

JULIA FERRAREZI FAVORATO MORIEL GARCIA

Efeito biológico das Vesículas Extracelulares de *Cryptococcus neoformans* produzidas por *Titan Cells*.



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
MARÇO / 2022

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Leonardo Nimrichter e coorientação da Dra. Alícia Corbellini Piffer.**

## CIP - Catalogação na Publicação

F216e Ferrarezi Favorato Moriel Garcia, Julia  
Efeito biológico das vesículas extracelulares de  
Cryptococcus neoformans produzidas por Titan Cells.  
/ Julia Ferrarezi Favorato Moriel Garcia. -- Rio de  
Janeiro, 2022.  
53 f.

Orientador: Leonardo Nimrichter.  
Coorientadora: Alicia Corbellini Piffer.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Macrófagos. 2. Cryptococcus neoformans. 3.  
Vesículas extracelulares. 4. Titan Cells. I.  
Nimrichter, Leonardo, orient. II. Corbellini  
Piffer, Alicia, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**ALUNO: Julia Ferrarezi Favorato Moriel Garcia**  
DRE: 118088411

BANCA EXAMINADORA: Profa. Eliana Barreto Bergter (Presidente)  
Profa. Alessandra D'Almeida Filardy  
Prof. Rodrigo Rollin Pinheiro  
Profa. Daniela Sales Alviano (Suplente)

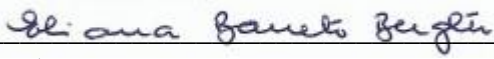
Título da Monografia: **“Efeito biológico das vesículas extracelulares de *Cryptococcus neoformans* produzidas por Titan Cells”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/wcv-jjcy-ura>  
Data e hora de início: **11 de março de 2022 às 10:00h**

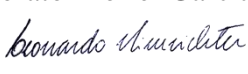
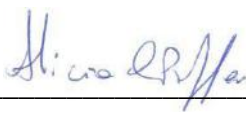
Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **9,0** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.


Rio de Janeiro, 11 de março de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
9,0	Profa. Eliana Barreto Bergter
9,0	Profa. Alessandra D'Almeida Filardy
9,0	Prof. Rodrigo Rollin Pinheiro
	Profa. Daniela Sales Alviano

Presidente da banca   
Profa. Eliana Barreto Bergter

Aluno   
Julia Ferrarezi Favorato Moriel Garcia

Orientador:    
Prof. Leonardo Nimrichter / Coorientador: PhD Alicia Corbellini Piffer

Coordenador   
de TCC Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Fernanda e Cezário, pelo amor e  
confiança.*

*Aos demais familiares.*

*Às minhas amigas por todo o carinho e  
apoio.*

## AGRADECIMENTOS

Essa jornada da graduação foi um momento que pude vivenciar diversas situações. Situações desafiadoras que me fizeram questionar se aguentaria até o final, mas elas também me fizeram mais forte, com mais responsabilidade e sabedoria para crescer como pessoa e como profissional. Gostaria de começar agradecendo primeiramente...

À Deus, pela minha vida e pela minha saúde, e também por sempre colocar pessoas especiais em meu caminho.

Ao Instituto de Graduação de Microbiologia e Imunologia da UFRJ.

Ao CNPq e PIBIC, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador e professor Leonardo Nimrichter, por ter acreditado no meu potencial, por me orientar com compreensão e parceria desde o início que entrei na iniciação científica. Pelos ensinamentos e incentivo durante toda a trajetória, obrigada por ter passado sua sabedoria e seus conselhos profissionais para me auxiliar em minha formação acadêmica.

À minha coorientadora Alícia Corbellini, por me tranquilizar nos momentos de tensão e pela maneira que me auxiliou durante esse aprendizado. Obrigada por estar sempre disponível para me ajudar e abrir minha mente nesse mundo da pesquisa, fazendo com que eu pense cada vez mais e tenha mais ansiedade em buscar respostas e conhecimentos para minha vida.

Ao pesquisador Leandro Honorato que me auxiliou também na iniciação científica, compartilhando seus ensinamentos com calma e tranquilidade.

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta Monografia.

À minha professora de Biologia do Ensino Médio Tathiana, que me incentivou a entrar na graduação e torceu para minha formação.

Aos meus pais, Fernanda e Cezário, pelo amor e pelo incentivo desde sempre em meus estudos, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e dando tudo aquilo que eu sempre precisei para conseguir concluir essa graduação. Tudo o que eu consegui conquistar pessoalmente e profissionalmente só foi possível pelo amor, apoio e dedicação que vocês tiveram por mim. Agradeço pela paciência por toda essa caminhada que finalmente foi concluída, mas que tiveram obstáculos, estresses, surtos e nervosismos para que pudesse dar tudo certo. Finalmente compartilho essa conquista e minha alegria com vocês e por todas que estarão por vir. Amo vocês.

Ao meu falecido tio Marcelo, biólogo, professor e amante da vida, que foi um dos meus maiores incentivos para iniciar uma graduação no ramo da biologia por sempre ter demonstrado sua paixão na área. Minhas eternas saudades.

Aos meus queridos familiares, Angela, Romildo e Patrícia que, mesmo estando longe, sempre acreditaram e torceram por mim.

Às minhas amigas do Grupo Seleção Natural da faculdade, que desde o início nos apoiamos, em meio ao caos, alegria e amizade, para que conseguíssemos chegar ao final dessa graduação, sempre juntas, apesar de todas as adversidades.

A banca por ter aceitado nosso convite.

A todos que, de alguma forma, contribuíram na elaboração e execução dessa Monografia.

*“A vida não é fácil para ninguém. Mas... O que importa? É necessário ter persistência e, acima de tudo, confiar em nós mesmos. Devemos acreditar que somos dotados para realizar uma determinada coisa e que essa coisa deve ser alcançada a qualquer custo”.*

*(Marie Curie)*



## RESUMO

**JULIA FERRAREZI FAVORATO MORIEL GARCIA**

### **EFEITO BIOLÓGICOS DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* PRODUZIDAS POR TITAN CELLS**

**Orientador: LEONARDO NIMRICHTER**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans* é um dos principais agentes causadores da criptococose, uma micose invasiva que afeta, principalmente, pessoas imunossuprimidas, sendo responsável por 181.100 mortes anuais registradas globalmente. A via mais comum de infecção por esse fungo é a respiratória, onde o indivíduo inala os esporos ou leveduras dessecadas. Atingindo o pulmão, as leveduras podem permanecer em latência até conseguir se replicar, processo frequentemente relacionado com queda na imunidade do hospedeiro. A partir do pulmão, o fungo pode escapar do sistema imune e se disseminar pela circulação sanguínea, chegando ao sistema nervoso central, no qual pode provocar um quadro de meningite criptocócica altamente letal. O principal fator de virulência de *C. neoformans* é sua cápsula polissacarídica, constituída, principalmente, por glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas. Nosso grupo demonstrou que ao menos parte da GXM é transportado para o espaço extracelular, juntamente com outras estruturas, através de vesículas extracelulares (VEs). As VEs produzidas por leveduras se mostraram capazes de ativar macrófagos, aumentando suas atividades microbicidas e promovendo a produção de citocinas. Além da cápsula polissacarídica, a capacidade de um subconjunto de células criptocócicas de se diferenciar em células gigantes denominadas de “Titan Cells” (TC), com tamanho médio entre 50 e 100 µm de diâmetro, vem sendo associada a sobrevivência desse fungo no hospedeiro. Essas células são altamente resistentes ao estresse oxidativo e são capazes de inibir o processo de fagocitose por células de defesa, sendo aparentemente fundamentais na progressão da doença. Neste trabalho aplicamos um protocolo recente, desenvolvido para obter *Titan cells* in vitro com o intuito de padronizar essa técnica no laboratório, isolar VEs desse tipo celular e caracterizá-las. Inicialmente, conseguimos obter essa morfologia em laboratório e comparamos os diâmetros das células controle com as células TC, como também a quantidade dessas células em cultura quando comparamos às células em tamanho normal. Foi observado que as células presentes em culturas TC possuem de fato, um tamanho aumentado quando comparadas as células controle de *C. neoformans* H99 concluindo que esses estresses levam à mudança morfológica da célula. Suas VEs também foram isoladas corretamente, e realizamos a comparação de esterol e proteína presentes nessa estrutura. As VEs obtidas de TCs, apesar do resultado não ter tanta diferença significativa, apresentam uma tendência de ter maior quantidade de esterol do que as VEs obtidas das células controle enquanto não há uma diferença na quantidade de esterol, embora também o desvio padrão seja maior nesse caso. Por ter uma grande importância na patogênese, foi também investigado a participação das VEs produzidas por leveduras e por TC durante o processo infeccioso de *C. neoformans* em larvas do inseto *Galleria mellonella*. Após a infecção das larvas com o fungo, foi administrado VEs de TC e células controle e foi observado durante a infecção, que não houve diferenças entre células controles de *C. neoformans* H99 e de cultura TC, portanto seria necessárias maiores investigações quanto ao papel das VEs dessas células em experimentos posteriores.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, Vesículas extracelulares, Macrófagos, *Titan Cells*.

**ABSTRACT****JULIA FERRAREZI FAVORATO MORIEL GARCIA****BIOLOGICAL EFFECTS OF EXTRACELLULAR VESICLES OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* PRODUCED BY TITAN CELLS****Orientador: LEONARDO NIMRICHTER**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

The encapsulated yeast *Cryptococcus neoformans* is one of the main causative agents of cryptococcosis, an invasive mycosis that mainly affects immunosuppressed people, being responsible for 181,100 annual deaths recorded globally. The most common route of infection by this fungus is respiratory, where the individual inhales the spores or desiccated yeasts. After reaching the lung, the yeasts can remain in a latent state until they are able to replicate, a process often related to a drop in the host's immunity. From the lung, the fungus can escape the immune system and spread through the bloodstream, reaching the central nervous system, where it can cause highly lethal cryptococcal meningitis. The main virulence factor of *C. neoformans* is its polysaccharide capsule, consisting mainly of glucuronoxylomannan (GXM), galactoxylomannan (GalXM) and mannoproteins. Our group demonstrated that at least part of the GXM is transported to the extracellular space, along with other structures, through extracellular vesicles (EVs). The EVs produced by yeasts were able to activate macrophages, increasing their microbicidal activities and promoting the production of cytokines. In addition to the polysaccharide capsule, the ability of a subset of cryptococcal cells to differentiate into giant cells called "*Titan Cells*" (TC), with an average size between 50 and 100  $\mu\text{m}$  in diameter, has been associated with the survival of this fungus in the host. These cells are highly resistant to oxidative stress and are able to inhibit the process of phagocytosis by defense cells, apparently being fundamental in the progression of the disease. In this work we apply a recent protocol developed to obtain *Titan cells in vitro* with the aim of standardizing this technique in the laboratory, isolating EVs of this cell type and characterizing them. Initially, we were able to obtain this morphology in the laboratory and compared the diameters of control cells with TC cells, as well as the number of these cells in culture when compared to normal-sized cells. It was observed that the cells present in TC cultures have, in fact, an increased size when compared to the control cells of *C. neoformans* H99, concluding that these stresses lead to the morphological change of the cell. Their EVs were also correctly isolated, and we compared the sterol and protein present in this structure. The EVs obtained from TCs, despite the result not having much significant difference, show a tendency to have a greater amount of sterol than the EVs obtained from control cells while there is no difference in the amount of sterol, although the standard deviation is also greater in this case. Due to its great importance in pathogenesis, the participation of EVs produced by yeasts and TC during the infectious process of *C. neoformans* in larvae of the insect *Galleria mellonella* was also investigated. After infection of the larvae with the fungus, EVs of TC and control cells were administered and it was observed during infection that there were no differences between control cells of *C. neoformans* H99 and TC culture, therefore, further investigations would be necessary regarding the role of these cells. EVs from these cells in later experiments.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, Extracellular vesicles, Macrophages, *Titan Cells*.

## Resumo para Pessoas Leigas

O fungo chamado *Cryptococcus neoformans* é uma das principais causas de uma doença denominada criptococose. Essa doença afeta pessoas imunossuprimidas, ou seja, pessoas que possuem uma imunidade baixa, como por exemplo diabéticos, pessoas que fizeram transplantes de órgãos ou pessoas portadoras de HIV com AIDS. É responsável por 181.100 mortes por ano registradas no mundo todo. A doença ocorre quando uma pessoa aspira o fungo, ele vai para o pulmão e fica escondido para conseguir se multiplicar quando o indivíduo apresentar uma queda em sua imunidade. Quando o fungo chega no pulmão, ele pode ir para a circulação do sangue chegando até o cérebro (sistema nervoso central) causando uma infecção chamada meningite criptocócica que pode levar a morte. O fungo possui uma estratégia para não ser eliminado pelo nosso organismo, ele consegue formar um escudo protetor ao redor da célula, que é chamado de cápsula. Existe também as vesículas extracelulares (VEs), que são como sacos que possuem diversas moléculas que auxiliam a sobrevivência dessas células do fungo no nosso corpo. Essas vesículas são formadas dentro da célula e, depois, enviadas para fora para fazer contato com o ambiente de fora e não deixar que o fungo seja destruído. Porém, esse fungo no pulmão, consegue se tornar um fungo com o tamanho maior que o normal, essas células são chamadas de "Titan Cells" (TC). Por essas células serem gigantes, elas não vão ser eliminadas pelas nossas células de defesa porque as nossas são bem menores. Para acontecer a eliminação, seria necessário que as nossas células elvassem as células invasoras, mas isso não ocorre. Neste trabalho aplicamos uma nova maneira que já foi estudada recentemente para obter *Titan cells* com o intuito de padronizar essa técnica no laboratório, obter VEs desse tipo celular e caracterizá-las. Inicialmente, conseguimos obter essa morfologia em laboratório e comparamos os diâmetros das células controle com as células TC, como também a quantidade dessas células em cultura quando comparamos às células em tamanho normal. Foi observado que as células presentes em culturas TC possuem de fato, um tamanho aumentado quando comparadas as células controle de *C. neoformans* H99, concluindo que diversos fatores levam à mudança das características da célula. Suas VEs também foram obtidas corretamente, e realizamos a comparação de moléculas chamadas de esterol e proteína presentes nessa estrutura. As VEs obtidas de TCs apresentam uma tendência de ter maior quantidade de esterol do que as VEs obtidas das células controle enquanto não há uma diferença na quantidade de esterol. Investigamos também a participação das VEs produzidas por esse fungo e por TC durante a infecção de *C. neoformans* em larvas do inseto *Galleria mellonella*. Após a infecção das larvas com o fungo, foi adicionado VEs de TC e células controle e foi observado durante a infecção, que não houve diferenças entre células controles de *C. neoformans* H99 e de cultura TC, portanto seria necessárias maiores investigações quanto ao papel das VEs dessas células em experimentos posteriores.

