

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
SANIDADE ANIMAL

DISSERTAÇÃO

Papel imunomodulador dos polissacarídeos capsulares glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) de *Cryptococcus neoformans* na linhagem de macrófagos caninos DH82

Isabel Ferreira La Rocque de Freitas

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
SANIDADE ANIMAL

Papel imunomodulador dos polissacarídeos capsulares glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) de *Cryptococcus neoformans* na linhagem de macrófagos caninos DH82

Isabel Ferreira La Rocque de Freitas

Sob a orientação da Professora

Débora Decotè Ricardo de Lima

Co-orientação

Célio Geraldo Freire de Lima

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Área de
concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

636.70896

F866p

T

Freitas, Isabel Ferreira La Rocque de,
1985-

Papel imunomodulador dos
polissacarídeos capsulares
glucuronoxilomanana (GXM) e
galactoxilomanana (GalXM) de
Cryptococcus neoformans na linhagem de
macrófagos caninos DH82. / Isabel
Ferreira La Rocque de Freitas. - 2014.
59 f.: il.

Orientador: Débora Decotè Ricardo de
Lima.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f.43-49.

1. Cão - Doenças - Teses. 2.
Cryptococcus neoformans - Teses. 3.
Criptococose - Teses. 4. Macrófagos -
Teses. I. Lima, Débora Decotè Ricardo
de, 1965- II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.
III. Título.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me guiado, me mostrado as várias oportunidades e ter posto pessoas essenciais na minha caminhada.
- ❖ Agradeço à minha família, em especial minha mãe, meu pai, minha madrinha, vovô e vó Cléa (*In memorian*) por todo o apoio espiritual, emocional e financeiro para que eu avançasse cada vez mais nos estudos.
- ❖ Agradeço ao meu marido Gilvan pelas horas de descontração, pelas broncas, pelo foco e pela ajuda a me mostrar o caminho e oportunidades que, em especial, nesses últimos dois anos foram colocados diante de nós.
- ❖ Agradeço ao meu filho, Miguel, por simplesmente existir e ser do jeito que é.
- ❖ Agradeço à minha orientadora profa. Débora Decote Ricardo de Lima, por muita conversa por dentre ensinamentos científicos e não científicos, e pelas doses generosas de paciência e compreensão.
- ❖ Agradeço ao meu co-orientador, prof. Célio Geraldo Freire de Lima, pelas palavras de incentivo e carinho, e pelas contribuições para este trabalho.
- ❖ Agradeço ao colega Orlando Augusto Agrellos (*In memoria*) pela purificação das moléculas da cápsula do fungo e pela paciência em explicar química.
- ❖ Agradeço a todo laboratório Imunologia e Virologia (Instituto de Veterinária – UFRRJ) pelo acolhimento e ajuda nos processos iniciais do trabalho.
- ❖ Agradeço ao prof. George A. dos Reis e todo laboratório de Biologia Imunitária por me receberem e ajudarem a melhorar minha estadia na UFRJ, assim como pelo auxílio em relação a qualquer material ou técnica que eu precisasse para que esta dissertação fosse à frente.
- ❖ Agradeço ao pessoal do laboratório de Glicobiologia Estrutural e Funcional (IBCCF – UFRJ) pelos ensinamentos, prontidão e ajuda em relação à técnica de Western Blot, em especial às alunas Rafaela Muniz e Patrícia Carvalho.
- ❖ Agradeço aos amigos Jorgete Logullo, Ana Caroline Costa, Juliana Rocha, Natalia Vellozo, Sâmara Thaís Marques, Caroline Koeller, Mariela Piccin, Joana D’arc, Natalia Nadaes e Daniele Fabião por serem ouvidos, bocas e coração.
- ❖ Agradeço em especial à amiga Karolynne Costa pela ajuda no corpo da dissertação e pelas palavras de incentivo e calma.

- ❖ Agradeço ao corpo docente da Pós-graduação em Ciências Veterinárias pela bagagem intelectual e, juntamente a CAPES, pelo apoio financeiro.
- ❖ Agradeço às agências fomentadoras CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro para realização desta dissertação.

RESUMO

LaRocque-de-Freitas, Isabel Ferreira. **Papel imunomodulador dos polissacarídeos capsulares glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) de *Cryptococcus neoformans* na linhagem de macrófagos caninos DH82.** 2014. 59p Mestrado em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A criptococose é uma doença infecciosa causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans*, acometendo animais e o homem. O *C. neoformans* é um fungo oportunista, portanto os animais e indivíduos imunocomprometidos são os principais alvos da doença, que atinge principalmente o sistema respiratório e o sistema nervoso central. Um dos principais fatores envolvidos na virulência do fungo é a sua cápsula, cujas principais moléculas constituintes são os polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM) e a galactoxilomanana (GalXM). Esses polissacarídeos são imunomoduladores, ajudando o fungo a escapar das ações do sistema imunológico do hospedeiro. Uma das populações de células alvo da modulação por essas moléculas são os macrófagos. Os macrófagos fazem parte da primeira linha de defesa do sistema imunológico, tanto dos animais quanto do homem, sendo uma importante célula do sistema imune inato e de fundamental importância para o estabelecimento da resposta adaptativa. Além do homem, outros animais podem desenvolver a criptococose, dentre eles os cães. Na infecção canina observa-se a ocorrência de quatro síndromes, inclusive da síndrome neurológica observada em humanos. A literatura relata o possível envolvimento dos macrófagos no sucesso da infecção. Nesse contexto, os macrófagos poderiam estar sendo modulados de forma desfavorável quanto a sua atividade microbicida, seja pelo fenômeno de funcionar como “cavalo de Tróia” levando leveduras fagocitadas a locais estratégicos ou mesmo tendo sua maquinaria de ativação comprometida. A escassez de informação na criptococose canina nos levou a avaliar se os polissacarídeos derivados da cápsula de *C. neoformans* são capazes de modular as atividades microbicidas de macrófagos e, portanto, do sistema imunológico do hospedeiro. Nossos trabalhos com a linhagem de macrófagos caninos DH82 juntamente com os polissacarídeos capsulares mostram que a cápsula do fungo, especialmente devido à GalXM e GXM, tende a suprimir a atividade microbicida/fungicida do macrófago através da inibição de mediadores pró-inflamatórios, como IL-12 e TNF- α , e indução de marcadores supressores, como o fator nuclear PPAR- γ . Junto a esses resultados, observamos a viabilidade de leveduras *S. cerevisiae* fagocitadas pelas células DH82 na presença de GalXM, GXM e a cápsula bruta de *C. neoformans*, indicando que este tipo celular poderia ser capaz de migrar a outros sítios dentro de um organismo com criptococose levando o fungo oculto e viável dentro de si, facilitando uma disseminação sistêmica.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, cápsula, macrófago.

