cryptococcus neoformans* from para-and ortho-Diphenols: Effect of the Nitrogen Source. In *Journal of Clinical Microbiology*. <https://journals.asm.org/journal/jcm>
- 25- Chen, G.H McDonald, R.A.; Wells, J.C.; Huffnagle, G.B.; Lukacs, N.W.; Toews, G.B. (2005) The Gamma Interferon Receptor Is Required for the Protective Pulmonary Inflammatory Response to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 73, 1788–1796.;
- 26- Chen, G.H., McDonald, R.A., Wells, J.C., Huffnagle, G.B., Lukacs, N.W., Toews, G.B. (2005) The gamma interferon receptor is required for the protective pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 73(3):1788-96. doi: 10.1128/IAI.73.3.1788-1796.2005. PMID: 15731080;
- 27- Chen, M., Xing, Y., Lu, A., Fang, W., Sun, B., Chen, C., Liao, W., and Meng, G. (2015). Internalized *Cryptococcus neoformans* Activates the Canonical Caspase-1 and the Noncanonical Caspase-8 Inflammasomes. *The Journal of Immunology*, 195(10), 4962–4972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500865>
- 28- Chen, Y.; Shi, Z.W.; Strickland, A.B.; Shi, M. (2022) *Cryptococcus neoformans* Infection in the Central Nervous System: The Battle between Host and Pathogen. *J. Fungi*, 8, 1069. <https://doi.org/10.3390/jof8101069>
- 29- Cheng, P.Y., Sham, A. and Kronstad, J.W. (2009) *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 77:4284–4294.
- 30- Coelho C (2022) Itaconate or how I learned to stop avoiding the study of immunometabolism. *PLOS Pathogens* 18(3): e1010361. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010361>
- 31- Coelho, C., Souza, A. C. O., Derengowski, L. da S., de Leon-Rodriguez, C., Wang, B., Leon-Rivera, R., Bocca, A. L., Gonçalves, T., & Casadevall, A. (2015). Macrophage Mitochondrial and Stress Response to Ingestion of *Cryptococcus neoformans*; *The Journal of Immunology*, 194(5), 2345 LP – 2357. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402350>
- 32- Cox, G.M., Harrison, T.S., McDade, H.C., Taborda, C.P., Heinrich, G., Casadevall, A., Perfect, J.R. (2003). Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun* 71:173–180. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.1.173-180.2003>
- 33- Crabtree, J.N., Okagaki, L.H., Wiesner, D.L., Strain, A.K., Nielsen, J.N., Nielsen, K. (2012) Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 80(11):3776–85
- 34- Dang, E.V., Lei, S., Radkov, A. *et al.* Secreted fungal virulence effector triggers allergic inflammation via TLR4. *Nature* 608, 161–167 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05005-4>
- 35- Davis, M.J., Eastman, A.J., Qiu, Y., Gregorka, B., Kozel, T.R., Osterholzer, J.J., Curtis, J.L., Swanson, J.A., Olszewski, M.A. (2015) *Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. *J Immunol.* Mar 1;194(5):2219-31. doi: 10.4049/jimmunol.1402376. PMID: 25637026.

- 36- Deng, S., Zhang, L., Ai, Y., Pan, P., Zhao, S., Su, X. ... Tsung, A. (2017). Role of interferon regulatory factor-1 in lipopolysaccharide-induced mitochondrial damage and oxidative stress responses in macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*, 40, 1261-1269. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3110>
- 37- Deshaw, M., Pirofski, L.A. (1995) Antibodies to the *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan are ubiquitous in serum from HIV+ and HIV- individuals. *Clin Exp Immunol*. 99(3):425-32. doi: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb05568.x. PMID: 7882565.