### LISTA DE FIGURAS:

<b>Figura 1:</b> Evolução e classificação das espécies patogênicas do gênero <i>Cryptococcus</i> : sorotipos e subtipos moleculares .....	19
<b>Figura 2:</b> Esquema de infecção do sistema nervoso central pelo <i>Cryptococcus</i> através do mecanismo de Cavallo de Tróia .....	20
<b>Figura 3:</b> Fatores de virulência associados à célula de <i>Cryptococcus</i> .....	23
<b>Figura 4:</b> Imagens da cápsula de <i>C. neoformans</i> .....	24
<b>Figura 5:</b> Modelo proposto para a montagem da cápsula do <i>Cryptococcus neoformans</i> . .....	26
<b>Figura 6:</b> Biogêneses de vesículas extracelulares produzidas por fungos .....	27
<b>Figura 7:</b> Diferentes populações de células encontradas nos pulmões de camundongos infectados com <i>C. neoformans</i> .....	29
<b>Figura 8:</b> <i>Cryptococcus neoformans</i> cresce como uma população heterogênea de leveduras e <i>Titan Cells</i> .....	30
<b>Figura 9:</b> Comparação das TC e células de <i>C. neoformans</i> controle .....	36
<b>Figura 10:</b> Análise do tamanho celular comparando comprimento do corpo e o corpo + cápsula .....	37
<b>Figura 11:</b> Comparação da relação de proteínas/célula e esterol/célula nas culturas de <i>C. neoformans</i> TC e culturas controle .....	39
<b>Figura 12:</b> Avaliação da sobrevivência dos diversos tipos celulares de <i>C. neoformans</i> + VEs .....	39

**LISTA DE TABELAS:**

<b>Tabela 1:</b> Contagem de células da cultura de <i>C. neoformans</i> TC e cultura controle e a obtenção da porcentagem quanto a presença de TC .....	36
<b>Tabela 2</b> – Comparação dos resultados de dosagem de esterol e proteínas .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CCV	Vesículas revestidas de clatrina
cels	Células
° C	Graus Celsius
CLRs	Receptores do tipo C-lectina
cm	Centímetros
CnMV <sub>s</sub>	Microvesículas extracelulares produzidas por <i>C. neoformans</i>
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EVs	“Extracellular Vesicles” vesículas extracelulares
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucuronoxilomanana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Hrs / h	Horas / hora
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleucina
mg	Miligramas
$\mu$ g	Microgramas
$\mu$ m	Micrometro
$\mu$ M	Micromolar
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Tampão biológico
MVEs	Endossomos multivesiculares
N.D.	Não detectado
NK	Célula <i>natural killer</i>
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBS	“Phosphate Buffered Saline” tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PRRs	receptores de reconhecimento padrão
RPM	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
spp.	Espécies
TC	Titan cells
TCM	Titan Cell Medium
Th	Células T helper
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Var.	Variedade

## ÍNDICE

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
RESUMO PARA LEIGOS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiv
1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 <i>Cryptococcus</i> spp .....	16
1.1.2 Histórico e taxonomia .....	17
1.2 Infecções .....	19
1.2.1 Via de infecção .....	19
1.2.2 Resposta imune à criptococose .....	21
1.3 Fatores de virulência .....	22
1.3.1 Cápsula polissacarídica .....	24
1.3.2 Vesículas extracelulares .....	26
1.4 <i>Titan Cell</i> .....	28
1.5 Modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i> .....	31
2 JUSTIFICATIVA .....	32
3 OBJETIVOS .....	33
3.1 Objetivo geral .....	33
3.2 Objetivos específicos .....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
4.1 Obtenção de TC .....	33
4.2 Análise e medição das células típicas e TC .....	34
4.3 Obtenção das vesículas de <i>C. neoformans</i> TC .....	34
4.4 Dosagem de esterol .....	34
4.5 Dosagem de proteínas .....	35
4.6 Ensaio de sobrevivência com larvas do inseto <i>Galleria mellonella</i> .....	35
5 RESULTADOS .....	35
6 DISCUSSÃO .....	40
7 CONCLUSÕES .....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## 1. Introdução

### 1.1 *Cryptococcus* spp.

Os fungos são amplamente conhecidos pela capacidade de decompor a matéria orgânica, mas também, algumas espécies, são capazes de provocar infecções, tanto em plantas quanto em animais (Mitchell e Perfect, 1995). As infecções fúngicas normalmente não costumam evoluir para quadros mais graves, tendo suas manifestações clínicas mais brandas (GarciaRodas *et al.*, 2019; Mitchell e Perfect, 1995). Porém, quando se trata de indivíduos que possuem sua imunidade comprometida, como indivíduos com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) que desenvolvem o quadro imunossupressivo, diabéticos, transplantados e entre outros, as infecções fúngicas provocam manifestações mais severas podendo levar até mesmo ao óbito (Mitchell e Perfect, 1995). Os causadores das doenças mais graves em humanos são organismos do gênero *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis*. (Brown *et al.*, 2012).

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada que pode sobreviver tanto em plantas como em animais (Mitchell e Perfect, 1995). As células de *C. neoformans* medem entre 2 a 4 µm de diâmetro, possuem estrutura leveduriforme que se apresentam de forma globosa ou ovalada e dispõem de uma cápsula polissacarídica em seu redor, a qual é um dos fatores de virulência que possibilita resistência à dessecação, que possibilita a vida intracelular e mecanismo de evasão à resposta imune celular (Coelho, Bocca e Casadevall, 2014; Doering, 2000).

*Cryptococcus* é classificado no filo Basidiomycota que é composto por mais de setenta espécies, porém somente duas delas são caracterizadas por causar doença, *C. neoformans* e *C. gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Maziarz, e Perfect, 2016). A criptococose, doença causada por essas espécies, até o início dos anos 80, era considerada de rara ocorrência; no entanto, com o surgimento da AIDS ela passou a ser mais frequente e se tornou epidêmica, sendo uma doença de grande importância clínica, ocupando o quarto lugar entre as doenças infecciosas na época (Nishikawa *et al.*, 2003).

A criptococose é considerada uma micose sistêmica em que o fungo é oportunista e acaba gerando, dependendo do caso, sintomas leves ou então sintomas mais graves como a meningite criptocócica que pode ser letal para o indivíduo (Morettibranchini e Telles, 2004; Kon *et al.*, 2008). Atualmente, é estimado que a meningite criptocócica é responsável por 181.100 mortes anuais, sendo que é associada a 15% das mortes relacionadas à AIDS globalmente



(Rajasingham *et al.*, 2017). Outras comorbidades também aumentam a probabilidade do paciente contrair a criptococose, como por exemplo leucemia, linfoma, lúpus eritematoso sistêmico, além do uso de terapias imunossupressoras e dos pacientes transplantados (Nishikawa *et al.*, 2003).

### 1.1.2 Histórico e Taxonomia

No ano de 1894, uma mulher de 31 anos de idade se queixou de uma lesão na perna e após diagnóstico clínico-patológico foi considerado o primeiro caso de criptococose humana, descrito por Otto Busse e Abraham (Knoke e Schwesinger, 1994). Através do diagnóstico, isolamento deste microrganismo e comparação com os demais já existentes, a levedura encontrada foi denominada *Saccharomyces hominis* (Knoke e Schwesinger, 1994; Heitman *et al.*, 2010). Nesse mesmo ano foi isolado por Sanfelice leveduras em um suco de pêssigo que sofreu fermentação, as quais possuíam uma cápsula característica em sua estrutura. Após um ano de estudos com essa descoberta, provou a patogenicidade em animais de laboratório e nominou a espécie como *Saccharomyces neoformans* (Casadevall e Perfect, 1998; Barnett, 2010).

Em 1901, um estudo guiado por Vuillemin isolou amostras de lesões pulmonares de suínos e de leite bovino e constatou a presença de leveduras esféricas encapsuladas as quais eram do mesmo gênero que as leveduras isoladas anteriormente pelos demais pesquisadores. O organismo, antes chamado de *Saccharomyces neoformans*, foi então renomeado para *Cryptococcus*. Algumas diferenças foram observadas na presença de estruturas que classificassem este novo gênero em *C. hominis* e *C. neoformans*, que se baseava na incapacidade de fermentação de carboidratos e de produzir ascósporos, o que diferencia *Cryptococcus* de *Saccharomyces* (Heitman *et al.*, 2011).

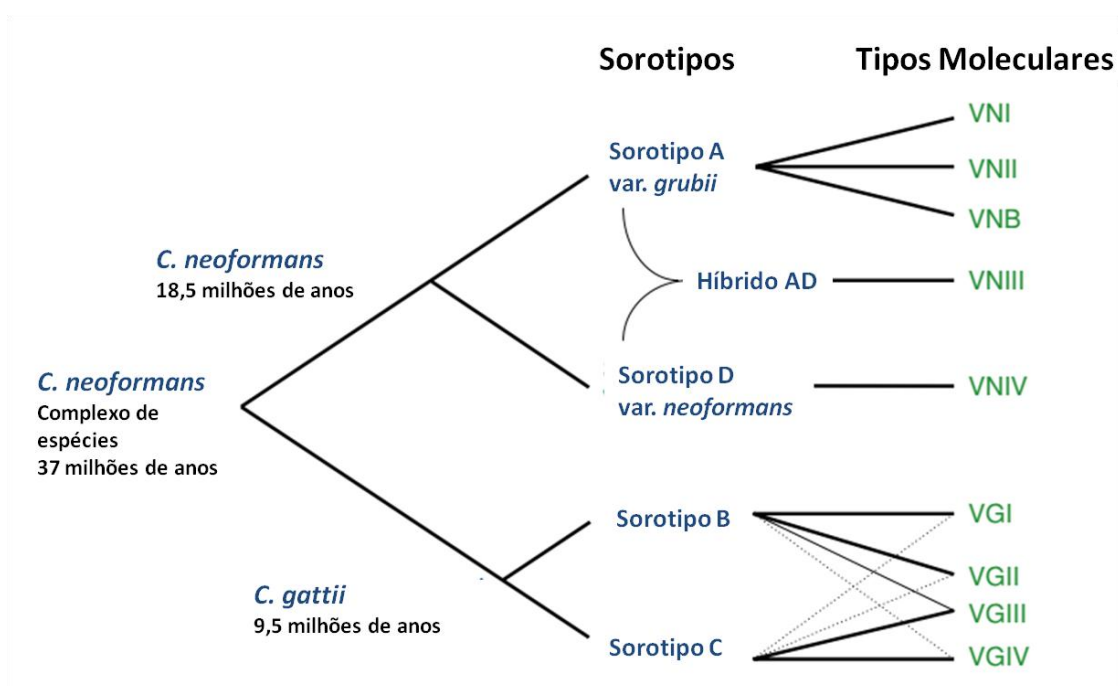
Através da dedicação em suas pesquisas no ano de 1951, Emmons evidenciou a relação entre o fungo e as fontes ambientais como excretas de pombos da espécie *Columbia livia* e madeira em decomposição (Barnett, 2010). Em 1962, Staib descreveu aspectos fisiológicos do gênero *Cryptococcus*, percebendo que o fungo quando cultivado em meio de cultura contendo fezes de pombos ou sementes de níger (*Guizotia abyssinica*) apresentavam pigmento escuro, tornando possível a diferenciação de *Cryptococcus* entre os outros fungos cultivados. Somente em 1972, em um estudo de Shaw e Kapica, revelou a identidade do pigmento como sendo melanina (Barnett, 2010).

Em um caso de meningoencefalite relatado por Gattii e Eckels no ano de 1970, foi isolado um organismo semelhante a *C. neoformans*, porém, sua morfologia era diferente do que já relatado. Este possuía um formato alongado, sendo considerado uma nova variedade e foi denominada de *C. neoformans* variedade *gattii* (Kwon-Chung e Bennett, 1978; Heitman *et al.*, 2011). Em 1970, Shadomy observou fíbulas no isolamento deste fungo, insinuando que o mesmo pertencia ao grupo dos basidiomicetos devido a condição dicariótica no desenvolvimento (Shadomy e Lurie, 1970; Casadevall e Perfect, 1998).

No ano de 1990, Ellis e Pfeiffer isolaram na Austrália, uma variedade *gattii* de um tronco de eucalipto em decomposição. Com base nesse estudo, o fungo foi isolado de outras espécies de árvores e madeiras em decomposição além de excretas de pombos e outras aves, inclusive no Brasil (Lázera, Wanke e Nishikawa, 1993; Lázera *et al.*, 2000; Chee e Lee, 2005; Kobayashi *et al.*, 2005; Pedroso, Ferreira e Candido, 2009). Em 2002 foi aceito que essa variedade era diferente da variedade *neoformans*, e através de um estudo filogenético e avaliação de características ecológicas e bioquímicas, a variedade *gattii* passou a ser considerada uma nova espécie de *Cryptococcus* (Heitman *et al.*, 2011).

Atualmente, o gênero *Cryptococcus* apresenta 70 espécies, sendo apenas duas consideradas patogênicas, *C. neoformans* e *C. gattii*, e as demais consideradas emergentes em pacientes imunodeprimidos: *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus humicola* e *Cryptococcus curvatus* (Kurtzman *et al.*, 2011). Com base em análises epidemiológicas, ecológicas, fisiológicas, fenotípicas e através de uma reação de aglutinação utilizando antissoros produzidos contra componentes da cápsula polissacarídica do fungo, as espécies foram classificadas em cinco sorotipos diferentes (A, B, C, D e AD), sendo denominados *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. gattii* (sorotipos B e C). O sorotipo AD foi classificado como sendo um híbrido diplóide (Ikeda *et al.*, 1982; Nishikawa *et al.*, 2003; D'souza *et al.*, 2004). Estudos filogenéticos sugerem que os sorotipos B e C se diferenciaram das outras espécies em cerca de 37 milhões de anos, e que o sorotipo A e D divergem em cerca de 19 milhões de anos (Xu, Vilgalys e Mitchell, 2000; Marra *et al.*, 2004). A possibilidade de sequenciar os genomas dos microrganismos a partir da evolução das técnicas de biologia molecular, e a realização do sequenciamento das cepas JEC21 e H99 de *C. neoformans*, e WM276 e R265 de *C. gattii*, foi possível classificar estas espécies em nove genótipos diferentes VNI, VNII, VNIII, VNIV, VNB, VGI, VGII, VGIII e VGIV (Figura 1), (Heitman *et al.*, 2011). No Brasil, Lacaz identificou o primeiro isolado do fungo em

humanos no ano de 1941. Em seguida, em 1944, Almeida conseguiu o mesmo feito (Reis-Filho *et al.*, 1985; Pappalardo e Melhem, 2004).



**Figura 1: Evolução e classificação das espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*: sorotipos e subtipos moleculares.** As espécies patogênicas *C. neoformans* e *C. gattii* originaram-se de um ancestral comum. Elas são subdivididas em cinco sorotipos e nove genótipos. (Adaptado de Lin e Heitman, 2006).