ABSTRACT

LaRocque-de-Freitas, Isabel Ferreira. **Immunomodulatory role of capsular polysaccharides glucuronoxilomanana (GXM) and galactoxilomanana (GalXM) of *Cryptococcus neoformans* in DH82 canine macrophage cell line.** 2014. 59p Master in Veterinarian Science. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Cryptococcosis is an infectious disease caused by the fungus *Cryptococcus neoformans*, affecting animals and human. *C. neoformans* is an opportunistic fungus, so immunocompromised animals and individuals are the main targets of the disease, which primarily affects the respiratory system and central nervous system. One of the main factors involved in fungal virulence is its capsule, whose main constituent molecules are glucuronoxilomanana polysaccharides (GXM) and galactoxilomanana (GalXM). These polysaccharides are immunomodulators, helping the fungus to escape the actions of the host immune system. One of the target cells by modulation of these molecules are macrophages. Macrophages are part of the first line of defense of the immune system, both in animals and man, being an important cell of the innate immune system and fundamental to the establishment of the adaptive response. Besides human, other animals may develop cryptococcosis, including dogs. In canine infection is observed the occurrence of four syndromes, including the neurological syndrome also observed in humans. The literature reports the possible involvement of macrophages in the successful of infection. In this context, macrophages could be down modulated to its microbicide activity, either by the phenomenon of acting as "Trojan horse" leading phagocytosed yeasts to strategic sites or even having their machines compromised. The dearth of information on canine cryptococcosis led us to assess whether the polysaccharides derived from the capsule of *C. neoformans* can modulate the microbicide activity of macrophages and thus the immune system of the host. Our work with the cell line of canine DH82 macrophages together with the capsular polysaccharides show that the capsule of the fungus, especially due to GalXM and GXM, tends to suppress microbicide / fungicidal activity of macrophages through inhibition of pro-inflammatory mediators such as IL-12 and TNF - α , and induction of suppressor markers such as nuclear factor PPAR- γ . Along with these results, we observe the viability of yeast *S. cerevisiae* engulfed by DH82 cells in the presence of GalXM, GXM and capsule of *C. neoformans*, indicating that this cell type is able to migrate to other sites within an organism with cryptococcosis leading hidden within himself and viable fungus, facilitating systemic dissemination.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, capsule, macrophage.

LISTA DE ABREVIACÕES

B3501- cepa selvagem de *C. neoformans*
C3 – Proteína 3 do sistema complemento
CAP67 - cepa mutante acapsulada de *C. neoformans*
CD18 – Integrina beta 2
CD80 – Molécula co-estimulatória B7.1
DH82 – Linhagem de macrófagos caninos
DNA - Ácido desoxirribonucleico
ERK- MAP quinase p44/42
Fas – Receptor de morte
FasL – Ligante para o receptor de morte
FcR – Receptor da porção Fc de IgG
FcR γ II – Receptor tipo II para porção Fc de IgG
FeLV – Vírus da leucemia felina
FIV – Vírus da imunodeficiência felina
GalXM - Galactoxilomanana
GXM – Glucuronoxilomanana
GXMGal - Glucuronoxilomanogalactana
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ – Interferon gama
IL- Interleucina
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
LPS - lipopolissacarídeo
MHC-II – Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
NETs – Redes extracelulares de neutrófilos
NO – Óxido nítrico
pERK – Forma fosforilada de ERK
PMA – Acetato miristático forbólico
PPAR- γ – Receptor associado à ativação de peroxissomos
RAW – Linhagem de macrófagos murinos
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SNC – Sistema nervoso central

SRG – Grupos de estruturas reportados

Th1 – Linfócitos T auxiliares tipo 1

TGF- β – Fator transformador de crescimento beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TLR – Receptores semelhantes ao Toll

VG – Variedade gatti

VN – Variedade neoformans

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Criptococose e <i>Cryptococcus neoformans</i>	1
1.1.1 – Aspectos gerais	1
1.1.2 – Ciclo de vida.....	2
1.1.3 – Ciclo da doença e modo de transmissão	3
1.1.4 – Manifestações clínicas	4
1.1.5 – Fatores de virulência.....	5
1.2 – Cápsula do <i>Cryptococcus neoformans</i>	6
1.2.1 – Aspectos gerais.....	6
1.2.2 – Glucuronoxilomanana (GXM)	7
1.2.3 – Galactoxilomanana (GalXM)	8
1.3 – Resposta imune na criptococose	9
1.3.1 – Efeitos da GXM na resposta imune	10
1.3.2 – Efeitos da GalXM na resposta imune	11
1.3.3 – Papel dos macrófagos na criptococose	12
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OJETIVO GERAL	16
3.1 – Objetivos Específicos	16
4. METODOLOGIA	17
4.1 - Microrganismo.....	17
4.2 – Obtenção dos polissacarídeos capsulares	17
4.3 – Cultivo da linhagem DH82	18
4.4 – Cultivo da linhagem RAW	18
4.5 – Ensaio de citotoxicidade	18