- 38- Dornelas, J.C.M., Costa, M.C., Carmo, P.H.F., Paixão, V.M., Carvalho, V.S.D., Barreto, L.C., Garcia, Q.S., Bragança, G.P.P., Isaias, R.M.S., Brito, J.C.M., Resende-Stoianoff, M.A., Santos, D.A. (2022) *Nicotiana benthamiana* as a model for studying *Cryptococcus*-plant interaction, *FEMS Microbiology Ecology*, V.98, I. 4, fiac036, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac036>
- 39- Dragotakes, Q., Fu, M. S., e Casadevall, A. (2019). Dragotcytosis: Elucidation of the mechanism for *Cryptococcus neoformans* macrophage-to-macrophage transfer. *Journal of Immunology*, 202(9), 2661–2670. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801118>
- 40- Dromer, F., Casadevall, A., Perfect, J., And Sorrell, T. (2011) *Cryptococcus neoformans*: latency and disease. In: *Cryptococcus*. American Society of Microbiology. p. 431-439.
- 41- Dromer, F., Mathoulin-Pélissier, S., Launay, O., Lortholary, O. (2007). French Cryptococcosis Study Group. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study. *PLoS Med*. Feb;4(2):e21. doi: 10.1371/journal.pmed.0040021. PMID: 17284154; PMCID: PMC1808080.
- 42- Duncan, D., Lupien, A., Behr, M.A., Auclair, K. (2021) Effect of pH on the antimicrobial activity of the macrophage metabolite itaconate. *Microbiology*.;167. pmid:34020726
- 43- Esher, S. K., Zaragoza, O., and Alspaugh, J. A. (2018). Cryptococcal pathogenic mechanisms: A dangerous trip from the environment to the brain. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(7), 1–15. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180057>
- 44- Evans, R.J., Li, Z., Hughes, W.S., Djordjevic, J.T., Nielsen, K., May, R.C. (2015) Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation and control of titan cell morphology during macrophage infection. *Infect Immun*. 83(4):1296-304. doi: 10.1128/IAI.03104-14. PMID: 25605772.
- 45- Fei, F., Lee, K.M., McCarry, B.E., and Bowdish, D.M.E. (2016). Age-associated metabolic dysregulation in bone marrow-derived macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep22637>
- 46- Feinberg, M. W. and Moore, K. J. (2016) MicroRNA regulation of atherosclerosis. *Circ. Res*. **118**, 703–720
- 47- Feldmesser, M., Kress, Y., Casadevall A. (2001) Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* 147(Pt 8):2355–65. PubMed: 11496012
- 48- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P., Casadevall, A. (2000) *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun*. 68(7):4225-37. doi: 10.1128/IAI.68.7.4225-4237.2000. PMID: 10858240
- 49- Frazão, S.O., Sousa, H.R., Silva, L.G., Folha, J.S., Gorgonha, K.M., Oliveira, G.P., Jr, Felipe, M.S.S., Silva-Pereira, I., Casadevall, A., Nicola, A.M., Albuquerque, P. (2020). Laccase affects the rate of *Cryptococcus neoformans* nonlytic exocytosis from macrophages. *mBio* 11:e02085-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02085-20>
- 50- Fu, M.S., Coelho, C., De Leon-Rodriguez, C.M., Rossi, D.C.P., Camacho, E., et al. (2018) *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. *PLOS Pathogens* 14(6): e1007144. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007144>
- 51- Garcia-Hermoso, D., Janbon, G., and Dromer, F. O. (1999). Epidemiological Evidence for Dormant *Cryptococcus neoformans* Infection. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 37, Issue 10). <https://journals.asm.org/journal/jcm>
- 52- Gnaiger, E. (2020). Mitochondrial Pathways and Respiratory Control an Introduction to OXPHOS Analysis. *Bioenerg Commun*, 2. <https://doi.org/10.26124/bec:2020-0002>
- 53- Goldman, D.L., Khine, H., Abadi, J., Lindenberg, D.J., Pirofski, L., Niang, R., Casadevall, A. (2001) Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics*. May;107(5):E66. doi: 10.1542/peds.107.5.e66. PMID: 11331716.
- 54- Goldman, D.L., Lee, S.C., Mednick, A.J., Montella, L. and Casadevall, A. (2000). Persistent *Cryptococcus neoformans* Pulmonary Infection in the Rat Is Associated with Intracellular Parasitism,

- Decreased Inducible Nitric Oxide Synthase Expression, and Altered Antibody Responsiveness to Cryptococcal Polysaccharide. *Infection and Immunity* (Vol. 68, Issue 2).