## 1.2 Infecção

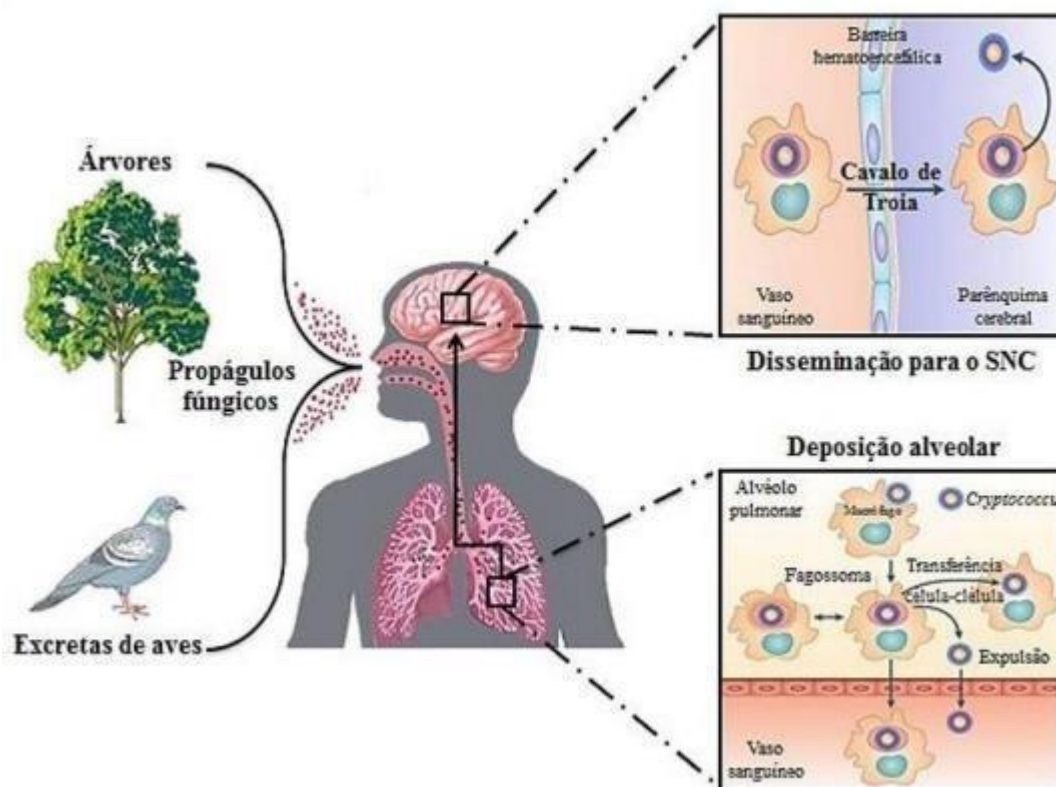
### 1.2.1 Via de infecção

A via mais comum de infecção por esse fungo é a respiratória, onde o indivíduo inala os esporos ou leveduras dessecadas de origem ambiental (Levitz, 1991) (Figura 2). Como descrito anteriormente, estudos demonstraram sua presença em excretas de animais como pombos e morcegos, também, em troncos e galhos de árvores, sendo esse último contaminado pelos animais, o que acarreta numa dispersão mais rápida do fungo uma vez que está presente em vários nichos no ambiente (Emmons, 1955; Maziarz e Perfect, 2016).

Atingindo o pulmão, as leveduras do *C. neoformans* podem ser eliminadas ou permanecer em latência até conseguir se replicar intracelularmente, quando o hospedeiro apresenta uma queda na imunidade. As formas clínicas relacionadas com a criptococose são: pulmonar regressiva em que geralmente é assintomática ou apresenta sintomas de infecção respiratória

simples; pulmonar progressiva que há uma infecção primária ou a reativação da latência; e a disseminada que ocorre uma propagação da infecção pulmonar por via hematogênica (Morettibranchini e Telles, 2004). Sendo assim, essa infecção pode se disseminar e acometer o sistema nervoso central causando meningoencefalite, a qual é caracterizada pela presença do fungo no cérebro e meninges. Esse é considerado o quadro mais agressivo e que geralmente leva à morte do paciente (Morettibranchini e Telles, 2004; Kon *et al.*, 2008). Existem ao menos três teorias que podem explicar a ocorrência do neurotropismo pelo *Cryptococcus*, sendo elas: (i) a levedura possui atração por substratos específicos presentes no SNC; ou (ii) o SNC serve como refúgio para escapar do sistema imune do hospedeiro infectado; ou (iii) pela presença de receptores específicos para esses fungos nas células neuronais (Lin e Heitman, 2006).

Além das manifestações clínicas que são mais comuns de ocorrerem nos pulmões, elas podem variar de acordo com o local onde a infecção se instala. Existem os casos assintomáticos, e os sintomáticos que normalmente apresentam febre, tosse, escarro com muco e/ou sangue. Existem dados também que relatam casos de criptococose ocular, óssea ou osteoarticular e prosteite criptocócica (Chang *et al.*, 2008; Moretti *et al.*, 2008; Chai e Teoh, 2012).



**Figura 2 – Esquema de infecção do sistema nervoso central pelo *Cryptococcus* através do mecanismo de Cavalos de Tróia.** Esse mecanismo é um mecanismo de infecção onde o fungo sobrevive dentro dos macrófagos e através da circulação sanguínea ele consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica ainda no interior da célula, chegando ao SNC (Lin e Heitman, 2006; Kronstad *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Resposta imune à criptococose

Durante a infecção por *C. neoformans*, os macrófagos alveolares são as principais células de defesa a entrar em contato com o fungo e, através da fagocitose e da liberação de altos níveis de espécies reativas de oxigênio, intermediários reativos de nitrogênio, superóxido e óxido nítrico, que danificam o DNA e uma série de frações químicas, tentam eliminar o patógeno (Bolanos e Mitchell, 1989). Porém, *C. neoformans* apresenta diversos mecanismos de evasão do sistema imune. Possuem o mecanismo de inibição da fagocitose pela presença da cápsula polissacarídica e, se forem eventualmente fagocitados, possuem a capacidade de sobrevivência intracelularmente em nessas células (Kozel *et al.*, 1988; Bolanos e Mitchell, 1989; Levitz e DiBenedetto 1989; Zaragoza *et al.*, 2003). Após a entrada no pulmão, as células fúngicas conseguem entrar e sair de dentro de macrófagos de acordo com sua necessidade através do mecanismo de vomocitose que não causa danos nessas células. Com isso, as células conseguem utilizar essas células do sistema imune para chegar até o sítio do sistema nervoso central o qual possui neurotropismo (Buchanan e Murphy, 1998). Essas passagens pelas células e tecidos do organismo ocorre através da paracitose, em que há a utilização das proteases para migração transendotelial, como também a transcitose que é uma combinação de exocitose e endocitose a qual o ácido hialurônico do fungo se liga a CD44 do endotélio, ocorre diversos remodelamentos para a célula ser englobada e conseguir realizar a passagem pelo endotélio. Nesse contexto, destaca-se o mecanismo conhecido como cavalo de Tróia, onde o fungo sobrevive dentro dos macrófagos e através da circulação sanguínea ele consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica ainda no interior da célula, chegando ao SNC (Buchanan e Murphy, 1998; Kon *et al.*, 2008; Gullo *et al.*, 2013; Nelson, Hawkins, e Wozniak, 2020).

As células dendríticas atuam também na linha de defesa do hospedeiro e agem no reconhecimento deste patógeno, através do mecanismo de fagocitose (Kozel *et al.*, 1988; Bolanos e Mitchell 1989; Levitz e DiBenedetto 1989; Zaragoza *et al.*, 2003). Uma vez no interior das células dendríticas, a fusão fagolisossomal leva a degradação de componentes fúngicos seguido da apresentação de antígenos para outras células de defesa (Zaragoza *et al.*, 2003).

Como descrito anteriormente, *C. neoformans* possui diversas proteínas, incluindo componentes enzimáticos, que servem como fatores para a sobrevivência frente a resposta imune inata, além de estruturas não proteicas, como melanina e a cápsula polissacarídica

(Rodrigues *et al.*, 2008). Portanto, em uma resposta inata, a qual é uma resposta inicial frente a uma infecção, ela pode agir de modo não tão efetor, controlando parcialmente a infecção, de acordo com os diversos fatores de escape do sistema imune que o fungo possui. A partir disso, de acordo com os reconhecimentos por células da imunidade, é necessário modular uma resposta imunidade adaptativa para gerar uma resposta mais específica aos estímulos que foram apresentados pelo patógeno e assim, reestabelecer o equilíbrio e eliminar o agente invasor (Kozel *et al.* 1988; Bolanos e Mitchell 1989; Levitz e DiBenedetto 1989; Zaragoza *et al.*, 2003).

Para uma resposta apropriada, os linfócitos T CD4+ são os mais importantes, e entre os subtipos que se diferenciam estão em: T helper Th1 que é responsável pela resposta pró-inflamatória caracterizada pelas interleucinas IL-2, IL-12, IL-18, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$ , e Th2 que é responsável pela resposta inflamatória, de resolução da inflamação caracterizada pelas interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 (Amsen *et al.*, 2004; Romani, 2004). Foi descrito que o contato das células de defesa com *C. neoformans*, dentre elas, célula natural killer (NK), linfócitos T CD4 e T CD8, e também macrófagos, revelam uma defesa do tipo Th1 com uma alta produção de TNF-  $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e interleucinas (Kon *et al.*, 2008; Gullo *et al.*, 2013).

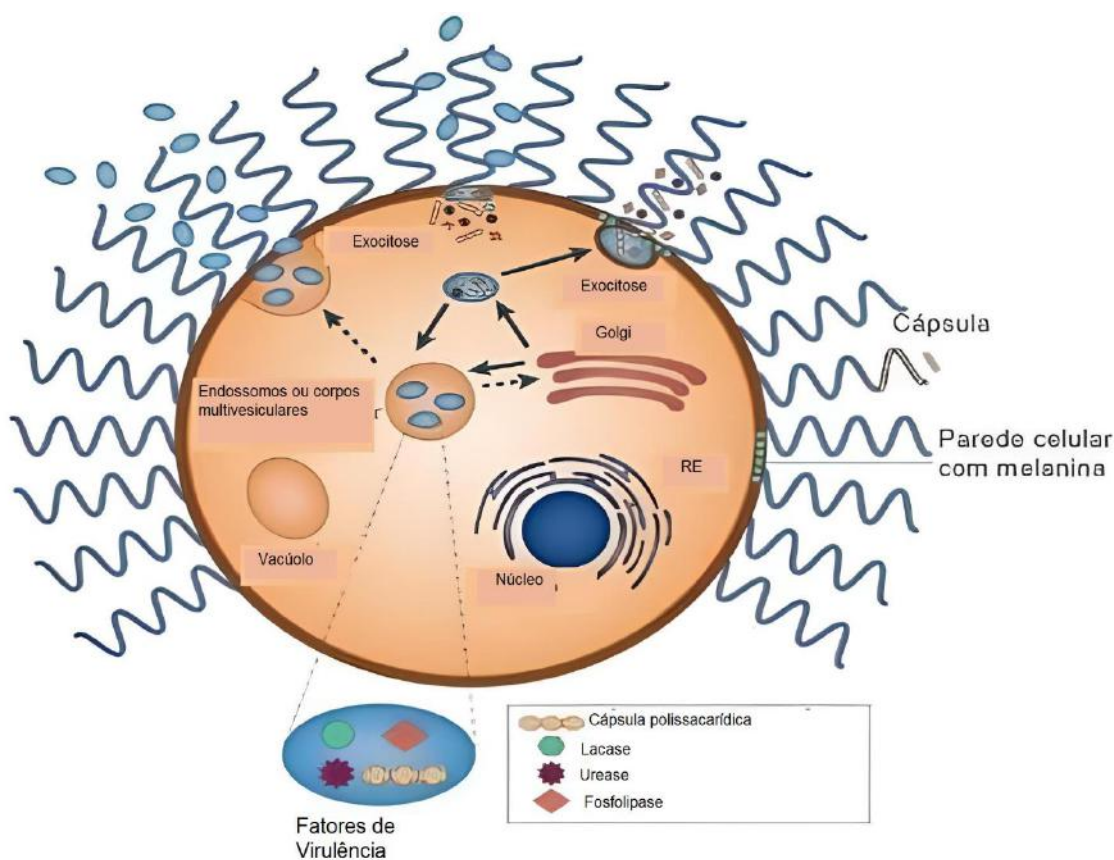
A relação das atividades dos subtipos Th1 ou Th2 vai depender do reconhecimento inicial da imunidade inata através de seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs) reconhecendo os padrões moleculares associados a patógenos ou a dano (PAMPs e DAMPs), e em seguida, vai ocorrer a ativação das células do sistema imune adaptativo (Cunha, Romani e Carvalho, 2010). As duas famílias principais que estão envolvidas neste reconhecimento são as dos receptores *Toll-like* (TLRs) e dos receptores do tipo C-lectina (CLRs). Alguns TLRs já foram descritos na infecção por *C. neoformans* como sendo capazes de reconhecer PAMPs, sendo eles os TLRs 2, 4 e 9, sendo que o 2 e o 4 estão presentes no reconhecimento de polissacarídeos da cápsula fúngica, enquanto o TLR9 se apresenta importante no reconhecimento do DNA fúngico (Cunha, Romani e Carvalho, 2010).

### 1.3 Fatores de virulência

Cada patógeno expressa seus fatores de virulência com o objetivo de sobreviver e conseguir escapar das respostas imunes do hospedeiro. O que pode ocorrer nesses organismos, são adaptações ao ambiente em que ele se encontra, promovendo alterações morfológicas e a obtenção de alguns fatores que auxiliam nessa sobrevivência em diversos nichos ecológicos específicos. Essas adaptações incluem vias de transdução de sinal que otimizam o metabolismo

para responder ao ambiente nutricional, condições de estresse e interação com outros sistemas biológicos, como diversos outros patógenos e hospedeiros simbióticos (Zaragoza *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2014).

Além da cápsula polissacarídica, que será discutida mais adiante, *C. neoformans* apresenta outros fatores importantes para sua virulência (Rodrigues *et al.*, 2008; Zaragoza *et al.*, 2009). Dentre eles podemos incluir a termotolerância, o qual permite a sobrevivência na temperatura do hospedeiro; além da secreção de enzimas, como urease e fosfolipase, que atuam auxiliando na migração e permeabilização do fagossomo (Rodrigues *et al.*, 2008; Zaragoza *et al.*, 2009). Esse fungo é também capaz de produzir melanina, que protege o patógeno contra radicais livres produzidos pelo hospedeiro e radiação eletromagnética no ambiente (Wang e Casadevall, 1994; Olszewski *et al.*, 2004; Dadachova *et al.*, 2008). Mais recentemente foi descrita a produção e liberação de vesículas extracelulares (VEs), compartimentos envolvidos com a transferência de inúmeros componentes, incluindo fatores de virulência, para o meio extracelular (Figura 3) (Perfect, 2006; Coelho, Bocca e Casadevall, 2014).



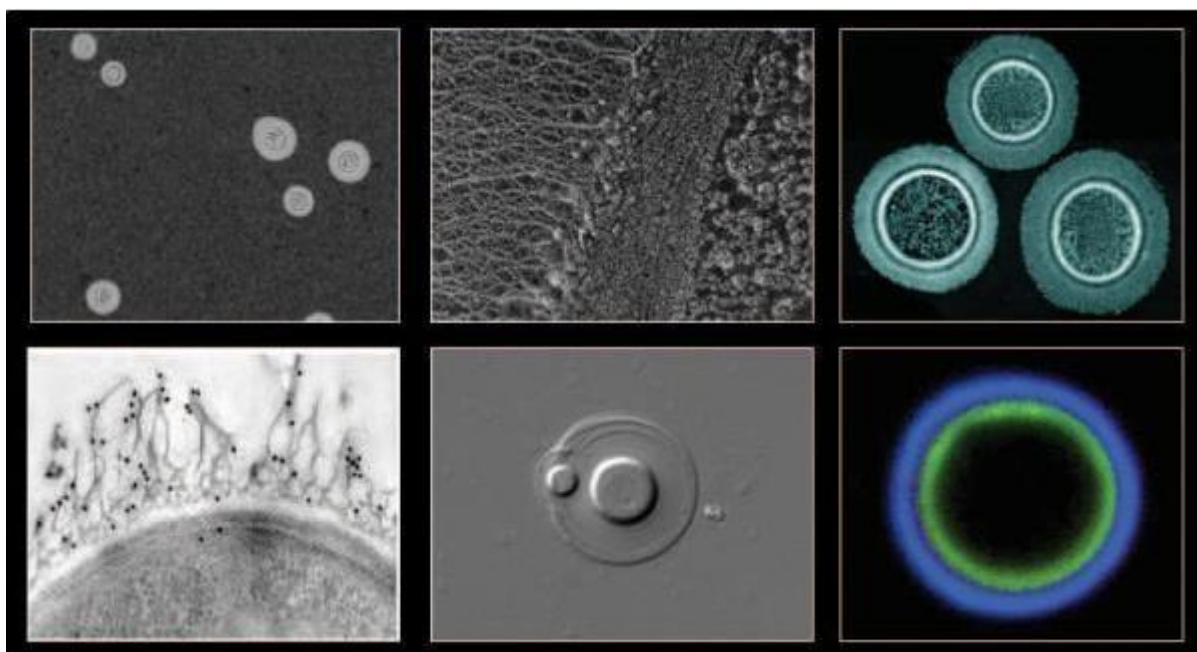
**Figura 3 – Fatores de virulência associados à célula de *Cryptococcus*.** A capacidade do fungo influenciar o ambiente intracelular de macrófagos durante a proliferação e transferência entre as células provavelmente depende dos diversos fatores fúngicos que são exportados. A secreção desses fatores é necessária para a distribuição de fatores de virulência conhecidos, como a cápsula polissacarídica, lacase (que sintetiza a melanina) e enzima



fosfolipase B e urease. Muitos desses fatores são entregues em vesículas extracelulares ligadas à membrana que foram observadas atravessando a parede celular (Adaptado de Kronstad *et. al.*, 2011).