4.6 – Ensaio de proliferação	18
4.7 – Preparo das leveduras usadas para o ensaio de aderência e fagocitose	19
4.8 – Ensaio de aderência e fagocitose	19
4.9 – Avaliação da viabilidade de leveduras após a fagocitose por macrófagos caninos da linhagem DH82	19
4.10 – Dosagem de óxido nítrico	19
4.11 – Dosagem de espécies reativas de oxigênio	20
4.12 – Citometria de fluxo.....	20
4.13 - ELISA	20
4.14 – Western blot.....	21
4.15 – Análises estatísticas.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1 – Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta não apresentaram efeito tóxico sobre as células da linhagem de macrófagos caninos DH82	22
5.2 – Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta do <i>C. neoformans</i> induzem a proliferação de macrófagos caninos DH82	23
5.3 – Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta de <i>C. neoformans</i> inibem a aderência e atividade fagocítica da linhagem de macrófagos caninos DH82	23
5.4 – Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta de <i>C. neoformans</i> inibem a atividade microbicida/fungicida da linhagem de macrófagos caninos DH82	26
5.5 – A linhagem de macrófagos caninos DH82 não apresentou produção de óxido nítrico detectável	27
5.6 – Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta de <i>C. neoformans</i> induzem a produção de espécies reativas de oxigênio na linhagem de macrófagos caninos DH82	29
5.7 – A GalXM purificada do <i>C. neoformans</i> modula a expressão de MHC de classe II	30
5.8 – Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta alteram a produção de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios.....	32
5.9 – Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta de <i>C. neoformans</i> modulam a fosforilação de ERK e a expressão de PPAR- γ	34
6. DISCUSSÃO.....	37

7. CONCLUSÕES	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Criptococose e *Cryptococcus neoformans*

1.1.1 Aspectos gerais

O fungo *Cryptococcus neoformans* foi descrito no século XIX (1894/1895) pela primeira vez por Otto Busse, que o isolou de uma lesão na perna de uma mulher. Nesse período, uma levedura com as mesmas características foi isolada a partir de suco de fruta por Francesco Sanfelice, mostrando que o fungo em questão não seria um patógeno humano obrigatório (Barnett, 2010; Sirikanta *et al.*, 2013).

A criptococose também é conhecida como Turulose ou Blastomicose Européia devido às diferentes classificações taxonômicas que o fungo recebeu desde a primeira vez que foi descrito até os dias de hoje. Atualmente, a espécie *Cryptococcus neoformans* está classificada dentro do Gênero *Filobasidiella* (*Cryptococcus*), da Família Tremellaceae, da Ordem Tremellales, da Classe Tremellomycetes, do Reino Fungi. O complexo *Cryptococcus* spp. possui três espécies patogênicas com duas variedades: *C. gatti*, *C. neoformans* var. *grubbi* e *C. neoformans* var. *neoformans* (Lester *et al.*, 2011; Findley *et al.*, 2009). Elas estão distribuídas globalmente, sendo o *C. gatti* um microrganismo de áreas tropicais e subtropicais (Li & Mody, 2010) e o *C. neoformans* var. *neoformans* encontrado, principalmente, nos continentes sul americano e europeu (Vorathavorn *et al.*, 2013). No entanto, Kidd e colaboradores (2006) descreveram um surto de criptococose em Vancouver e desde então, a área do Noroeste Pacífico do continente norte americano é caracterizada como uma região endêmica (Vorathavorn *et al.*, 2013).

Dentre o complexo *Cryptococcus* spp. havia um sistema de classificação baseado na reação de aglutinação capsular, que nomeou as espécies de *Cryptococcus* em 5 sorotipos (Li & Mody, 2010; Barnett, 2010). *C. neoformans* var. *grubbi* pertencia ao sorotipo A; *C. neoformans* var. *neoformans*, ao D; *C. gatti*, aos sorotipos B e C, e ainda existia o sorotipo híbrido AD (Lester *et al.*, 2011). Com os avanços na área dos estudos moleculares, métodos que utilizam o DNA como tipagem substituíram a classificação por sorotipos, contribuindo para um melhor entendimento em relação à epidemiologia, patogenicidade e sensibilidade a antifúngicos das espécies pertencentes ao complexo *Cryptococcus* spp. Com isso, as espécies estão classificadas em VNI e VNII, antigo sorotipo A; VNIII, antigo sorotipo AD; VNIV, antigo sorotipo D; VGI e VGII, antigo sorotipo B; VGIII e VGIV, antigos sorotipo B ou C (Vorathavorn *et al.*, 2013). Os tipos moleculares do *C. gatti*, VGII e VGIII ainda estão subdivididos em VGIIa, VGIIb, VGIIc, VGIIIa e VGIIIb (Vorathavorn *et al.*, 2013).

A criptococose é uma enfermidade que acomete animais domésticos, em especial gatos e cães, animais silvestres e seres humanos. Porém, em cada organismo, a doença se manifesta de modo distinto, existindo a predisposição de determinada tipagem acometer determinado organismo. De um modo geral, gatos são mais acometidos pelo *C. gatti* enquanto que os cães, pelo *C. neoformans* (Vorathavorn *et al.*, 2013). Nos seres humanos, a criptococose é caracterizada como uma doença oportunista apesar do fungo acometer pessoas imunocompetentes, como é o caso da tipagem VGII do *C. gatti* (Vorathavorn *et al.*, 2013; Kidd *et al.*, 2006). O número de casos de criptococose sistêmica é significativo dentre grupos, como os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e aqueles que fazem uso de imunossupressores, como transplantados e pacientes em tratamento contra câncer (Queiroz *et al.*, 2008; Li & Mody, 2010). Dentre esses grupos, o *C. neoformans* é a espécie prevalente (Queiroz *et al.*, 2008; Vorathavorn *et al.*, 2013).