- 55- Goldman, D.L., Cho, Y., Zhao, M., Casadevall, A., Lee, S.C. (1996) Expression of inducible nitric oxide synthase in rat pulmonary *Cryptococcus neoformans* granulomas. *Am J Pathol.*148(4):1275-1282.
- 56- Gonçalves, S.M., Duarte-Oliveira, C., Campos, C.F., Aïmanianda, V., ter Horst, R., Leite, L., ... Carvalho, A. (2020) Phagosomal removal of fungal melanin reprograms macrophage metabolism to promote antifungal immunity. *Nature Communications*. v.11(1). 1–15.
- 57- Gordon, S. and Martinez, F.O. (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593–604.
- 58- Granger, D.L., Hibbs, J.B. Jr, Perfect, J.R., and Durack, D.T. (1988) Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 81:1129–1136.
- 59- Granger, D.L., Perfect, J.R., Durack, D.T. (1985) Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest* 76(2):508–16. [PubMed: 3928681]
- 60- Guglani L, Khader SA. Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 Mar;5(2):120-7. doi: 10.1097/COH.0b013e328335c2f6. PMID: 20543588; PMCID: PMC2892849.
- 61- Guo, C., Chen, M., Fa, Z., Lu, A., Fang, W., Sun, B., Chen, C., Liao, W., & Meng, G. (2014). Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Microbes and Infection*, 16(10), 845–854. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.08.013>
- 62- Guo, X., Mao, X., Tian, D., Liao, Y., Su, B., Ye, C., Shi, D., Liu, T. F., Ling, Y., & Hao, Y. (2022). *Cryptococcus neoformans* Infection Induces IL-17 Production by Promoting STAT3 Phosphorylation in CD4⁺ T Cells. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.872286>
- 63- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolečka, A., Polacheck, I., Sionov, E., Falk, R., Parmen, S., Lumbsch, H.T., Boekhout, T. (2015) Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 78, 16–48.
- 64- Hommel, B., Sturny-Leclere, A., Volant, S., Veluppillai, N., Duchateau, M., Yu, C. H., ... And Alanio (2019). *A. Cryptococcus neoformans* resist to drastic conditions by switching to viable but non-culturable cell phenotype. *PLOS Pathogens*. v.15(9). e1008070.
- 65- Huang, S.H., Wu, C.H., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J., Brown, R.J., Jong, A. (2012) *Cryptococcus neoformans*-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. *PLoS One*. 7(11):e48570. doi: 10.1371/journal.pone.0048570. PMID: 23144903.
- 66- Jha, A. K., Huang, S. C. C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K. M., Ashall, J., Everts, B., Pearce, E. J., Driggers, E. M., & Artyomov, M. N. (2015). Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. *Immunity*, 42(3), 419–430. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.02.005>
- 67- Jong, A.; Wu, C.H.; Prasadarao, N.V.; Kwon-Chung, K.J.; Chang, Y.C.; Ouyang, Y.; Shackleford, G.M.; Huang, S.H. (2008) Invasion of *Cryptococcus neoformans* into Human Brain Microvascular Endothelial Cells Requires Protein Kinase C- α Activation. *Cell. Microbiol.* 10, 1854–1865.
- 68- Kawakami, K., Zhang, T., Qureshi, M.H., Saito, A. (1997) *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide production by murine peritoneal macrophages stimulated with interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Cell Immunol.* 25;180(1):47-54. doi: 10.1006/cimm.1997.1166. PMID: 9316638.
- 69- Kornilov, R., Puhka, M., Mannerström, B., Hiidenmaa, H., Peltoniemi, H., Siljander, P., et al. (2018) Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum.;7(1):1422674.
- 70- Kostallari, E., Valainathan, S., Biquard, L., Shah, V. H., Rautou, P-E. (2021) Role of extracellular vesicles in liver diseases and their therapeutic potential. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Volume 175. 113816. ISSN 0169-409X. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.026>.
- 71- Krawczyk, C.M., Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, Cross JR, Jung E, Thompson CB, Jones RG, Pearce EJ (2010). Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*. Jun 10;115(23):4742-9. doi: 10.1182/blood-2009-10-249540. Epub 2010 Mar 29. PMID: 20351312; PMCID: PMC2890190.