### 1.3.1 Cápsula polissacarídica

Dentre os patógenos fúngicos, o gênero *Cryptococcus* parece ser o único que apresenta cápsula, a qual confere uma maior proteção quando o patógeno entra em contato com diversos estímulos ambientais, sendo esse um de seus principais fatores de virulência. (Doering, 2009; Janbon e Doering, 2011). As cepas de *Cryptococcus* sem essa estrutura são normalmente avirulentas (Chang e Kwon-Chung, 1994). A cápsula se demonstrou importante na inibição da fagocitose de leveduras e outras respostas imunológicas do hospedeiro (Diamond *et al.*, 1974; Doering, 2009; Janbon e Doering, 2011). Sua função na natureza é proteger a levedura da dessecação e evitar sua ingestão por amebas presentes no solo (McFadden, Zaragoza e Casadevall, 2006). Essa estrutura é dinâmica, podendo atingir várias vezes o diâmetro da célula em espessura e sua visualização é possível a partir de uma suspensão celular preparada com tinta nanquim, na qual é visualizado um halo ao redor da célula devido ao fato da cápsula não ser permeável ao corante.



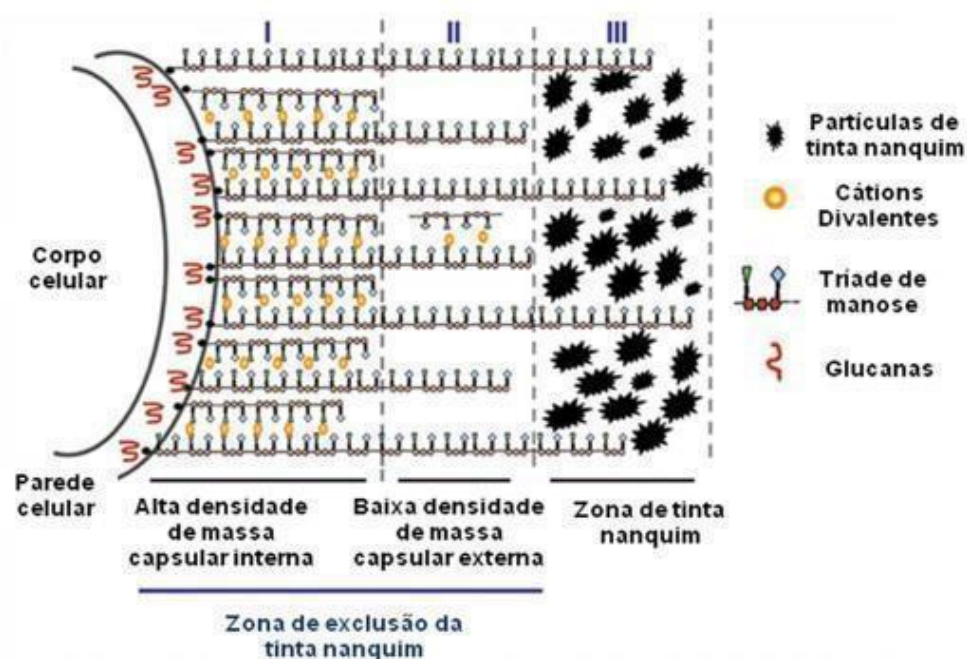
**Figura 4 – Imagens da cápsula de *C. neoformans*.** Linha superior da esquerda para a direita: marcação negativa com tinta nanquim; microscopia eletrônica, através do congelamento rápido e fratura de uma porção da parede celular com fibras da cápsula estendendo-se para a esquerda; micrografia eletrônica de seção delgada de três células. Linha inferior: micrografia imunoeletrônica de uma porção de uma célula (fibras da cápsula estendendo-se para cima) reconhecida com anticorpo anti-GXM conjugado com ouro; micrografia de contraste de interferência diferencial de uma célula em brotamento; micrografia de imunofluorescência confocal com a cápsula corada em azul e a parede celular corada de verde (Srikanta, Santiago-Tirado e Doering, 2014).



Dentre os componentes desta cápsula polissacarídica, o principal é a glucuronoxilomanana (GXM), apresentando um tamanho molecular médio de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  daltons (Gates, Thorkildson e Kozel, 2004). Sua composição é baseada em um esqueleto central contendo manose  $\alpha$ 1-3 ligada, contendo substituições de xilosil  $\beta$ 1,2 e  $\beta$ 1,4, bem como unidades de ácido glucurônico ligados  $\beta$ 1,2, e sua função está relacionada à proteção contra a fagocitose (Cherniak, Neill e Sheng, 1998, Doering, 2000). Outro componente é a galactoxilomanana (GalXM) consiste em um esqueleto  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  6) - galactana com cadeias laterais de galactomanana que são substituídas por números variáveis de unidades de xilose e ácido glucurônico e já foi descrito por ser uma molécula imunomodulatória, induzindo a produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleadas (LaRocque-de-Freitas *et al.*, 2018). E, por fim, as manoproteínas estão presentes na camada mais externa da parede celular dos fungos, e são responsáveis por induzir respostas pró-inflamatórias contra *C. neoformans*, como também possuem papel na regulação da expressão de algumas citocinas (Doering, 2000; Jesus *et al.*, 2010).

A síntese dos componentes polissacarídicos da cápsula ocorre no complexo de Golgi, através da atividade de glicosiltransferases (Yoneda e Doering, 2006). Após a síntese, eles são direcionados para o meio extracelular e em seguida reincorporados na superfície fúngica, promovendo o crescimento da cápsula. O transporte desses polissacarídeos para o meio extracelular ocorre ao menos em parte através das VEs que também carregam outros fatores de virulência (Rodrigues *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008).

A cápsula de *Cryptococcus* spp. pode ser dividida em três partes ou camadas, sendo a camada interna (zona I), mais próxima à parede celular; a cápsula média (zona II) que apresenta certa densidade e é capaz de excluir a tinta nanquim e a borda externa (zona III) com menor densidade que é incapaz de excluir a tinta nanquim (Figura 5) (Gates *et al.*, 2004; Frases *et al.*, 2009; Zaragoza *et al.*, 2009). Sua atividade antifagocítica está associada com o bloqueio do acesso aos PAMPs, ao aumento do tamanho da levedura bem como aumento da sua carga negativa (Diamond *et al.*, 1974; Kozel, 1993; Coelho, Bocca e Casadevall, 2014). GalXM e GXM induzem grupos de citocinas TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e NO, como também ativam o sistema complemento do hospedeiro (Villena *et al.*, 2008; Jesus *et al.*, 2010; LaRocque-de-Freitas *et al.*, 2018). A GalXM induz a apoptose de macrófagos através da ligação Fas/FasL, inclusive mais efetivamente que o GXM (Villena *et al.*, 2008).



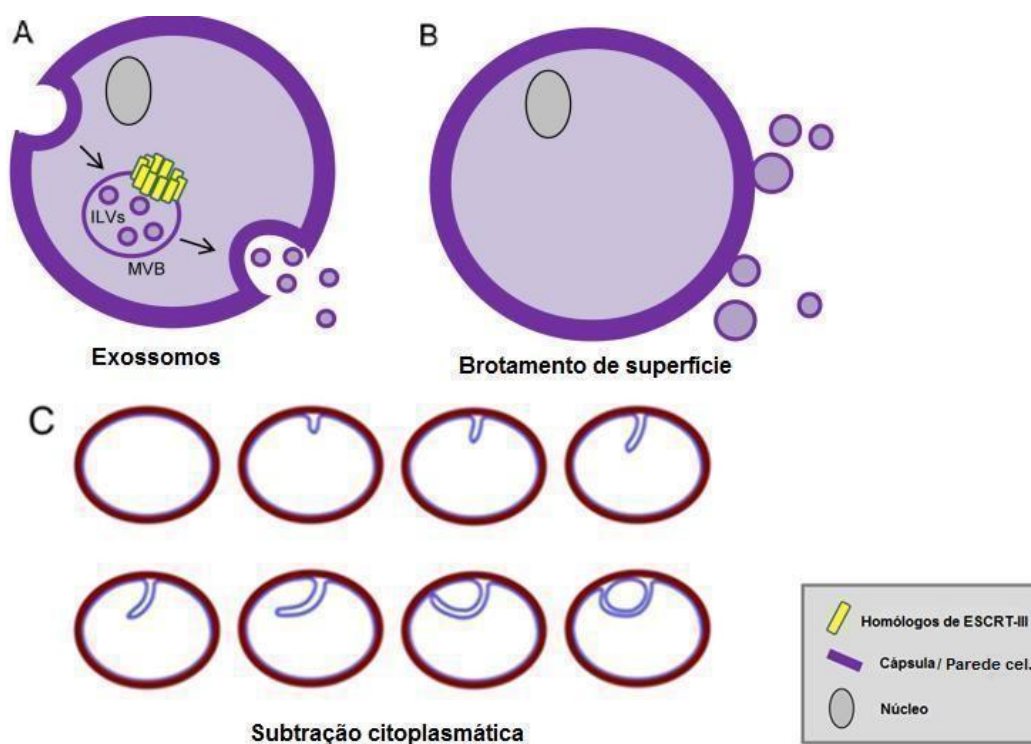
**Figura 5 - Modelo proposto para a montagem da cápsula do *Cryptococcus neoformans*.** As fibras de GXM estão unidas à parede celular pelas glucanas por meio de interações não covalentes. Para mostrar que a cápsula polissacarídica diminui a densidade em função do crescimento distal, foi utilizado tinta nanquim como um marcador do comprimento da cápsula, onde também demonstra que as fibras não se ligam uniformemente. A interação das fibras de GXM são mediadas através da formação de pontes de cátions divalentes. Uma pequena população de fibras, de maior comprimento servem para aumentar o diâmetro efetivo da cápsula passado pela zona de exclusão de tinta nanquim. Embora o diagrama mostra as interações GXM-GXM limitado apenas à camada interna, supõe-se que esta interação pode ocorrer em todo o diâmetro da cápsula com a ressalva de que elas são mais frequentes nas camadas internas da cápsula, onde representam a maior densidade dessas regiões (Adaptado de Frases et al., 2008).

### 1.3.2 Vesículas extracelulares

Conforme mencionado anteriormente, *C. neoformans* possui também a capacidade de produzir VEs. VEs são compartimentos formados por uma bicamada lipídica e que carregam uma diversidade de componentes, incluindo proteínas, polissacarídeos, glicanas, material nuclear e pigmentos (Rodrigues *et al.*, 2007; van Niel *et al.*, 2018; Zamith-Miranda *et al.*, 2018; Rizzo *et al.*, 2019). As VEs foram isoladas pela primeira vez no ano de 2007 a partir do sobrenadante de cultura do fungo *C. neoformans* e seu tamanho varia de 30 a 1000 nm, estão relacionados com essa origem. (Rodrigues *et al.*, 2007; Meldolesi, 2018; van Niel *et al.*, 2018). A capacidade de produzir e liberar vesículas foi também confirmada em diversas espécies, tais como: *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporothrix shenckii*, *Candida*

*albicans*, *Candida parapsilosis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Malassezia sympodialis*, dentre outros (Albuquerque *et al.*, 2008; Gehrmann *et al.*, 2011; Vallejo *et al.*, 2011).

Existem três propostas para biogênese de VEs por fungos, que incluem: através da formação de corpos multivesiculares e a fusão desses à membrana plasmática, liberando os exossomos; através do brotamento de microvesículas a partir da membrana plasmática gerando VEs maiores; e originando-se a partir de subtração citoplasmática através da invaginação da membrana plasmática (Figura 6) (Takeo *et al.*, 1973; Rodrigues *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2010b; Deatherage e Cookson, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013). Uma vez que elas são liberadas, pouco se sabe sobre sua estabilidade *in vivo*.



**Figura 6 - Biogêneses de vesículas extracelulares produzidas por fungos.** As VEs produzidas por fungos apresentam três diferentes origens: (A) exossomos originados a partir de corpos multivesiculares (MVBs) que se fundem com a membrana plasmática, (B) brotamento de VEs a partir da membrana celular e (C) mecanismo de subtração citoplasmática, no qual as vesículas são formadas a partir de invaginações da membrana plasmática, sequestrando porções citoplasmáticas. A e B adaptado de (Deatherage e Cookson, 2012) e C (Rodrigues *et al.*, 2013).

Um outro fato importante é a saída dessas vesículas para o meio extracelular com a sua passagem pela parede celular do fungo. Existem várias proteínas que são conservadas em VEs de diferentes espécies, como por exemplo enzimas de via glicolítica e enzimas envolvidas no remodelamento da parede celular (Vallejo *et al.*, 2012b). Porém, a atividade hidrolítica dessas

enzimas têm sido pouco estudadas. Quitinases, glucanases, manosidases e proteases podem estar envolvidas com a capacidade dessas vesículas atravessarem a parede celular funcionando como um mecanismo de “tesoura” abrindo o caminho para o meio extracelular (Albuquerque *et al.*, 2008; Vallejo *et al.*, 2012b; Vargas *et al.*, 2015). Existem outros mecanismos propostos para explicar essa passagem além do remodelamento da parede celular, como a presença de canais na parede do fungo e a pressão de turgor, que pode impulsionar a passagem das VEs pela parede (Anderson *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 2014; Brown, L., *et al.*, 2015). Esses mecanismos podem acontecer ao mesmo tempo, permitindo então a liberação dessas vesículas e sua atuação no ambiente extracelular.

VEs apresentam um papel essencial na patogênese de diversos fungos e bactérias, carreando fatores e reguladores de virulência, e por esse motivo foram inicialmente descritos como “*virulence bags*” (Rodrigues *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2015). Essas vesículas, participam nas interações patógeno-hospedeiro levando informações e moléculas fúngicas para o meio extracelular em uma infecção (Xu *et al.*, 2018; Shopova *et al.*, 2020). Conforme já mencionado anteriormente, nosso grupo demonstrou que no fungo *C. neoformans*, ao menos parte da GXM é transportada para o espaço extracelular, juntamente com outras moléculas como pigmentos, proteínas e lipídeos, através de VEs (Rodrigues *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2019).