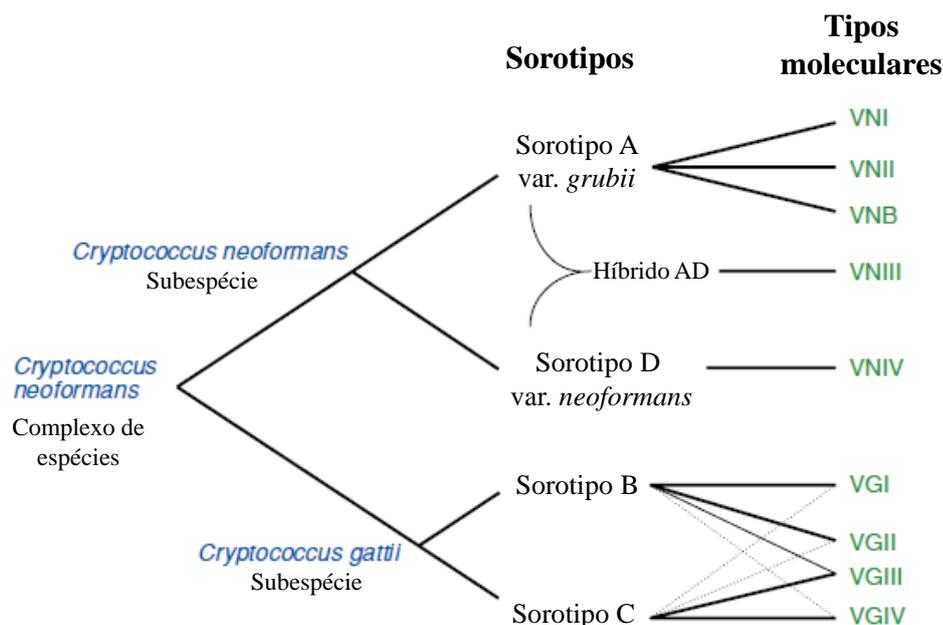


Figura 1: Evolução do complexo de espécies de *C. neoformans*. O complexo de espécies possui duas subespécies, *C. gattii* e *C. neoformans*, que divergiram de um ancestral comum. Posteriormente, eles foram subdivididos em sorotipos e atualmente compreendem pelo menos nove tipos moleculares. As linhas contínuas, finas e tracejadas indicam a prevalência do respectivo sorotipo em cada tipo molecular (adaptado de Li & Heitman, 2006).

1.1.2 Ciclo de vida

O fungo é encontrado tanto no ambiente quanto na clínica na forma de levedura, que se acredita ser gerada por brotamento. No entanto, o *C. neoformans* também cresce numa forma hifada (Idnurm *et al.*, 2005). Para gerar seus esporos, o *C. neoformans* passa pelos processos de frutificação ou “mating”.

O processo denominado “mating” consiste numa reprodução sexuada onde há fusão entre duas células haploides de tipos conjugantes diferentes, a célula **a** e a **α**. É um tipo de geração celular não muito encontrada no ambiente e mais presente em laboratórios, já que em torno de 98% dos isolados de *C. neoformans* provenientes da clínica ou ambiente pertencem ao tipo conjugante **α** (Lin & Heitman, 2006). O processo de frutificação acreditava-se ser assexuado e mitótico, porém Lin e colaboradores (2005) descreveram que se tratava de uma forma de reprodução sexuada entre tipos conjugantes iguais.

Ambos os processos são desencadeados por ferormônios, fatores ambientais como, luminosidade, concentração de nitrogênio e água, e produzem basidiósporos (Idnurm *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005).