- 72- Kretschmer, M., Wang, J., & Kronstad, J. W. (2012). Peroxisomal and mitochondrial β -oxidation pathways influence the virulence of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 11(8), 1042–1054. <https://doi.org/10.1128/EC.00128-12>

- 73- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E., Wickes, B.L., Meyer, W., Cuomo, C.A., Wollenburg, K.R., Bicanic, T.A., Castañeda, E., Chang, Y.C., Chen, J. et al. (2017) The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere* 2, e00357-16.
- 74- Kwon-Chung, K.J., Boekhout, T., Wickes, B.L.; Fell, J.W. (2011) Systematics of the Genus *Cryptococcus* and Its Type Species, *C.neoformans*. *Cryptococcus*.
- 75- Laurian, R., Jacot-des-Combes, C., Bastian, F., Dementhon, K. Cotton, P. (2020) Carbon metabolism snapshot by ddPCR during the early step of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages, *Pathogens and Disease*, Volume 78, Issue 1, ftaa014.
- 76- Laval, T., Chaumont, L., & Demangel, C. (2021). Not too fat to fight: The emerging role of macrophage fatty acid metabolism in immunity to Mycobacterium tuberculosis. In *Immunological Reviews* (Vol. 301, Issue 1, pp. 84–97). John Wiley and Sons Inc.
- 77- Li, H. Han, X., Du, W., Meng, Y., Li, Y. Sun, T., Liang, Q., Li, C., Suo, C., Gao, X., Qiu, Y. Tian, W. An, M., Zhang, H., Fu, Y., Li, X. Lan, T., Yang, S., Zhang, Z., Geng, W., Ding, C. & Shang, H. (2022) Comparative miRNA transcriptomics of macaques and mice reveals *MYOC* is an inhibitor for *Cryptococcus neoformans* invasion into the brain, *Emerging Microbes & Infections*, 11:1, 1572-1585, DOI: [10.1080/22221751.2022.2081619](https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2081619)
- 78- Lindell, D. M., Ballinger, M. N., Mcdonald, R. A., Toews, G. B., & Huffnagle, G. B. (2006) Immunologic homeostasis during infection: coexistence of strong pulmonary cell-mediated immunity to secondary *Cryptococcus neoformans* infection while the primary infection still persists at low levels in the lungs. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 7, p. 4652-4661.
- 79- Littman, M.L. (1959). Cryptococcosis (torulosis). *Am. J. Med.* 27:976–988
- 80- Littman, M.L. Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *Trans N Y Acad Sci* 1958;20(7):623–48.[PubMed: 13556861]
- 81- Liu L, Tewari, R.P., Williamson, P.R. (1999) Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun.* 67(11):6034-9. doi: 10.1128/IAI.67.11.6034-6039.1999. PMID: 10531264.
- 82- Liu, T.B., Kim, J.C., Wang, Y., Toffaletti, D.L., Eugenin, E., Perfect, J.R., Kim, K.J.; Xue, C. (2013) Brain Inositol Is a Novel Stimulator for Promoting *Cryptococcus* Penetration of the Blood-Brain Barrier. *PLoS Pathog* e1003247
- 83- Lorenz MC, Bender JA, Fink GR. (2004) Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell.* 3(5):1076-87. doi: 10.1128/EC.3.5.1076-1087.2004. PMID: 15470236; PMCID: PMC522606.
- 84- Lotoux, A., Milohanic, E., & Bierne, H. (2022). The Viable But Non-Culturable State of *Listeria monocytogenes* in the One-Health Continuum. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.849915>.
- 85- Lovchik, J. A., Lyons, C. R., & Lipscomb, M. F. (n.d.) (1995). *A Role for Gamma Interferon-induced Nitric Oxide in Pulmonary Clearance of Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol. pp. 116-124.
- 86- Lovchik, J.A., Lyons, C.R. and Lipscomb, M.F. (1995). *A Role for Gamma Interferon-induced Nitric Oxide in Pulmonary Clearance of Cryptococcus neoformans*.