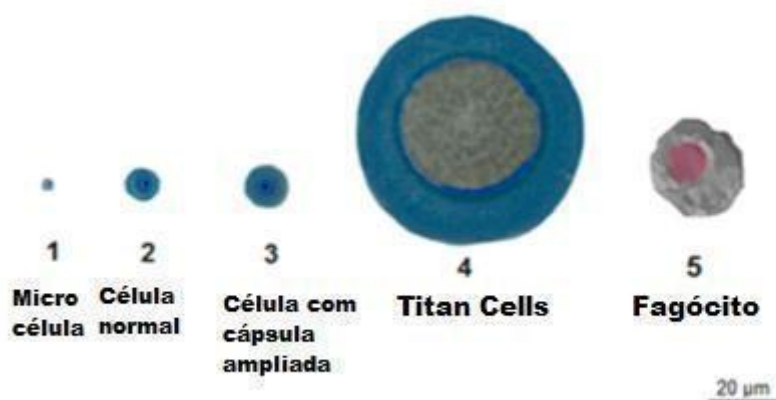
Os mecanismos moleculares envolvidos nessas trocas de informações, tais como a regulação desse meio e a liberação das VEs, ainda permanecem indefinidos. As VEs produzidas por leveduras de *C. neoformans* se mostraram capazes de ativar macrófagos, aumentando suas atividades microbicidas e promovendo a produção de citocinas e óxido nítrico pelas células hospedeiras (Oliveira *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012). Mais recentemente, Rizzo e colaboradores demonstraram que as VEs de *C. neoformans* apresentam atividade protetora em modelo murino de criptococose (Rodrigues *et al.*, 2007; Zamith-Miranda *et al.*, 2018; Colombo *et al.*, 2019; Rizzo *et al.*, 2019).

#### 1.4 Titan Cells

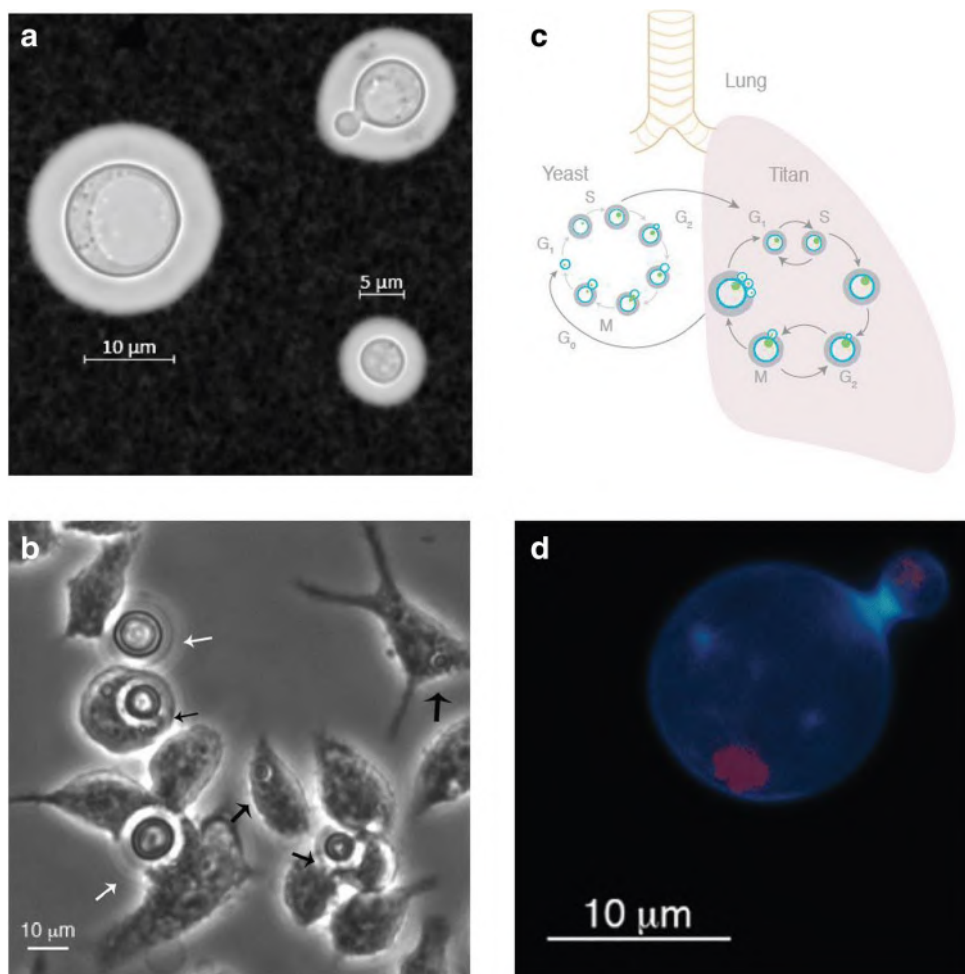
*C. neoformans* não apresenta formação de hifas durante a infecção, sendo bem raro o desenvolvimento de pseudohifas (Zaragoza, *et al.*, 2010). Contudo, um subconjunto de células criptocócicas é capaz de se diferenciar em células gigantes denominadas de *Titan Cells* (TC), com tamanho médio entre 50 e 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 7 e 8) e representando

aproximadamente 20% das células criptocócicas no pulmão (Garcia-Rodas *et al.*, 2019; Okagaki *et al.*, 2010). Esse tipo celular foi descrito principalmente no pulmão parece ser induzido pelas condições de pH, CO<sub>2</sub> e temperatura deste órgão. Um protocolo recentemente descrito, tenta mimetizar, *in vitro*, o tecido pulmonar e obter esse tipo celular para o seu estudo (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). A presença de células com cerca de 10 µm já é considerada como TC (Garcia-Rodas *et al.*, 2019; Okagaki *et al.*, 2010).

Esse processo de crescimento de tamanho celular pode ocorrer aumentando o tamanho da cápsula sem modificar o tamanho do corpo celular ou aumentando o diâmetro do corpo celular, o que normalmente também é acompanhado por um aumento da cápsula (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). São observados também, além do aumento da cápsula, um aumento do seu conteúdo de DNA e uma parede celular mais espessa (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010).



**Figura 7 -** Diferentes populações de células encontradas nos pulmões de camundongos infectados com *C. neoformans*. Leveduras com diferentes tamanhos de cápsulas, microformas, células de tamanho regular e *Titan Cells*, que são maiores que os fagócitos, estão presentes durante a infecção pulmonar em camundongos. (Adaptado de Hernández-Chávez *et al.*, 2017).



**Figura 8 - *Cryptococcus neoformans* cresce como uma população heterogênea de leveduras e Titan Cells.** **a** Levedura induzida *in vitro* e Titan Cells contracoradas com nanquim para revelar a cápsula. **b** Células de levedura induzidas *in vitro* (setas pretas) e TC (setas brancas) co-cultivadas com células semelhantes a macrófagos J77.4. **c** Um esquema mostrando os ciclos celulares da fase de levedura e TC no ambiente e no pulmão do hospedeiro. **d** Uma Titan Cell em desenvolvimento com divisão assimétrica de DNA (azul = calcofluor branco, quitina; vermelho = Cse4-mCherry, cromossomos). (Zhou e Ballou, 2018).

As TC são altamente resistentes e, desde sua descoberta, há evidências crescentes de que essas células contribuem, não apenas para a persistência a longo prazo no hospedeiro, mas também podem participar ativamente no desenvolvimento da doença (Feldmesser *et al*, 2000; Garcia-Rodas e Zaragoza, 2012; DeLeon-Rodriguez e Casadevall, 2016). Essas células com tamanho aumentado, são capazes de escapar do sistema imune e evitar sua eliminação por macrófagos devido ao seu tamanho e resistência (Feldmesser *et al*, 2000; Garcia-Rodas e Zaragoza, 2012). Podem, também, gerar células filhas mais adaptadas morfológicamente nos tecidos infectados. Atualmente, alguns estudos vêm analisando a possível transformação de TC em células de tamanho normal durante a infecção (Feldmesser *et al*, 2000; Garcia-Rodas e Zaragoza, 2012; DeLeon-Rodriguez e Casadevall, 2016; Garcia-Rodas *et al.*, 2019).

A presença de TC vem sendo correlacionada a uma resposta Th2, que é observada durante a infecção por patógenos extracelulares, que leva ao recrutamento de eosinófilos para os pulmões. Porém, quando analisamos a resposta imunológica durante infecções fúngicas, a resposta Th2 vem sendo associada a uma baixa atividade de proteção (García-Barbazán *et al.*, 2015). Além disso, as TC produzem células filhas com uma taxa relativamente mais rápida (60 min/broto) do que as células de leveduras em tamanho normal. Com isso, fazem com que a proporção de células menores que consigam ser fagocitadas e se disseminarem aumente mais em relação às cepas que não apresentam TC (Trevijano-Contador *et al.*, 2018; Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010).

Essa mudança morfológica, que ocorre no tecido pulmonar, é acompanhada de um remodelamento na parede celular e na alteração da composição capsular. Em um estudo, foi analisado que durante a infecção, TC apresentaram um aumento no percentual de quitina na parede celular, o que está diretamente associado à resposta imune anti-inflamatória. Além disso foi também observado um baixo nível de galactosamina em células estudadas nos modelos *in vivo* e *in vitro* (Wiesner *et al.*, 2015; Mukaremera *et al.*, 2018). Níveis baixos de galactosamina, implicam em um menor reconhecimento da célula fúngicas pelas nossas células de defesa, já que a estrutura da galactosamina é considerada um PAMP (García-Carnero *et al.*, 2020). Foi visto que células típicas continham menor conteúdo de glucosamina, glucose, manose e xilose em sua parede celular, confirmando seu remodelamento (Zaragoza *et al.*, 2010). Ao comparar as cápsulas, foi detectado que o teor de manose e xilose era maior em TC, já glucose e galactose foram descritas em menor quantidade nessas células, o que comprova as diferenças entre as TC e células típicas (Mukaremera *et al.*, 2018).

### 1.5 Modelo experimental de *Galleria mellonella*

A *G. mellonella* é uma espécie de insetos lepidópteros que foi referenciada por Carlos Lineu. São mais conhecidos como traça-da-cera ou traça-da-colméia. Os ovos desses insetos quando eclodem, geram larvas com coloração alvadia, medindo entre 1 e 3 mm de comprimento. Em uma fase larval, existem os sete instares larvais e seu crescimento ocorre no ultimo instar, e esta chega a obter cerca de 20 mm de comprimento com um corpo de cor acinzentada com uma parte castanha no protórax (Ménard, 2021). Esses insetos podem ser utilizados para diversas áreas na pesquisa, como por exemplo infecções por diversos microrganismos principalmente bactérias e fungos, como também já foram descritas em estudos

na degradação de polietileno que é amplamente utilizado em embalagens plásticas (Ramarao, Nielsen-Leroux e Lereclus, 2012; Harding *et al.*, 2013; Bombelli e Bertocchini, 2017).

O modelo *in vivo* de *G. mellonella* é utilizado por ser simples e confiável para investigar a virulência fúngica (Brennan *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2018). Nos últimos anos, nosso laboratório vem utilizando essas larvas para investigar o efeito VEs fúngicas em estudos de proteção e virulência (Vargas *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2018; Colombo *et al.*, 2019). Em experimentos realizados pelo nosso grupo a co-injeção leveduras de *C. albicans* e VEs dessa espécie fúngica acelera expressivamente a morte das larvas (Piffer, 2021). Além de ser um experimento mais simples de manuseio e mais barato, vale ressaltar que o sistema imune apresentado nesse modelo é relativamente similar ao sistema imune inato dos mamíferos (Browne *et al.*, 2013; Vargas *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2018; Colombo *et al.*, 2019; Brauer *et al.*, 2020; Vargas *et al.*, 2020; Reis *et al.*, 2021).

## 2. Justificativa

*C. neoformans* é um patógeno oportunista, que possui grande importância clínica por se tratar de um causador de meningite criptococócica em indivíduos que possuem fatores de risco. Por conseguir causar uma doença que pode se apresentar em sintomas graves, quebrando as barreiras do sistema imune e conseguindo chegar até o SNC, é crucial elucidar o papel dos diversos mecanismos de virulência do fungo (Buchanan e Murphy, 1998; Nelson, Hawkins, e Wozniak, 2020).

A descrição de um protocolo de obtenção de TC permitiu o avanço nas investigações desse modelo celular fúngico. Resultados recentes publicados pelo grupo do Dr. Marcio Rodrigues, mostram que é possível obter VEs em culturas de TC, facilitando então a melhor compreensão desse fator de virulência que possui grande importância na infecção (Reis *et al.*, 2021). Conclusões que indicam que a produção de VEs é diretamente impactada pelo seu meio de cultura e tempo de crescimento específicos também foram relatados (Trevijano-Contador *et al.*, 2018; GarciaRodas *et al.*, 2019; Reis *et al.*, 2021).

Dados do nosso grupo mostram que as VEs de leveduras de *C. neoformans* têm efeito modulatório em macrófagos. Além disso, em colaboração com outros grupos demonstramos que as VEs de leveduras de *C. albicans* podem ser utilizadas como formulações vacinais em modelos de insetos e murinos (Honorato *et al.*, 2021). No entanto, a atividade imunomodulatória das VEs produzidas pelas TC não foi investigada, esse fato justificou o



interesse pela pesquisa. O modelo de larvas do inseto *G. mellonella* vem sendo cada vez mais utilizado para diversas pesquisas e sua facilidade de manipulação é um fator de interesse em casos de estudos sobre infecções fúngicas. Diante da descoberta das TC e por conta da sua relevância clínica, diversos pesquisadores tiveram e, ainda, têm como objetivo investigar maiores detalhes sobre os mecanismos de patogênese dessa levedura.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o papel das VEs produzidas por leveduras e TC durante o processo infeccioso em larvas de *Galleria mellonella*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Padronizar a metodologia de obtenção de TC e isolamento de VEs dessa morfologia celular.
- Investigar o efeito das VEs produzidas por leveduras e por TC durante o processo infeccioso de *C. neoformans* em larvas do inseto *Galleria mellonella*.

### **4. Materiais e Métodos**

#### **4.1 Obtenção de TC**

A cepa de *C. neoformans* H99 foi mantida em meio Sabouraud sólido durante uso e o estoque em freezer -80 °C. Para a obtenção de *C. neoformans* TC, uma colônia do fungo foi incubada em meio Sabouraud acrescido de 15 µM de Azida sódica por 24 horas a 30 °C. Após o tempo de cultivo, as células foram lavadas 1 vez com PBS estéril e plaqueadas na concentração de  $1,5 \times 10^7$  céls/placa em meio TCM ágar (*Titan Cell Medium* – 45 mM de MOPS pH 7,3, 2% ágar, 5% de Sabouraud, 5% de soro fetal bovino e 15 µM de azida sódica) (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). As placas foram incubadas a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> por 18-24hrs. Para a obtenção de células com tamanho normal (células controle), uma colônia de fungo foi incubada em caldo Sabouraud por 24 horas a 30 °C. Depois, a mesma quantidade de células ( $1,5 \times 10^7$  céls/placa) foi plaqueada em Sabouraud ágar. Essa metodologia e as posteriores

foram realizadas três vezes para comparar os resultados, sendo separados então em três experimentos iguais em datas diferentes.

#### 4.2 Análise e medição das células típicas e TC

Para obter a porcentagem de TC pelo número de células totais, células de *C. neoformans*, após o tempo de incubação em meio sólido, foram recuperadas, lavadas com PBS, fixadas e coradas com nanquim para medição de tamanho celular utilizando microscopia de campo escuro. Através do programa ImageJ foram avaliadas 200 células por condição e foi obtido o tamanho total da célula, cápsula mais corpo, e também somente do corpo celular.