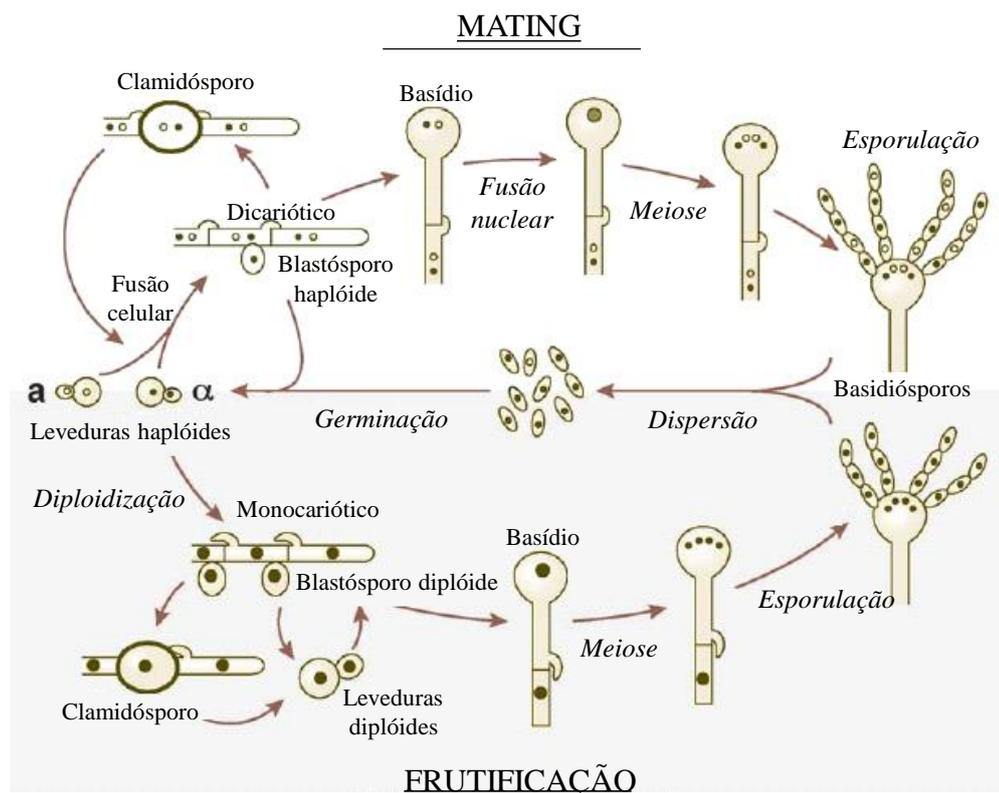


Figura 2: Ciclo de vida do *C. neoformans*. As células **a** e **α** do fungo se fundem em condições de limitação de nutrientes, por exemplo, dentre outros fatores. O dicarioto resultante inicia o crescimento filamentoso em hifas e durante esse processo, blastósporos, que se dividem por mitose e formam leveduras, podem ser originados lateralmente às hifas. Algumas hifas se expandem e formam clamidósporos. Na fase de basídio, os núcleos se fundem e a meiose ocorre gerando quatro núcleos meióticos, dos quais serão gerados os basidiósporos por mitose e brotamento. Durante o processo de frutificação monocariótica, células de um único tipo conjugante se fundem formando uma célula diploide, que dará origem à hifa monocariótica. Blastósporos e clamidósporos também podem ser gerados, no entanto, estes são diploides. A partir da formação do basídio, ambas as fases do ciclo do *C. neoformans* ocorrem de maneira igual, diferenciando na informação genética que cada basidiósporo carregará (adaptado de Li & Heitman, 2006).

1.1.3 Ciclo da doença e modo de transmissão

A instalação da doença ocorre pela inalação da forma do fungo denominada basidiósporo, que se acredita ser a partícula infecciosa, embora a inalação de células do fungo desidratadas também possa causar a doença (Lester *et al.*, 2011).

Essas formas são encontradas no ambiente, principalmente onde exista um solo rico em matéria orgânica ou em excrementos de aves, que são substratos ricos em nitrogênio, favorecendo o crescimento do *Cryptococcus* spp. Em áreas mais afastadas dos grandes centros urbanos, o fungo pode ser encontrado em fezes de morcegos e em troncos ocos ou cascas de árvores (Queiroz *et al.*, 2008; Vorathavorn *et al.*, 2013). Já na cidade, os excrementos de pombos fornecem um ótimo microambiente para seu crescimento e permanência (Li & Mody, 2010; Queiroz *et al.*, 2008).

Outra forma de continuidade do ciclo da doença é a prática de criação de aves e animais exóticos em cativeiros domésticos como animais de estimação, criando um ambiente propício para o fungo no mesmo meio de convívio de seres humanos e animais sabidamente domésticos, como cães e gatos (Queiroz *et al.*, 2008).

A transmissão animal-animal ou humano-humano nunca foi descrita (Idnurm *et al.*, 2005).

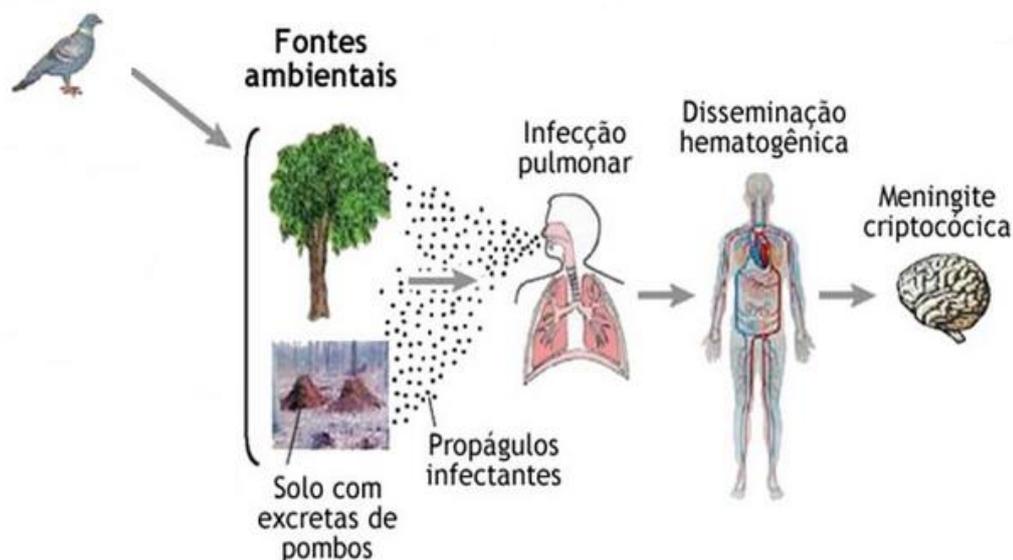


Figura 3: Ciclo de infecção do *Cryptococcus neoformans*. Os fungos sobrevivem no solo contaminado com fezes de aves. Os pássaros, especialmente pombos, podem ser os responsáveis pela dispersão desse patógeno. O fungo estabelece uma infecção pulmonar através da inalação de seus esporos. Se o hospedeiro encontra-se imunocomprometido, o fungo pode se propagar dos pulmões ao Sistema Nervoso Central. (Adaptado de Li & Mody, 2010).

1.1.4 Manifestações clínicas

Já que o fungo entra no organismo através da inalação, o sistema respiratório é o primeiro a ser atingido. Tosse e febre, lembrando uma pneumonia, podem ser os primeiros sintomas. No entanto, a aparição de sintomas ou não, assim como a ocorrência de disseminação pelos sistemas, dependem do grau de imunidade do organismo afetado (Queiroz *et al.*, 2008; Li & Mody, 2010).

A disseminação do *Cryptococcus* spp. pode ocorrer tanto pela via sanguínea quanto linfática e quando ocorre, se manifesta em até quatro síndromes: respiratória, cutânea, neurológica e ocular (Queiroz *et al.*, 2008).