- 87- Lu, L. Bonham, C.A. Chambers, F.G. Watkins, S.C. Hoffman, R.A. Simmons, R.L. Thomson, A.W. (1996) Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J Immunol* 157 (8): 3577–3586. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.8.3577>
- 88- Marina, C.L., Bürgel, P.H., Agostinho, D.P., Zamith-Miranda, D., Las-Casas, L. de O., Tavares, A.H., Nosanchuk, J.D., and Bocca, A.L. (2020). Nutritional conditions modulate *C. Neoformans* extracellular vesicles' capacity to elicit host immune response. *Microorganisms*, 8(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111815>
- 89- Maruvada, R.; Zhu, L.; Pearce, D.; Zheng, Y.; Perfect, J.; Kwon-Chung, K.J.; Kim, K.S. (2012) *Cryptococcus neoformans* Phospholipase B1 Activates Host Cell Rac1 for Traversal across the Blood-Brain Barrier. *Cell. Microbiol.* 14, 1544–1553.
- 90- Mattner, F., Fischer, S. and Guckes, S. (1993). The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer*. In *Eur. J. Immunol* (Vol. 23).
- 91- Menten, P., Anja Wuyts, Jo Van Damme (2002). Macrophage inflammatory protein-1, Cytokine & Growth Factor Reviews. Volume 13, Issue 6, Pages 455-481, ISSN 1359-6101.

- 92- Michelucci, A., Cordes, T., Ghelfi, J., Pailot, A., Reiling, N., Goldmann, O., Binz, T., Wegner, A., Tallam, A., Rausell, A., Buttini, M., Linster, C. L., Medina, E., Balling, R., & Hiller, K. (2013). Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), 7820–7825. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218599110>
- 93- Mingkuan, C., Xing, Y. Lu, A. Fang, W. Sun, B. Chen, C. Liao, W. Meng, G. (2015) Internalized *Cryptococcus neoformans* Activates the Canonical Caspase-1 and the Noncanonical Caspase-8 Inflammasomes. *J Immunol* 15; 195 (10): 4962–4972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500865>
- 94- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 12, pp. 958–969). <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- 95- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. In *Immunity* (Vol. 41, Issue 1, pp. 14–20). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- 96- Mukaremera, L.; Nielsen, K. (2017) Adaptive Immunity to *Cryptococcus neoformans* Infections. *J Fungi*, 3, 64. <https://doi.org/10.3390/jof3040064>
- 97- Murphy, J. W. Zhou, A. Wong, S. C. (1997) Direct interactions of human natural killer cells with *Cryptococcus neoformans* inhibit granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha production. *ASM Journals. Infection and Immunity*. Vol. 65, No. 11.
- 98- Nelson, B. N., Daugherty, C. S., Sharp, R. R., Booth, J. L., Patel, V. I., Metcalf, J. P., Jones, K. L., & Wozniak, K. L. (2022). Protective interaction of human phagocytic APC subsets with *Cryptococcus neoformans* induces genes associated with metabolism and antigen presentation. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1054477>
- 99- Nelson, B. N., Hawkins, A. N., & Wozniak, K. L. (2020). Pulmonary Macrophage and Dendritic Cell Responses to *Cryptococcus neoformans*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00037>.
- 100- Ngamskulrungrroj, P., Chang, Y., Sionov, E., Kyung, J., Kwon-Chung, K.J. (2012) The Primary Target Organ of *Cryptococcus gattii* Is Different from That of *Cryptococcus neoformans* in a Murine Model. *mBio*. 3 (3) e00103-12
- 101- Nicola, A.M., Robertson, E.J., Albuquerque, P., Derengowski, L., Casadevall, A. (2011) Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. *mBio*. 2(4):e00167-11. doi: 10.1128/mBio.00167-11. PMID: 21828219; PMCID: PMC3150755.
- 102- Nielsen, K., De Obaldia, A.L., Heitman, J. (2007) *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryot Cell*. 7;6(6):949-59. doi: 10.1128/EC.00097-07. PMID: 17449657
- 103- Nolan, S. J., Fu, M. S., Coppens, I., & Casadevall, A. (2017). *Lipids Affect the Cryptococcus neoformans-Macrophage Interaction and Promote Nonlytic Exocytosis*. <https://journals.asm.org/journal/iai>
- 104- Nosanchuk, J. D., Cleare, W., Franzot, S. P., & Casadevall, A. (1999). Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(2), 233–239. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.2.233>
- 105- O'Neill, L., Pearce, E.J. (2016) Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med* 213 (1): 15–23. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20151570>
- 106- Okagaki, L.H., Nielsen, K. (2012) Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. *Eukaryot Cell*.