#### 4.3 Obtenção das vesículas de *C. neoformans* TC

Células de *C. neoformans* foram incubadas em placas com meio TCM ágar (para isolar VEs de TC) e Sabouraud ágar (para isolar VEs de células controle), como descrito anteriormente. Após o período de 24 horas de incubação, foi realizada a raspagem da massa de células, a qual foi diluída em 15 ml de PBS estéril. A suspensão celular foi homogeneizada sob agitação em aparelho vórtex e, em seguida, centrifugada a 5000 xg por 15 minutos. Após esse processo, o sobrenadante foi coletado em um tubo falcon e centrifugado por 15 min/ 15000 xg / 4 °C (Avanti J-E). O sobrenadante obtido dessa centrifugação passou por uma filtração utilizando um filtro com poros de 0.45 µM e, em seguida, submetido a ultracentrifugação por 1h / 100000 xg / 4 °C para obter o *pellet* com VEs. O teste de esterilidade foi realizado em meio BHI ágar através de um estriamento de uma alíquota da fração enriquecidas nas VEs. A quantificação das VEs foi realizada através da dosagem de esterol e da dosagem proteína conforme descrito abaixo e o estoque armazenado no freezer -80 °C.

#### 4.4 Dosagem de esterol

Para quantificar as vesículas, foi utilizado dosagem química com o kit fluorimétrico Amplex Red Sterol Assay (Molecular Probes), baseado na presença de esterol nas membranas das vesículas. É um método fluorométrico sensível, rápido e simples para detectar concentrações muito baixas de colesterol usando um leitor de microplacas de fluorescência.

#### 4.5 Dosagem de proteínas

Realizado utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay, baseado na presença de proteínas nas vesículas. É um ensaio de alta precisão e compatível com detergente para determinação da concentração de proteína. Os reagentes Pierce BCA fornecem uma determinação precisa da concentração de proteína com a maioria dos tipos de amostra encontrados na pesquisa de proteínas.

#### 4.6 Ensaio de sobrevivência com larvas do inseto *Galleria mellonella*

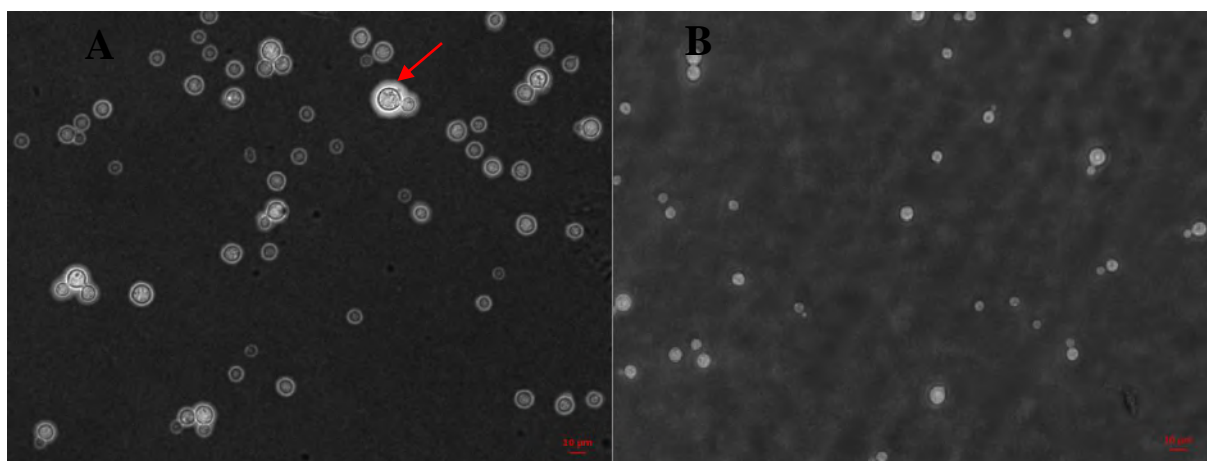
Larvas de *G. mellonella*, no último instar larval, foram selecionadas de acordo com a similaridade de tamanho (1 cm) e peso (250~300 mg). Grupos de 10 animais por condição experimental foram inoculadas com 10 µL de volume final de PBS (controle negativo), fungo em PBS, fungo mais VEs de TC (feito a partir do experimento 3) ou VEs de células controle (100 µg/mL por inseto, valor estabelecido de acordo com outros estudos já analisados, baseado na concentração de proteína) utilizando seringa de insulina 30G na hemocele através da última pata como descrito previamente (Brennan *et al.*, 2002). O inóculo utilizado foi de 10<sup>6</sup> leveduras/larva. Todas as larvas foram mantidas em placas de Petri, no escuro e a 37 °C por sete dias após a infecção. A morte das larvas foi avaliada pela falta de movimentação em resposta à estimulação e a determinação das larvas vivas foi realizada diariamente.

### 5. Resultados

#### 5.1 Obtenção de TC

Com o objetivo de obter células de *C. neoformans* em seu tamanho aumentado, o fungo foi inoculado no meio *Titan Cell Medium* (TCM) ágar, com todos os estímulos neste meio de cultura e no período de incubação que são necessários para mimetizar o tecido do pulmão para que essas células consigam chegar ao tamanho esperado. As células em seu tamanho aumentado foram então confirmadas na cultura de TC e comparadas com as células controle quando

coradas com tinta nanquim observadas no microscópio como mostra a figura a seguir (Figura 9).



**Figura 9 - Comparação das TC e células de *C. neoformans* controle.** Na figura A, podemos observar a comparação em cultura de TC o tamanho das dessas células (como por exemplo a célula exemplificada com a seta em vermelho) com as células de *Cryptococcus neoformans* em seu tamanho normal na figura B, coradas com nanquim observadas no microscópio com escala de 10µm.

As células foram comparadas quanto a presença de TC através da medição pelo programa ImageJ. Foram avaliadas um total de 200 células por cada experimento, obtendo os seguintes resultados: No experimento 1, em cultura de TC cerca de 28% (56 TC) das células foram descritas como células gigantes, sem nenhuma TC descrita na cultura controle; no experimento 2, em cultura de TC cerca de 47% (94 TC) das células foram consideradas células gigantes, sem nenhuma presença na cultura controle; já no experimento 3, em cultura de TC cerca de 56.5% (113 TC) das células apresentaram o perfil de células gigantes e apenas duas TC foram encontradas na cultura controle (Tabela 1).

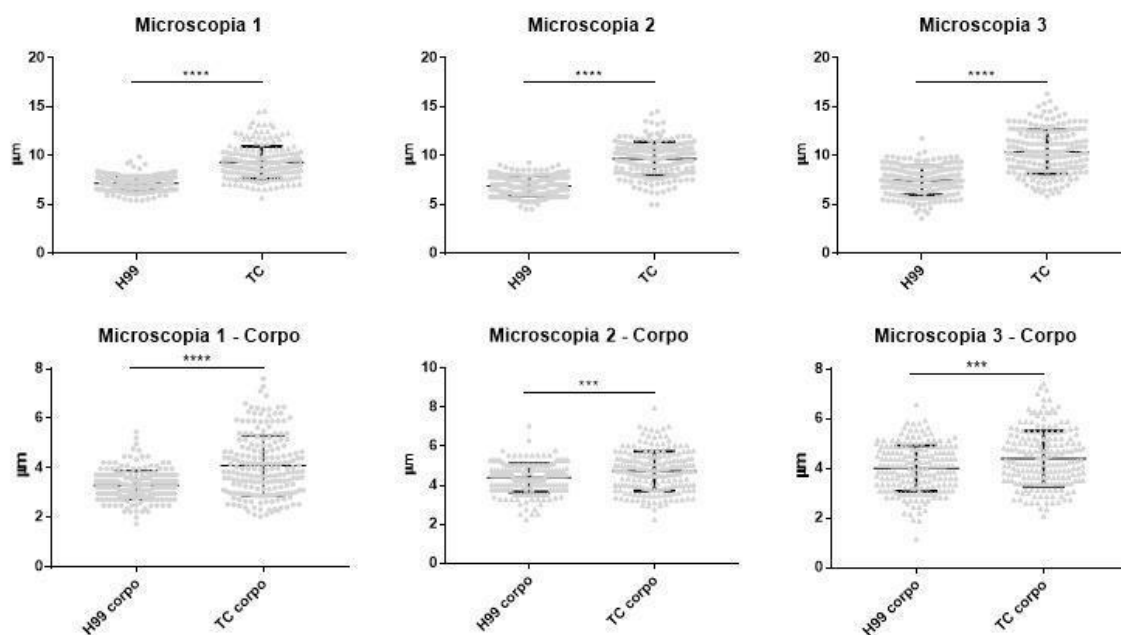
**Tabela 1 - Contagem de células da cultura de *C. neoformans* TC e cultura controle e a obtenção da porcentagem quanto a presença de TC**

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Cultura de <i>C. neoformans</i> TC	28% (56 TC)	47% (94 TC)	56.5% (113 TC)
Cultura controle	ND*	ND*	1% (2 TC)

\*Não detectado

Com esses resultados, foi realizada uma análise do tamanho do corpo celular de cada célula das três amostras e outra análise do corpo celular mais a cápsula de cada experimento

(Figura 10). Foi observada uma diferença relevante, indicando que as TC possuem um tamanho aumentado quando medimos a célula como um todo, o que já foi observado em estudos a presença do crescimento do corpo celular seguido de um crescimento da cápsula polissacarídica (Trevijano-Contador *et al.*, 2018).



**Figura 10 - Análise do tamanho celular comparando comprimento do corpo celular e o corpo celular + cápsula.** Os experimentos foram separados como Microscopia 1, 2 e 3 separadas em corpo celular e corpo celular + cápsula em cada tipo celular, *C. neoformans* TC e células controle H99. As análises estatísticas foram realizadas usando teste t de Student não pareado. \*\*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 5.2 Isolamento e caracterização de VEs

Após a obtenção da morfologia de TC, conseguimos isolar as VEs, através do protocolo descrito, para posteriores experimentos. O plaqueamento de alíquotas das frações vesiculares em meio de cultura não apresentou nenhum crescimento de microrganismos, indicando a presença de uma preparação estéril de VEs.

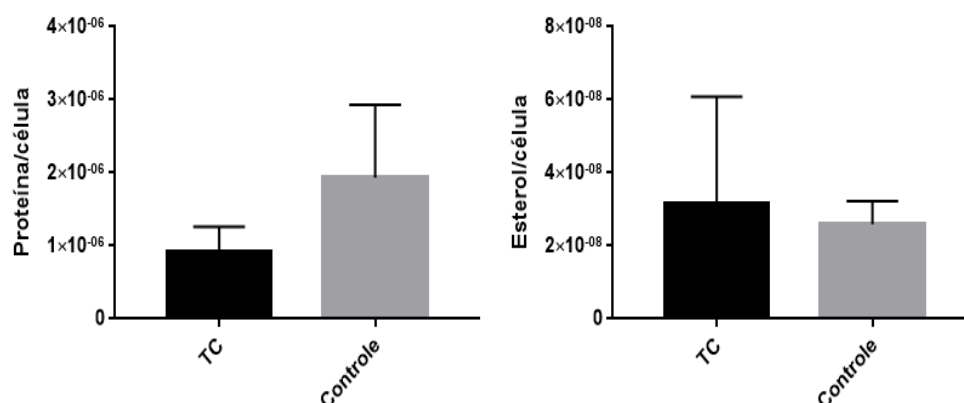
As diferenças nas concentrações de esterol e proteínas presentes nas VEs dos dois tipos celulares de *C. neoformans* foram investigadas. As células foram contadas após o plaqueamento quando foram recolhidas através de uma raspagem de sua massa. Foram observadas diferenças significativas no número de células dos experimentos iniciais. Para normalizar esses experimentos e obter resultados mais consistentes foram utilizadas suspensões contendo  $10^6$

células por ml na hora do plaqueamento. Foi então determinada a concentração de proteína (ug/mL), proteína/célula, esterol (uM) e esterol/célula. Como podemos observar na Tabela 2, a quantidade de proteínas nas VEs das culturas de *C. neoformans* H99 apresentaram valores mais altos quando comparadas a quantidade de proteína nas VEs produzidas por TC. Por outro lado, o valor de esterol está mais alto em VEs de TC do que quando comparados as VEs das células controle (Tabela 2). Esses dados sugerem diferenças na composição das VEs produzidas pelos dois tipos celulares de *C. neoformans*.

**Tabela 2** – Comparação dos resultados de dosagem de esterol e proteínas

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	TC	H99	TC	H99	TC	H99
Células recolhidas	$1,2 \times 10^8$	$2,05 \times 10^8$	$1,97 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$2,96 \times 10^8$	$2,42 \times 10^8$
Proteína-VEs (ug/mL)	157,67	245,94	127,68	583,57	221,94	368,48
Proteína-VEs/célula	$1,31 \times 10^{-6}$	$1,19 \times 10^{-6}$	$6,68 \times 10^{-7}$	$3,07 \times 10^{-6}$	$7,49 \times 10^{-7}$	$1,52 \times 10^{-6}$
Esterol (uM)	7,76	5,71	4,11	3,60	2,68	7,50
Esterol-VEs/célula	$6,46 \times 10^{-8}$	$2,78 \times 10^{-8}$	$2,08 \times 10^{-8}$	$1,89 \times 10^{-8}$	$9,07 \times 10^{-9}$	$3,10 \times 10^{-8}$

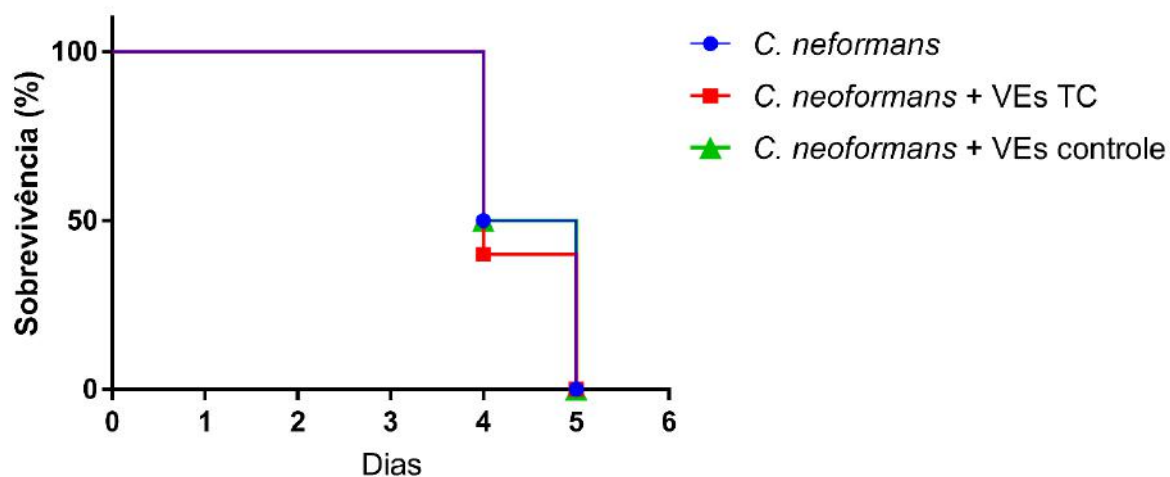
A partir da obtenção desses resultados, foi feito um gráfico comparando a relação de proteínas/célula e esterol/célula através da realização da média dos resultados da tabela 2. Podemos avaliar, apesar do resultado não ser significativo, que as VEs de TC possuem quantidades menores de proteínas por células quando comparadas as células controle de *C. neoformans* H99. E, também, VEs de TC possuem mais de esterol por células quando comparados às células controle, podemos observar esses resultados nos gráficos da figura 11.



**Figura 11 - Comparação da relação de proteínas/célula e esterol/célula nas culturas de *C. neoformans* TC e culturas controle.** A figura mostra que VEs de TC possuem quantidades menores de proteínas por células quando comparadas às células controle de *C. neoformans* H99; VEs de *Titan Cells* possuem mais de esterol por células quando comparados às células controle.