Nos seres humanos, o *C. neoformans* apresenta tropismo pelo sistema nervoso (Vorathavorn *et al.*, 2013; Lester *et al.*, 2011). Em pessoas HIV positivas, a principal forma de criptococose encontrada é a forma disseminada pelo sistema nervoso central, que se manifesta numa meningoencefalite, apresentando rigidez ou flacidez muscular, aumento no número de células do líquido cefalorraquidiano, possíveis alterações na audição e visão; enquanto que em pessoas HIV negativas, mas que apresentam algum tipo de imunocomprometimento, a forma respiratória da criptococose é a mais difundida (Li & Mody, 2010).

Nos felinos, as síndromes respiratória e cutânea são as principais formas clínicas encontradas. O animal apresenta espirros, secreção nasal mucopurulenta, dispneia e formação de pólipos no tecido da cavidade nasal, conferindo um aspecto inflamatório chamado de “nariz de palhaço” (Queiroz *et al.*, 2008). Além desses sintomas, a levedura pode disseminar formando granulomas e lesões ulcerativas, principalmente sob a pele do dorso e da cabeça e nos linfonodos (Li & Mody, 2010; Castellà *et al.*, 2008).

Nos cães, a criptococose se manifesta de modo semelhante ao humano, sendo que a síndrome ocular também está presente, especialmente sob a forma de coriorretinite, podendo levar à cegueira (Castellà *et al.*, 2008; Robson & Smith, 2011). Não há relatos de predileção em relação à raça ou idade dos cães acometidos (Queiroz *et al.*, 2008; Vorathavorn *et al.*, 2013). No entanto, Trivedi e colaboradores (2011), em seu trabalho, sugerem a existência de

uma afinidade do fungo pelo Cocker Spaniel americano devido a características genéticas desse animal. O que se pode afirmar, porém, que a maioria dos casos descritos é referente a animais jovens (Marcasso *et al.*, 2005; Lavelly & Lipsitz, 2005; Robson & Smith, 2011).

Os casos de criptococose em cães, aparentemente, não parecem estar obrigatoriamente associados a algum tipo de imunocomprometimento (Marcasso *et al.*, 2005; Vorathavorn *et al.*, 2013), porém não se pode afirmar esse dado visto que, na clínica, cães já chegam debilitados devido a disseminação do *C. neoformans*.

Em qualquer tipo de hospedeiro, o primeiro contato do *Cryptococcus* spp. com o organismo se dará através sistema respiratório, de onde o fungo pode se disseminar. Nos cães, o *C. neoformans* pode atingir outros sítios, inclusive o SNC, principalmente pela lâmina crivosa e bulbo olfativo, ou pelas tradicionais vias hemato-linfáticas (Sykes *et al.*, 2010; Vorathavorn *et al.*, 2013).

Relatos descritos na literatura mostram que os cães apresentam sintomas inconclusivos inerentes a muitas outras doenças, inclusive algumas transmissíveis por carrapatos, antes do diagnóstico de criptococose (Marcasso *et al.*, 2005), que muitas vezes só é feito através de necropsia (Sykes *et al.*, 2010). Alguns desses sintomas incluem depressão, falta de apetite, ataxia dos membros, diarreia, disfagia, secreção nasal, dentre outros (Marcasso *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2013).

Mais de 80% dos cães positivos para criptococose com disseminação do fungo pelos sistemas apresenta algumas alterações no SNC (Vorathavorn *et al.*, 2013). Os principais sintomas da forma neurológica canina incluem paraplegia, inclinação da cabeça, andar em círculos, convulsões e, nos casos mais graves, alteração da pressão intracraniana (Vorathavorn *et al.*, 2013).

Além desses sintomas, é comum o cão acometido pelo *C. neoformans* apresentar alterações no sistema gastrointestinal (Lavelly & Lipsitz, 2005; Vorathavorn *et al.*, 2013).

1.1.5 Fatores de virulência

O *Cryptococcus* spp. possui uma série de fatores que contribuem para sua patogenicidade assim como fatores que também influenciam na sua sobrevivência no ambiente. Os principais e mais bem estudados são: a cápsula, a produção de melanina e o crescimento a 37 °C (Idnurm *et al.*, 2005).

A temperatura ótima para o *Cryptococcus* crescer e multiplicar-se, diferentemente de outros fungos, é em torno de 37 °C, que corresponde a temperatura corpórea de alguns animais e do ser humano (Idnurm *et al.*, 2005). Algumas variações nessa faixa mudam a virulência do microrganismo. Coelhos, por exemplo, possuem elevada temperatura corpórea (40 °C/41 °C) e por isso, são naturalmente resistentes à infecção pelo *Cryptococcus* spp. (Casadevall, 2012).

Devido às propriedades físico-químicas da melanina, ela é um potente fator de virulência não somente do *Cryptococcus* spp. mas de outras espécies de fungos também (Barnett, 2010). Ela protege a levedura contra agentes oxidantes, como radicais livres presentes no organismo do hospedeiro, e contra agentes do ambiente como a radiação ultravioleta (Idnurm *et al.*, 2005), devido à sua característica redox. Além disso, a presença da melanina na parede celular do fungo dificulta seu reconhecimento pelas células fagocíticas e funciona como um obstáculo às ações de antifúngicos (Lester *et al.*, 2011).

A cápsula do *Cryptococcus* spp. é o fator de virulência mais bem estudado desse organismo devido às suas características e influência que exerce no sistema imunológico do hospedeiro. Chang e Kwon-Chung (1994) demonstraram, por ensaios moleculares, que o gene CAP59 é responsável pela formação da cápsula. A cepa mutante para este gene não apresentou cápsula e quando o gene foi restaurado e a cepa inoculada em camundongos, os

animais apresentaram uma menor taxa de sobrevivência, semelhante à taxa de sobrevivência com a cepa selvagem capsulada, confirmando essa estrutura do fungo como um fator de virulência.