- 107- Oliveira, D.L., Freire-de-Lima, C.G., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Rodrigues, M.L., and Nimrichter, L. (2010). Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infection and Immunity*, 78(4), 1601–1609. <https://doi.org/10.1128/IAI.01171-09>
- 108- Olszewski, M.A., Noverr, M.C., Chen, G.H., Toews, G.B., Cox, G.M., Perfect, J.R., Huffnagle, G.B. (2004). Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol* 164:1761–1771. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63734-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63734-0).

- 109- Osterholzer, J.J., Curtis, J.L., Polak, T., Ames, T., Chen, G.H., McDonald, R., Huffnagle, G.B., Toews, G.B. (2008) CCR2 mediates conventional dendritic cell recruitment and the formation of bronchovascular mononuclear cell infiltrates in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 181(1):610-20. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.610. PMID: 18566428;
- 110- Osterholzer, J.J., Surana, R., Milam, J.E., Montano, G.T., Chen, G.H., Sonstein, J., Curtis, J.L., Huffnagle, G.B., Toews, G.B., and Olszewski MA. 2009. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *Am. J. Pathol.* 174:932–943
- 111- Pellon, A.; Begum, N.; Sadeghi Nasab, S.D.; Harzandi, A.; Shoaie, S.; Moyes, D.L. (2022) Role of Cellular Metabolism during *Candida*-Host Interactions. *Pathogens* 11, 184. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020184>
- 112- Price, M. S., Betancourt-Quiroz, M., Price, J. L., Toffaletti, D. L., Vora, H., Hu, G., Kronstad, J. W., & Perfect, J. R. (2011). *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. *MBio*, 2(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-11>
- 113- Rajasingham, R., Govender, N.P., Jordan, A., Loyse, A., Shroufi, A., Denning, D.W., Meya, D.B., Chiller, T.M., Boulware, D.R. (2022) The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 22(12):1748-1755. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00499-6. PMID: 36049486;
- 114- Ristowi, L.C. and Davisi, J.M. (2021). The granuloma in cryptococcal disease. *PLoS Pathogens*, 17(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009342>
- 115- Rodrigues, M.L. Funding and innovation in diseases of neglected populations: the paradox of cryptococcal meningitis. (2016) *PLoS Negl Trop Dis*. 10(3): e0004429.
- 116- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C. and Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 58–67. <https://doi.org/10.1128/EC.00370-07>
- 117- Rosas-Ballina, M., Guan, X. L., Schmidt, A., & Bumann, D. (2020). Classical Activation of Macrophages Leads to Lipid Droplet Formation Without de novo Fatty Acid Synthesis. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00131>
- 118- Rose, S. and Bennuri, S. C. (2018). Mitochondrial metabolism. In *The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine* (pp. 73–103). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5311-5_5
- 119- Saha, D.C., Goldman, D.L., Shao, X., Casadevall, A., Husain, S., Limaye, A. P., Lyon, M., Somani, J., Pursell, K., Pruett, T. L. and Singh, N. (2007). Serologic evidence for reactivation of cryptococcosis in solid-organ transplant recipients. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(12), 1550–1554. <https://doi.org/10.1128/CVI.00242-07>.
- 120- Said, H. M. (2004) Water-Soluble Vitamins: Absorption, Metabolism, and Deficiency. *Encyclopedia of Gastroenterology*. Elsevier. 631-637. ISBN 9780123868602. <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00096-4>.
- 121- Santiago-Tirado, F.H., Onken, M.D., Cooper, J.A., Klein, R.S. and Doering, T.L. (2017). Trojan horse transit contributes to blood-brain barrier crossing of a eukaryotic pathogen. *MBio*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02183-16>.