### 5.3 Atividade biológica das VEs

Para determinar o possível efeito das VEs durante o processo infeccioso utilizamos o modelo de inseto *G. mellonella*. As larvas foram infectadas com concentrações letais de *C. neoformans* e, em seguida, suspensões de VEs (do experimento 3 devido à quantidade de cerca de 50% de TC nessa cultura) foram também administradas nas larvas. A curva de sobrevivência foi acompanhada (Figura 12). Não foram observadas diferenças na letalidade em nenhuma das condições testadas.



**Figura 12 – Avaliação da sobrevivência dos diversos tipos celulares de *C. neoformans* + VEs.** Na figura, pode-

se observar a curva de sobrevivência de *C. neoformans*, *C. neoformans* mais VEs TC e *C. neoformans* mais VEs controle (segue a linha azul no gráfico). Foi observado que todas os tipos celulares apresentaram sua letalidade no quinto dia, devido ao inóculo alto do experimento.

## 6. Discussão

As alterações morfológicas possuem uma grande importância durante as infecções por *C. neoformans*. Quando as leveduras dessecadas ou esporos de *C. neoformans* chegam nos alvéolos, há uma resposta imediata promovendo o crescimento da sua cápsula. Isso leva a um aumento considerável no seu tamanho e na sua carga negativa, reduzindo a resposta efetiva das células fagocíticas do hospedeiro (Garcia-Rodas *et al.*, 2019; Okagaki *et al.*, 2010). Além disso, ocorre a secreção da GXM, um polissacarídeo com alta atividade imunomodulatória, que auxilia no escape dos mecanismos de defesa (Feldmesser *et al.*, 2000; Garcia-Rodas e Zaragoza, 2012). Foi descrito que essas células recrutam eosinófilos nos pulmões, isso sugere a indução de uma resposta Th2, geralmente observada durante a infecção por patógenos extracelulares. No entanto, essa resposta em infecções fúngicas é considerada ineficaz, o que levaria a persistência da infecção (García-Barbazán *et al.*, 2015).

Além dessas respostas, *C. neoformans* possui outros fatores de virulência discutidos anteriormente, o que implica em uma infecção fúngica mais intensa contra o paciente e que, portanto, muitas das vezes dificulta o organismo a eliminar este patógeno. A composição descrita para as VEs de *C. neoformans* sugere uma participação favorável ao desenvolvimento da doença pois incluem um conjunto de fatores e reguladores de virulência, incluindo polissacarídeos, pigmentos e proteínas (Rodrigues *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2019).

Uma vez que as VEs apresentam componentes com a capacidade de impactar a patogenicidade fúngica, torna-se de grande importância clínica investigar a influência desses compartimentos nas infecções por essa espécie. Com a descrição de um protocolo eficiente para a obtenção das TC de *C. neoformans* tivemos como meta nesse estudo investigar maiores detalhes sobre a composição básica das VEs produzidas por essas células através da comparação com as VEs de leveduras controle. Além disso, avaliamos a participação desses compartimentos na virulência do *C. neoformans* em um modelo de criptococose em insetos.

Avaliando os detalhes experimentais observamos que o número de células entre as culturas de TC e controle, apresentaram diferenças. Em nossos experimentos iniciais não padronizamos a quantidade de células da partida das culturas e isso teve uma influência direta



na quantidade de células finais, impactando os resultados. Por essa razão, visando a obtenção de dados mais consistentes, estabelecemos uma suspensão inicial de  $10^6$  células por ml para realização dos experimentos. Embora o protocolo utilizado tenha sido rigorosamente seguido, a cultura em meio sólido pode ter dificultado a manutenção do pH e da atmosfera de CO<sub>2</sub>, bem como a consistência nos nutrientes durante todo o cultivo. É possível que a manutenção das condições ideais em cultura seja mais difícil de atingir os modelos *in vivo*, como ocorre durante o processo infeccioso. Apesar das células não terem atingido o tamanho regular para TC, elas possuem um tamanho aumentado em corpo e cápsula quando comparadas as células normais de *C. neoformans* vistas no controle dos experimentos. Além disso, os dados que serão discutidos a seguir confirmam uma mudança composicional das VEs, fato que corrobora com alterações no tipo celular.

Embora nossos resultados tenham sugerido um aumento na quantidade de esterol com a redução do conteúdo proteico em VEs produzidas por TC quando comparado com as VEs das leveduras controle, não foram observadas diferenças estatísticas significativas. Para um melhor direcionamento do nosso estudo, seria necessário aumentar o número de experimentos, além de ser importante realizar uma análise e determinação da composição proteica, o número e o tamanho das VEs da morfologia de TC e culturas controle.

O modelo *in vivo* de *G. mellonella* foi utilizado por ser simples, barato e mais rápido para obter os resultados para a investigação da virulência fúngica. Após cinco dias de observação do experimento não foram observadas diferenças na letalidade das infecções, sendo elas *C. neoformans* + VEs de TC, *C. neoformans* + VEs controle e controle. Em experimentos realizados pelo nosso grupo a co-injeção leveduras de *C. albicans* e VEs dessa espécie fúngica acelera expressivamente a morte das larvas (Piffer, 2021). Nos resultados aqui apresentados, a morte dos animais foi similar, independente da origem das VEs e mesmo na ausência das VEs. No entanto, considerando que esse foi nosso primeiro experimento, é possível que o uso de suspensões menos concentradas dos fungos ou utilizando números reduzidos das partículas possa influenciar na patogênese. Dessa forma, ao menos duas condições experimentais devem ser consideradas em experimentos futuros. Além de utilizar um número menor de propágulos fúngicos na infecção, seria necessário variar a dose das VEs (dose-resposta) administradas.

Essas análises são precisamente importantes visto que alguns estudos já foram relatados casos em que as VEs fúngicas são capazes de aumentar a patogênese. Um estudo foi feito a partir do isolamento de VEs de cepas capsulares (B3501) e não capsulares ( $\Delta$ Cap67) de *C. neoformans* (Marina *et al.*, 2020). No experimento, as vesículas foram administradas por via

intranasal de camundongos que foram previamente infectados com *C. neoformans* cepa B3501. Inicialmente foi observado que a carga fúngica foi diminuída durante os 5 primeiros dias, mas após 2 semanas de administração de VEs, foi observado um aumento da carga fúngica. Portanto, essas análises levam o entendimento que as VEs podem auxiliar na patogenicidade da doença, aumentando a carga fúngica após um determinado tempo.

Em outros estudos, foi observado que as VEs de *C. neoformans* produzidas *in vitro* e potencialmente durante a infecção animal, transportam componentes da cápsula (Rodrigues *et al.*, 2007; Jesus *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012). Huang e colaboradores demonstraram que a co-injeção de VEs e leveduras de *C. neoformans* aumentam a transcitose desse fungo *in vitro*, levando a um pensamento de que a interação dessas vesículas com as células alvo é de extrema importância para a patogênese (Huang *et al.*, 2012). Esses autores sugerem que as VEs induzem a fusão de células hospedeiras, e esta atividade pode auxiliar na adesão e internalização de vesículas e/ou a internalização do fungo por células hospedeiras. Nesse mesmo estudo, foi observado que essas VEs se agregaram em torno de lesões císticas em cérebros infectados. Portanto é notório que as vesículas exercem papel fundamental em infecções, carreando diversos fatores de virulência nas células alvo, e que durante a criptococose pode promover uma exacerbação da infecção (Huang *et al.*, 2012).

## 7. Conclusões

- O protocolo estabelecido nos experimentos preliminares nos permitiu obter cerca de 50% da população de TC em cultura.
- Nossos resultados sugerem que a composição das VEs produzidas por TC e leveduras controle apresentam diferenças que poderiam impactar a patogênese.
- Devido ao nosso experimento para a avaliação dos efeitos das VEs na infecção *in vivo* ter sido inconclusivo, é necessário realizar experimentos futuros para maior elucidação das diferenças dos efeitos de cada morfologia na infecção.

## 8. Referências bibliográficas

Albuquerque, P.C., Nakayasu, E.S., Rodrigues, M.L., Frases, S., Casadevall, A., Zancope-Oliveira, R.M., Almeida, I.C., Nosanchuk, J.D. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol* 10, 1695–1710.

Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., Flavell, R.A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117, 515–526.

Anderson, J., Mihalik, R., Soll, D., (1990). Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. *Journal of Bacteriology* 172, 224–235.

Barnett, J.A. (2010). A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Yeast* 27, 875–904.

Beh, C.T., McMaster, C.R., Kozminski, K.G., Menon, A.K., (2012). A Detour for Yeast Oxysterol Binding Proteins. *J Biol Chem* 287, 11481–11488.

Bolaños, B., Mitchell, T.G. (1989). Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 27, 203–217.

Bombelli, P., Howe, C.J., Bertocchini, F., (2017). Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology* 27, R292–R293.

Brauer, V.S., Pessoni, A.M., Bitencourt, T.A., de Paula, R.G., de Oliveira Rocha, L., Goldman, G.H., Almeida, F., (2020). Extracellular vesicles from *Aspergillus flavus* induce M1 polarization in vitro. *mSphere* 5.

Brennan, M., Thomas, D.Y., Whiteway, M., Kavanagh, K. (2002). Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, 153–157.

Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G., White, T.C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4, 165rv13.

Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13, 620–630.

Browne, N., Heelan, M., Kavanagh, K., (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*.

Buchanan, K. L. and Murphy, J. W. (1998). What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis.* 4, 71-83.

Casadevall, A.; Perfect, J. R (1998). *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 541p.

Chai, S.M.; Teoh, S.C., (2012). Ocular cryptococcosis as a presenting manifestation of cryptococcal meningitis in a patient with HIV. *Int. J. STD Aids*, v.23, n.5, p.377-378.

Chang, Y.C. and Kwon-Chung, K.J. (1994) Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4912–4919.

Chang, M.R., Paniago, A.M.M., Silva, M.M., Lazéra, M.S., Wanke, B., (2008). Prostatic cryptococcosis: a case report. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* 14, 378–385.

Chee, H.Y., Lee, K.B. (2005). Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. *J Microbiol* 43, 469–472.

Cherniak, R., O’Neill, E.B., Sheng., S. (1998). Assimilation of Xylose, Mannose, and Mannitol for Synthesis of Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Determined by <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Infection and Immunity* 66, 2996–2998.

Coelho, C., Bocca, A.L., Casadevall, A. (2014). The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 87, 1–41.

Colombo, A.C., Rella, A., Normile, T., Joffe, L.S., Tavares, P.M., de, S.A.G.R., Frases, S., Orner, E.P., Farnoud, A.M., Fries, B.C., Sheridan, B., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L., del Poeta, M., (2019). *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan and sterylglucoside are required for host protection in an animal vaccination model. *mBio* 10.

Cunha, C., Romani, L., Carvalho, A. (2010). Cracking the Toll-like receptor code in fungal infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 8, 1121–1137.

*Curr Protoc Immunol*, Chapter 14, Unit 14 11.

Dadachova, E., Bryan, R.A., Howell, R.C., Schweitzer, A.D., Aisen, P., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2008). The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 192–199.

Deatherage, B.L., Cookson, B.T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and *archaea*: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun* 80, 1948–1957.

DeLeon-Rodriguez, C.M., Casadevall, A. (2016). *Cryptococcus neoformans*: Tripping on Acid in the Phagolysosome. *Frontiers in Microbiology* 7, 164.

Diamond, R.D., May, J.E., Kane, M.A., Frank, M.M., Bennett, J.E. (1974). The role of the classical and alternate complement pathways in host defenses against *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* 112, 2260–2270.

Doering, T.L. (2000). How does *Cryptococcus* get its coat? *Trends Microbiol* 8, 547–553.

Doering, T.L. (2009). How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* 63, 223–247.

D'Souza, C., Hagen, F., Boekhout, T., Cox, G., Heitman, J. (2004). Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. *Current genetics* 46, 92–102.

Eisenman, H.C., Frases, S., Nicola, A.M., Rodrigues, M.L., Casadevall, A. (2009). Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology (Reading)* 155, 3860–3867.

Emmons, C. W. (1955). Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg.* 62, 227-232.

Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P., Casadevall, A. (2000). *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* 68, 4225–4237.

Frases, S., Nimrichter, L., Viana, N.B., Nakouzi, A., Casadevall, A. (2008). *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. *Eukaryot Cell* 7, 319–327.

Frases, S., Pontes, B., Nimrichter, L., Viana, N.B., Rodrigues, M.L., Casadevall, A. (2009). Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1228–1233.

García-Barbazán, I., Trevijano-Contador, N., Rueda, C., de Andrés, B., Pérez-Tavárez, R., Herrero-Fernández, I., ... Zaragoza, O. (2015). The formation of *titan cells* in *Cryptococcus neoformans* depends on the mouse strain and correlates with induction of Th2-type responses. *Cellular Microbiology*, 18(1), 111–124.

García-Carnero, L.C., Martínez-Álvarez, J.A., Salazar-García, L.M., Lozoya-Pérez, N.E., González-Hernández, S.E., Tamez-Castrellón, A.K. (2020). Recognition of Fungal Components by the Host Immune System. *Current Protein and Peptide Science* 21, 245–264.

García-Rodas, R., Zaragoza, O. (2012). Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 64, 147–161.

García-Rodas, R., de Oliveira, H. UNESP, Trevijano-Contador, N., Zaragoza, O. (2019). Cryptococcal *titan cells*: When yeast cells are all grown up. *Current Topics in Microbiology and Immunology* v. 422, p. 101-120.

Gehrmann, U., Qazi, K.R., Johansson, C., Hultenby, K., Karlsson, M., Lundeberg, L., Gabrielsson, S., Scheynius, A. (2011). Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and Host Exosomes Induce Cytokine Responses – Novel Mechanisms for Host-Microbe Interactions in Atopic Eczema. *PLOS ONE* 6, e21480.

Gates, M.A., Thorkildson, P., Kozel, T.R. (2004). Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol* 52, 13–24.

Gullo, F.P., Rossi, S.A., Sardi, J. de C.O., Teodoro, V.L.I., Mendes-Giannini, M.J.S., Fusco-Almeida, A.M. (2013). Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32, 1377–1391.

Harding, C.R., Schroeder, G.N., Collins, J.W., Frankel, G., (2013). Use of *Galleria mellonella* as a Model Organism to Study *Legionella pneumophila* Infection. *J Vis Exp* 50964.

Heitman, J., Kozel, T.R., Kwon-Chung, K.J., Perfect, J.R., Casadevall, A. (2010). *Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast. *Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast.

Hernández-Chávez, M.J., Pérez-García, L.A., Niño-Vega, G.A., Mora-Montes, H.M. (2017). Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. *Journal of Fungi* 3, 51.

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, e48570.

Honorato, L., Bonilla, J.J.A., Piffer, A.C., Nimrichter, L., (2021). Fungal Extracellular Vesicles as a Potential Strategy for Vaccine Development, in: Rodrigues, M., Janbon, G. (Eds.), *Fungal Extracellular Vesicles*:

Biological Roles, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer International Publishing, Cham, pp. 121–138.

Ikeda, R., Shinoda, T., Fukazawa, Y., Kaufman, L. (1982). Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 16, 22–29.

Janbon G, Doering TL (2011). Biosynthesis and genetics of the cryptococcal capsule. *Cryptococcus: From human pathogen to yeast model*. ASM Press; Washington DC: pp. 27–42.

Jesus, M.D., Nicola, A.M., Rodrigues, M.L., Janbon, G., Casadevall, A., (2009). Capsular Localization of the *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide Component Galactoxylomannan. *Eukaryotic Cell*.