1.2 Cápsula do *Cryptococcus neoformans*

1.2.1 Aspectos gerais

A célula fúngica do *C. neoformans* apresenta uma cápsula polissacarídica cujas funções estão ligadas à sobrevivência, virulência e classificação do fungo. Ela é composta pelos açúcares glucuronoxilomanana e galactoxilomanana, além de manoproteínas (Rodrigues *et al.*, 2011).

Por permanecer no ambiente, a cápsula do *C. neoformans* o protege contra a desidratação (Idnurm *et al.*, 2005). Sua formação e aumento são estimulados por vários fatores, como, concentrações de ferro e gás carbônico, além do tempo de duração da infecção (Idnurm *et al.*, 2005; Lester *et al.*, 2011). Diferenças na proporção dos constituintes capsulares fazem com que um sorotipo seja distinguido de outro, influenciando também no grau de patogenicidade.

Uma importante característica capsular relacionada à virulência é sua capacidade de rearranjo. Estudos realizados com os polissacarídeos e a cápsula do *C. neoformans* na presença de anticorpos monoclonais mostraram diferenças existentes entre a estrutura dos componentes da cápsula de uma mesma cepa fúngica (Garcia-Hermoso *et al.*, 2004; McFadden *et al.*, 2007).

Uma vez dentro de um organismo hospedeiro, a cápsula e seus compostos são liberados constantemente pelo fungo e exercem importante papel na modulação do sistema de defesa do hospedeiro. Já foi descrito que a cápsula influencia na fagocitose do fungo por macrófagos e na quimiotaxia de neutrófilos (Lester *et al.*, 2011; Queiroz *et al.*, 2008) e, consequentemente, a maturação de células dendríticas e ativação de linfócitos T são importantes funções de defesa que ficam comprometidas (Li & Mody, 2010; Queiroz *et al.*, 2008).

Apesar das manoproteínas presentes na cápsula serem ativadores do sistema imunológico através dos linfócitos T, elas representam o constituinte menos encontrado, correspondendo em torno de 4% da cápsula total (Li & Mody, 2010). Com isso, a glucuronoxilomanana e galactoxilomanana são responsáveis por exercer uma função anti-inflamatória sobre o sistema imunológico (Queiroz *et al.*, 2008; Li & Mody, 2010; Lester *et al.*, 2011).

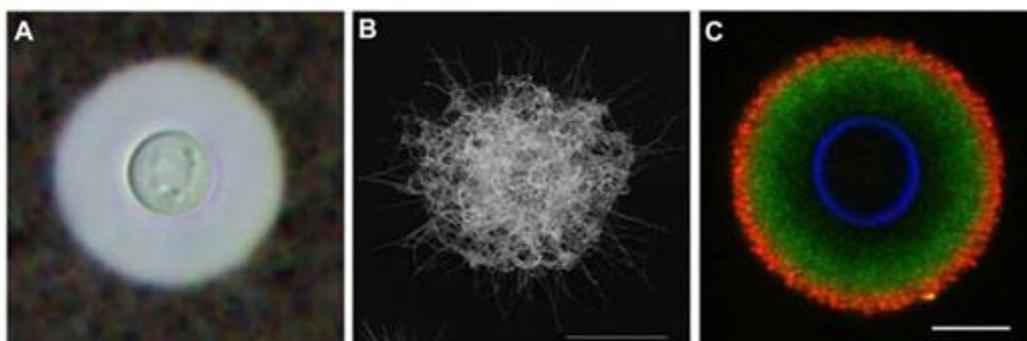


Figura 4: Cápsula do *Cryptococcus neoformans*. (A) visualização da cápsula com nanquim; (B) visualização da cápsula por microscopia eletrônica de varredura (barra = 5 μ m); (C) visualização da cápsula por imunofluorescência utilizando anticorpos para detecção do componente capsular GXM (MAb 18B7 – verde) e (IgM 12A1 - vermelho) e calcofluor para detecção da parede celular (azul) (barra = 10 μ m). (Adaptado Zaragoza *et al.*, 2009).

1.2.2 Glucuronoxilomanana (GXM)

Este polissacarídeo compreende em torno de 90% da cápsula do *C. neoformans* e é composto por uma cadeia linear de mananas unidas através de ligações α -(1,3). Resíduos de ácido glucurônico ligados à primeira manose através de uma ligação β -(1,2) formam a cadeia principal deste polissacarídeo. As manoses da cadeia linear podem ser acetiladas, onde resíduos de xilose irão se unir através de ligações β -(1,2) ou β -(1,4) (Cherniak *et al.*, 1988; Cherniak & Sundstrom, 1994; McFadden *et al.*, 2006; McFadden *et al.*, 2007). Estudos realizados com anticorpos monoclonais para GXM demonstraram que este polímero está presente por toda a cápsula do *C. neoformans*, não se localizando numa única região (MacFadden, 2006; Maxson, 2007).

Diferenças na razão entre os resíduos de xilose, manose e ácido glucurônico determinaram a existência de sete elementos estruturais de GXM, denominados *Structure Reported Groups* – SRG. Essas diferenças são responsáveis pela variabilidade antigênica e pela classificação dos isolados de *C. neoformans* em sorotipos (Zaragoza *et al.*, 2009; Nimrichter *et al.*, 2007).