- 122- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. In *Cell* (Vol. 140, Issue 6, pp. 821–832). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
- 123- Seoane, P.I., May, R.C. (2020) Vomocytosis: What we know so far. *Cellular Microbiology*. 22:e13145. <https://doi.org/10.1111/cmi.13145>
- 124- Shapiro, R., Robbins, N., Cowen, L. (2011) Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* (75) 21- 67. 10.1128/MMBR.00045-10.
- 125- Shi, M., Colarusso, P., Mody, C.H. (2012) Real-time in vivo imaging of fungal migration to the central nervous system. *Cell Microbiol.* Dec;14(12):1819-27. doi: 10.1111/cmi.12027. Epub 2012 Oct 11. Erratum in: *Cell Microbiol.* 2013 May;15(5):841. Calaruso, Pina [corrected to Colarusso, Pina]. PMID: 22966777.
- 126- Shi, M., Li, S. S., Zheng, C., Jones, G. J., Kim, K. S., Zhou, H., Kubes, P. and Mody, C. H. (2010). Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *Journal of Clinical Investigation*, 120(5), 1683–1693. <https://doi.org/10.1172/JCI41963>

- 127- Steenbergen, J.N., Shuman, H.A. and Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. In *National Institutes of Health*. www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.261418798
- 128- Steinert, M., Emo^ody, L., Emo^ody, E., Amann, R., Jo^o, J., & Hacker, J. (1997). Resuscitation of Viable but Nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 63, Issue 5). <https://journals.asm.org/journal/aem>
- 129- Stolp, H. B., Liddelow, S. A., Sá-Pereira, I., Dziegielewska, K. M., & Saunders, N. R. (2013). Immune responses at brain barriers and implications for brain development and neurological function in later life. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7, 61. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00061>
- 130- Subramani, A., Griggs, P., Frantzen, N., Mendez, J., Tucker, J., Murriel, J., Sircy, L. M., Millican, G. E., McClelland, E. E., Seipelt-Thiemann, R. L., & Nelson, D. E. (2020). Intracellular *Cryptococcus neoformans* disrupts the transcriptome profile of M1- And M2-polarized host macrophages. *PLoS ONE*, 15(8 August). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233818>
- 131- Subramani, A., Griggs, P., Frantzen, N., Mendez, J., Tucker, J., Murriel, J., Sircy, L. M., Millican, G. E., McClelland, E. E., Seipelt-Thiemann, R. L., & Nelson, D. E. (2020). Intracellular *Cryptococcus neoformans* disrupts the transcriptome profile of M1- And M2-polarized host macrophages. *PLoS ONE*, 15(8 August). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233818>
- 132- Syme, R.M., Spurrell, J.C., Amankwah, E.K, Green, F.H., Mody, C.H. (2002) Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fcγ receptor II for presentation to T lymphocytes. *Infect Immun*. 70(11):5972-81. doi: 10.1128/IAI.70.11.5972-5981. PMID: 12379672
- 133- Takeuchi O, Akira S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. Mar 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022. PMID: 20303872.
- 134- Tannahill, G.M. et al. (2013) Succinate is an inflammatory signal that induces IL- 1β through HIF-1α. *Nature*. v.496, p. 238–242.
- 135- Tavares, A.H., Bürgel, P.H. and Bocca, A.L. (2015). Turning Up the Heat: Inflammasome Activation by Fungal Pathogens. *PLoS Pathogens*, 11(7), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004948>
- 136- Trajkovic, Stepanovic, Samardzic, Jankovic, Badovinac, and Mostarica Stojkovic, (2000), *Cryptococcus neoformans* Neutralizes Macrophage and Astrocyte Derived Nitric Oxide without Interfering with Inducible Nitric Oxide Synthase Induction or Catalytic Activity — Possible Involvement of Nitric Oxide Consumption. *Scandinavian Journal of Immunology*, 51: 384-391. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2000.00683.x>
- 137- Tschopp, J. (2011). Mitochondria: Sovereign of inflammation? In *European Journal of Immunology* (Vol. 41, Issue 5, pp. 1196–1202). <https://doi.org/10.1002/eji.201141436>
- 138- Tucey, T., Verma J., Harrison P., Snelgrove S., Lo T., Scherer, A., Barugahare, A., Powell, D., Wheeler, R., Hickey, M., Beilharz, T., Naderer, T., Traven A. (2018). Glucose Homeostasis Is Important for Immune Cell Viability during *Candida* Challenge and Host Survival of Systemic Fungal Infection. *Cell Metabolism*, 988-1006.e7, 27(5).