Jesus, M.D., Moraes Nicola, A., Chow, S.-K., Lee, I.R., Nong, S., Specht, C.A., Levitz, S.M., Casadevall, A. (2010). Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence* 1, 500–508.

Kobayashi, C.C.B.A., Souza, L.K.H. e, Fernandes, O. de F.L., Brito, S.C.A. de, Silva, A.C., Sousa, E.D. de, Silva, M. do R.R. (2005). Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 47, 203–207.

Kon AS, Grumach AS, Colombo AL, Penalva ACO, Wanke B, Telles FQ, Severo LC, Aranha LF, Lazéra MS, Resende MR, Salmito MA, Shikanai-Yasuda MA, Moretti ML, Ferreira MS, Silva-Vergara ML, Andrade NMP, Trabasso P, Mendes RP, Mmartinez R, Ponzio V, (2008). Consensus on cryptococcosis. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, v.41, n.5, p.524-544.

Knoke, M., Schwesinger, G. (1994). One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. *Medical mycology in the nineteenth century. Mycoses* 37, 229–233.

Kozel, T.R., Pfrommer, G.S., Guerlain, A.S., Highison, B.A., Highison, G.J. (1988). Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 2, S436-439.

Kozel, T.R. (1993). Opsonization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Arch Med Res* 24, 211–218.

Kronstad, J.W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., D'Souza, C.A., Griffiths, E.J., Geddes, J.M.H., Hu, G., Jung, W.H., Kretschmer, M., Saikia, S., Wang, J. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* 9, 193–203.

Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T. (2011). The Yeasts: A Taxonomic Study. Elsevier. *Cryptococcus*. 5. ed. New York: ACM Press, 2011. p.1661-1662.

Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E. (1978). Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol* 108, 337–340.

Kwon-Chung, K.J., Fraser, J.A., Doering, T.L., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A., Bahn, Y.-S. (2014). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a019760.

LaRocque-de-Freitas, I.F., Rocha, J.D.B., Nunes, M.P., Oliveira, P.A.V., Nascimento, D. de O., Freire-de-Lima, L., Takiya, C.M., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Previato, J.O., DosReis, G.A., Mendonça-Previato, L., Freire-de-Lima, C.G., (2018). Involvement of the capsular GalXM-induced IL-17 cytokine in the control of *Cryptococcus neoformans* infection. *Sci Rep* 8, 16378.

Lazera, M.S., Cavalcanti, M.A.S., Londero, A.T., Trilles, L., Nishikawa, M.M., Wanke, B. (2000). Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology* 38, 379–383.

Lazera, M.S., Wanke, B., Nishikawa, M.M. (1993). Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 31, 449–454.

Levitz, S. M. (1991). The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev Infect Dis.* 13, 1163-1169.

Levitz, S.M., DiBenedetto, D.J. (1989). Paradoxical role of capsule in murine bronchoalveolar macrophagemediated killing of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Immunology* 142, 659–665.

Lin, X., Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 60, 69–105.

Lutz, M.B., Suri, R.M., Niimi, M., Ogilvie, A.L., Kukutsch, N.A., Rössner, S., Schuler, G., Austyn, J.M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* 30, 1813–1822.

Marina, C.L., Bürgel, P.H., Agostinho, D.P., Zamith-Miranda, D., Las-Casas, L., de, O., Tavares, A.H., Nosanchuk, J.D., Bocca, A.L., (2020). Nutritional conditions modulate *C. neoformans* extracellular vesicles' capacity to elicit host immune response. *Microorganisms* 8, 1–17.

Marra, R.E., Huang, J.C., Fung, E., Nielsen, K., Heitman, J., Vilgalys, R., Mitchell, T.G. (2004). A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). *Genetics* 167, 619–631.



Maziarz, E. K. and Perfect, J. R. (2016). Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 30, 179-206.

McFadden, D.C., Jesus, M.D., Casadevall, A. (2006). The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *International Journal of STD and AIDS* 281, 1868–1875.

McFadden, D., Zaragoza, O., Casadevall, A. (2006). The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* 14, 497–505.

Meldolesi, J. (2018). Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol* 28, R435–R444.

Ménard, G., Rouillon, A., Cattoir, V., Donnio, P.-Y., (2021). *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 782733.

Mitchell, T.G., Perfect, J.R. (1995). Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 8, 515–548.

Moretti-Branchini, M.L.; Telles, Filho F.Q. (2004). Cryptococcosis. In: *Conducts in Infectious Diseases*. São Paulo; Atheneu. p. 367-375.

Moretti, M. L. *et al.*, (2008) Guidelines in cryptococcosis: 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, n.5, p.524-544.

Mukaremera, L., Lee, KK, Wagener, J., Wiesner, DL, Gow, NAR, & Nielsen, K. (2018). The production of titan cells in *Cryptococcus neoformans* remodels the cell wall and capsule composition during infection. *the cell surface*, 1, 15–24.

Nelson, B. N., Hawkins, A. N. and Wozniak, K. L. (2020). Pulmonary Macrophage and Dendritic Cell Responses to *Cryptococcus neoformans*. *Front Cell Infect Microbiol.* 10, 37.

Nishikawa, M.M., Lazera, M.S., Barbosa, G.G., Trilles, L., Balassiano, B.R., Macedo, R.C.L., Bezerra, C.C.F., Pérez, M.A., Cardarelli, P., Wanke, B. (2003). Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* 41, 73–77.

Nishikawa, M.M., Lazera, M.S., Barbosa, G.G., Trilles, L., Balassiano, B.R., Macedo, R.C.L., Bezerra, C.C.F., Pérez, M.A., Cardarelli, P., Wanke, B. (2003). Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* 41, 73–77.

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. *Infect Immun.* 78, 1601-1609.

Oliveira, D.L., Nakayasu, E.S., Joffe, L.S., Guimarães, A.J., Sobreira, T.J., Nosanchuk, J.D., Cordero, R.J., Frases, S., Casadevall, A., Almeida, I.C., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L. (2010). Biogenesis of extracellular vesicles in yeast: Many questions with few answers. *Commun Integr Biol* 3, 533–535.

Oliveira, D.L., Nakayasu, E.S., Joffe, L.S., Guimarães, A.J., Sobreira, T.J.P., Nosanchuk, J.D., Cordero, R.J.B., Frases, S., Casadevall, A., Almeida, I.C., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L. (2010). Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS One* 5, e11113.

Okagaki, L.H., Strain, A.K., Nielsen, J.N., Charlier, C., Baltés, N.J., Chrétien, F., Heitman, J., Dromer, F., Nielsen, K., (2010). Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. *PLOS Pathogens* 6, e1000953.

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.

Pappalardo, M.C.S.M., Melhem, M.S.C. (2003). Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 45, 299–305.

Pedroso, R.S., Ferreira, J.C., Cândido, R.C., (2009). The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiological Research* 164, 221–227.

Pereira, T.C., Barros, P.Pde, de Oliveira Fugisaki, L.R., Rossoni, R.D., Ribeiro, Fde C., Menezes, R.Tde, Junqueira, J.C., Scorzoni, L., (2018). Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *J. Fungi*.

Perfect, J.R., 2006. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res* 6, 463–468.

Piffer, Alícia Corbellini., (2021). Pathogenesis and trained immunity = regulation by *Candida albicans* components. *Rio de Janeiro*, 258 f.

Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., Denning, D. W., Loyse, A. and Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis.* 17, 873-881.

Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D., (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp* e4392.

Raposo, G., Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200, 373–383.

Reis, F. C. G., Borges, B. S., Jozefowicz, L. J., Sena, B. A. G., Garcia, A. W. A., Medeiros, L. C., Martins, S. T., Honorato, L., Schrank, A., Vainstein, M. H., Kmetzsch, L., Nimrichter, L., Alves, L. R., Staats, C. C. and Rodrigues, M. L. (2019). A Novel Protocol for the Isolation of Fungal Extracellular Vesicles Reveals the Participation of a Putative Scramblase in Polysaccharide Export and Capsule Construction in *Cryptococcus gattii*. *mSphere.* 4.

Reis, F.C.G., Costa, J.H., Honorato, L., Nimrichter, L., Fill, T.P., Rodrigues, M.L., (2021). Small molecule analysis of extracellular vesicles produced by *Cryptococcus gattii*: identification of a tripeptide controlling cryptococcal infection in an invertebrate host model. *Front. Immunol.* 12, 654574

Reis, F.C., Gimenez, B., Jozefowicz, L.J., Castelli, R.F., Martins, S.T., Alves, L.R., de Oliveira, H.C., Rodrigues, M.L., (2021). Analysis of Cryptococcal Extracellular Vesicles: Experimental Approaches for Studying Their Diversity Among Multiple Isolates, Kinetics of Production, Methods of Separation, and Detection in Cultures of *Titan Cells*. *Microbiology Spectrum* 9, e00125-21.

Reis-Filho, J.B. dos, Neves, A.C., Zymberg, S.T., Oliveira, R. de M.C. de, (1985). The initial cerebrospinal fluid in *Cryptococcus neoformans* meningencephalitis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 27, 173–178.

Rizzo, J., Stanchev, L.D., da Silva, V.K.A., Nimrichter, L., Pomorski, T.G., Rodrigues, M.L. (2019). Role of lipid transporters in fungal physiology and pathogenicity. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 17, 1278–1289.

Rodrigues, M.L., Travassos, L.R., Miranda, K.R., Franzen, A.J., Rozental, S., de Souza, W., Alviano, C.S., Barreto-Bergter, E. (2000). Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect Immun* 68, 7049–7060.

Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., Alvarez, M., Nakouzi, A., Feldmesser, M., Casadevall, A. (2007). Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* 6, 48–59.

Rodrigues, M.L., Alvarez, M., Fonseca, F.L., Casadevall, A. (2008). Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot Cell* 7, 602–609.

- 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. *Eukaryot Cell*. 7, 58-67.
- Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 4, 1–23.
- Shadomy, H. (1970). Clamp connections in two strains of *Cryptococcus neoformans*. *Spectrum Monogr Ser* 1, 67–72.
- Shopova, I.A., Belyaev, I., Dasari, P., Jahreis, S., Stroe, M.C., Cseresnyés, Z., Zimmermann, A.-K., Medyukhina, A., Svensson, C.-M., Krüger, T., Szeifert, V., Nietzsche, S., Conrad, T., Blango, M.G., Kniemeyer, O., von Lilienfeld-Toal, M., Zipfel, P.F., Ligeti, E., Figge, M.T., Brakhage, A.A. (2020). Human Neutrophils Produce Antifungal Extracellular Vesicles against *Aspergillus fumigatus*. *mBio* 11, e00596-20.
- Silverman, J.M., Reiner, N.E., (2011). Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology* 13, 1–9.
- Simons, M., and G. Raposo. (2009). Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 575–581.
- Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chrétien F, et al. (2010) Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog* 6(6): e1000953.
- Srikanta, D., Santiago-Tirado, F. H., & Doering, T. L. (2014). *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast* (Chichester, England), 31(2), 47–60.
- Sun, D., Zhang, M., Liu, G., Wu, H., Zhu, X., Zhou, H., Shi, M. (2016). Real-Time Imaging of Interactions of Neutrophils with *Cryptococcus neoformans* Demonstrates a Crucial Role of Complement C5a-C5aR Signaling. *Infect Immun* 84, 216–229.
- Takeo, K., Uesaka, I., Uehira, K., Nishiura, M. (1973). Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown *in vivo* as observed by freeze-etching. *J Bacteriol* 113, 1449–1454.
- Trevijano-Contador, N., de Oliveira, H. C., Garcia-Rodas, R., Rossi, S. A., Llorente, I., Zaballos, A., Janbon, G., Arino, J. and Zaragoza, O. (2018). *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells *in vitro* in response to multiple signals. *PLoS Pathog*. 14, e1007007.
- Vallejo, M.C., Matsuo, A.L., Ganiko, L., Medeiros, L.C.S., Miranda, K., Silva, L.S., Freymüller-Haapalainen, E., Sinigaglia-Coimbra, R., Almeida, I.C., Puccia, R. (2011). The pathogenic fungus *Paracoccidioides*

*brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic  $\alpha$ -Galactosyl epitopes. *Eukaryot Cell* 10, 343–351.

Vallejo, M.C., Nakayasu, E.S., Matsuo, A.L., Sobreira, T.J.P., Longo, L.V.G., Ganiko, L., Almeida, I.C., Puccia, R. (2012). Vesicle and Vesicle-Free Extracellular Proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparative Analysis with other Pathogenic Fungi. *J Proteome Res* 11, 1676–1685.

van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213–228.

Vargas, G., Rocha, J.D., Oliveira, D.L., Albuquerque, P.C., Frases, S., Santos, S.S., Nosanchuk, J.D., Gomes, A.M., Medeiros, L.C., Miranda, K., Sobreira, T.J., Nakayasu, E.S., Arigi, E.A., Casadevall, A., Guimaraes, A.J., Rodrigues, M.L., Freirede-Lima, C.G., Almeida, I.C., Nimrichter, L. (2015). Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell. Microbiol.* 17, 389–407.

Vargas, G., Honorato, L., Guimaraes, A.J., Rodrigues, M.L., Reis, F.C.G., Vale, A.M., Ray, A., Nosanchuk, J.D., Nimrichter, L., (2020). Protective effect of fungal extracellular vesicles against murine candidiasis. *Cell. Microbiol.* 22, e13238

Villena, S.N., Pinheiro, R.O., Pinheiro, C.S., Nunes, M.P., Takiya, C.M., DosReis, G.A., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., Freire-de-Lima, C.G. (2008). Capsular polysaccharides galactoxylo-mannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cellular Microbiology* 10, 1274–1285.

Wang, Y., Casadevall, A. (1994). Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect Immun* 62, 3004–3007.

Wiesner DL, Specht CA, Lee CK, Smith KD, Mukaremera L, Lee ST, et al. (2015) Recognition of chitin via chitotriosidase promotes pathological responses of type 2 helper T cells to cryptococcal infection. *PLoS Pathog* 11(3): e1004701.

Wolf, J.M., Espadas-Moreno, J., Luque-Garcia, J.L., Casadevall, A. (2014). Interaction of *Cryptococcus neoformans* extracellular vesicles with the Cell Wall. *Eukaryot. Cell* 13, 1484–1493.

Xu, J., Vilgalys, R., Mitchell, T.G. (2000). Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Ecology* 9, 1471–1481.

Xu, R., Rai, A., Chen, M., Suwakulsiri, W., Greening, D.W., Simpson, R.J. (2018). Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 617–638.

Yoneda, A., Doering, T.L. (2006). A Eukaryotic Capsular Polysaccharide Is Synthesized Intracellularly and Secreted via Exocytosis. *MBoC* 17, 5131–5140.

Zamith-Miranda, D., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L., Nosanchuk, J.D. (2018). Fungal extracellular vesicles: modulating host–pathogen interactions by both the fungus and the host. *Microbes and Infection*, 20th Anniversary of *Microbes & Infection* 20, 501–504.

Zaragoza, O., Taborda, C.P., Casadevall, A. (2003). The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *European Journal of Immunology* 33, 1957–1967.

Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., Casadevall, A. (2009). The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 68, 133–216.

Zaragoza O, García-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Casadevall A (2010) Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. *PLoS Pathog* 6(6): e1000945.

Zhang, X., Goncalves, R. e Mosser, D.M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages.

Zhou, X., Ballou, E.R.. (2018). The *Cryptococcus neoformans* Titan Cell: From *In Vivo* Phenomenon to *In Vitro* Model. *Curr Clin Micro Rpt* 5, 252–260.