- 139- Tucker, S.C., Casadevall, A. (2002) Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5;99(5):3165-70. doi: 10.1073/pnas.052702799. PMID: 11880650.
- 140- Van den Bossche, J. et al. (2016) Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages. *Cell Rep*. v.17. p.684–696.
- 141- Varol, C. Mildner, A. and Jung, S. (2015) Macrophages: development and tissue specialization. *Annual Review of Immunology*, vol. 33, no. 1, pp. 643–675.
- 142- Walsh, N. M., Botts, M. R., McDermott, A. J., Ortiz, S. C., Wüthrich, M., Klein, B., & Hull, C. M. (2019). Infectious particle identity determines dissemination and disease outcome for the inhaled human fungal pathogen *Cryptococcus*. *PLoS Pathogens*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007777>
- 143- Wang, L., Pavlou, S., Du, X., Bhuckory, M., Xu, H., & Chen, M. (2019). Glucose transporter 1 critically controls microglial activation through facilitating glycolysis. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0305-9>

- 144- Wang, Y., Li, N., Zhang, X. and Horng, T. (2021). Mitochondrial metabolism regulates macrophage biology. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 297, Issue 1). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100904>
- 145- Wang, Y., Zhao, M., Liu, S. *et al* (2020). Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death Dis* 11, 924 <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03127-z>
- 146- Xiomara, M., Stein, F. (2006) Nitric Oxide. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. Volume 17, Issue 2; 55-57, ISSN 1045-1870. <https://doi.org/10.1053/j.spid.2006.04.002>
- 147- Yang X, Wang H, Hu F, Chen X, Zhang M. (2019) Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from neutrophils in the brain vasculature. *Cell Commun Signal*. 17(1):117. doi: 10.1186/s12964-019-0429-0. PMID: 31500648.
- 148- Zaragoza, O., and Nielsen, K. (2013). Titan cells in *C. neoformans*: cells with a giant impact. *Acta Horticulturae*, 588(4), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.03.006>
- 149- Zaragoza, O., Garcia-Rivera, J., Nosanchuk, J.D., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J., Casadevall, A. (2010) Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog*. 6(6):1–18
- 150- Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., Jesus, M., Frases, S., Casadevall, A, M. (2009). The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. 2164(09), 1–64. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01204-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01204-0).The
- 151- Zeng, B., Zhao, G., Cao, X., Yang, Z., Wang, C., Hou, L. (2012) Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella typhi*. *Biomed Res Int*. 2013;2013:907170. doi: 10.1155/2013/907170. PMID: 23509799.
- 152- Zhang Y, Wang F, Tompkins KC, McNamara A, Jain AV, Moore BB, Toews GB, Huffnagle GB, and Olszewski MA. 2009. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am. J. Pathol*. 175:2489–2500.
- 153- Zhang, Z., Chen, C., Yang, F., Zeng, Y.X., Sun, P., Liu, P., Li, X. (2022) Itaconate is a lysosomal inducer that promotes antibacterial innate immunity. *Mol Cell*. 82(15):2844-2857.e10. doi: 10.1016/j.molcel.2022.05.009. Epub 2022 Jun 3. PMID: 35662396.
- 154- Zheng, C.F., Ma, L.L., Jones, G.J., Gill, M.J., Krensky, A.M., Kubes. P., Mody. C.H. (2007) Cytotoxic CD4+ T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients. *Blood*. 109(5):2049-57. doi: 10.1182/blood-2006-03-009720. Epub 2006 Oct 12. PMID: 17038537.
- 155- Zhu X, Guo Y, Liu Z, Yang J, Tang H, Wang Y. (2021) Itaconic acid exerts anti-inflammatory and antibacterial effects via promoting pentose phosphate pathway to produce ROS. *Sci Rep*. Sep 13;11(1):18173. doi: 10.1038/s41598-021-97352-x. PMID: 34518559; PMCID: PMC8438069.