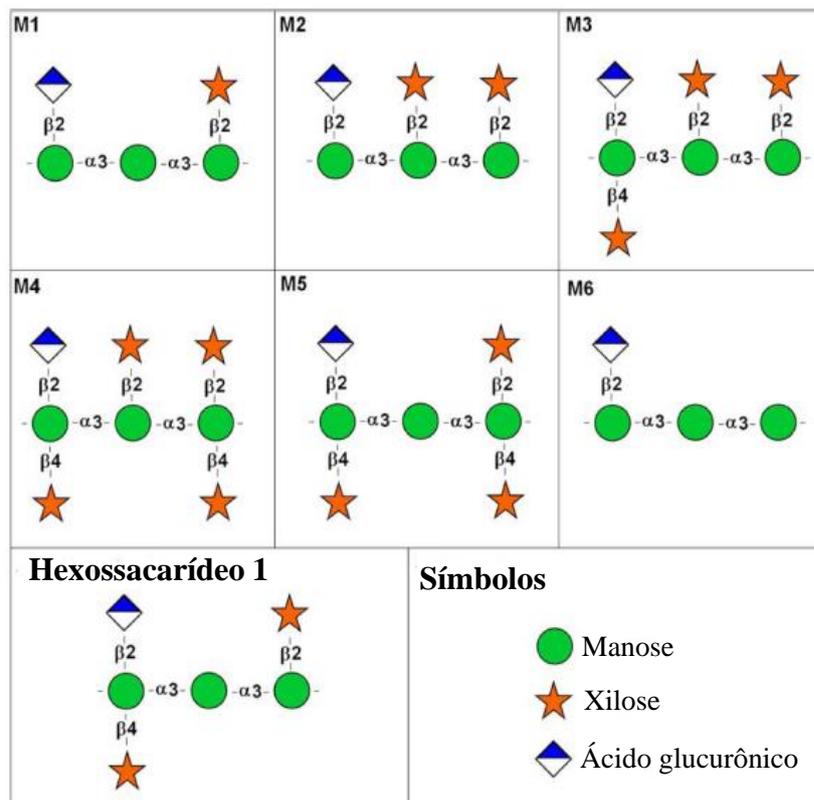


Figura 5: Unidades Repetitivas de GXM. Nesta figura estão ilustradas as diferentes estruturas repetitivas de GXM (SRG) encontrada nas diversas espécies e sorotipos de *Cryptococcus*. Os SRG são divididos de M1 a M6. O hexossacarídeo 1 representa o sétimo elemento estrutural encontrado nas moléculas de GXM (adaptado de Zaragoza *et al.*, 2009).

1.2.3 Galactoxilomanana (GalXM)

A estrutura da GalXM foi determinada a partir de um mutante acapsulado do *C. neoformans*, o Cap67, já que técnicas eficientes para a separação do polissacarídeo da cápsula bruta são escassas, além deste polímero representar em torno de 8% da cápsula total (Vaishnav, 1998).

Baseado na molaridade da molécula de GalXM, no entanto, apesar da porcentagem representativa da cápsula total, este polissacarídeo representa o constituinte mais abundante da cápsula, já que as moléculas que constituem a galactoxilomanana apresentam um peso molecular menor em relação à GXM e consequentemente, um maior número de mols na cápsula total é encontrado (Zaragoza *et al.*, 2009).

Ele consiste numa cadeia principal de galactanas ligadas por α -(1 \rightarrow 6); cadeias laterais α -(1 \rightarrow 3) manose, α -(1 \rightarrow 4) manose e β -galactose, que continham até três resíduos de xilose (Bose, 2003; McFadden 2006; Vaishnav, 1998). Em 2009, Heiss e colaboradores propuseram uma nova nomenclatura para GalXM, pois o terceiro substituinte das cadeias laterais, que acreditava-se ser a xilose, na verdade é o ácido glucurônico. Com isso, os autores sugeriram que o polissacarídeo deveria ser nomeado glucuronoxilomanogalactana (GXMGal).

Assim como no GXM, há diferenças entre as razões de galactose, manose e xilose presentes no polímero dentre os sorotipos, sugerindo que exista mais de um tipo de GalXM (Zaragoza *et al.*, 2009).

Maxson e colaboradores (2007), através de estudos utilizando duas frações de irradiação para investigação da arquitetura capsular, demonstraram que o GalXM também está presente por toda a cápsula e não somente concentrado em uma região.

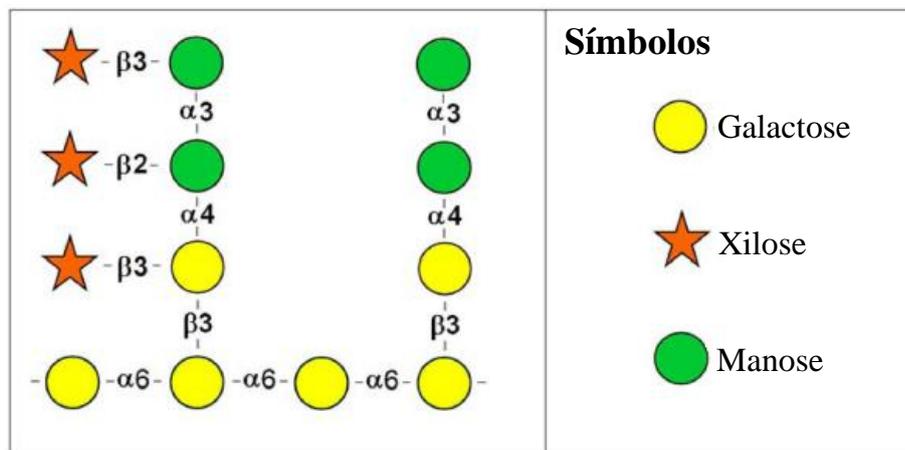


Figura 6: Estrutura da GalXM. O polissacarídeo galactoxilomanana apresenta uma cadeia principal de α (1 \rightarrow 6) galactanas. As cadeias laterais são representadas por α -(1 \rightarrow 3) manose, α -(1 \rightarrow 4) manose e β -galactose, com grupos laterais de xilose variáveis (adaptado de Zaragoza *et al.*, 2009).

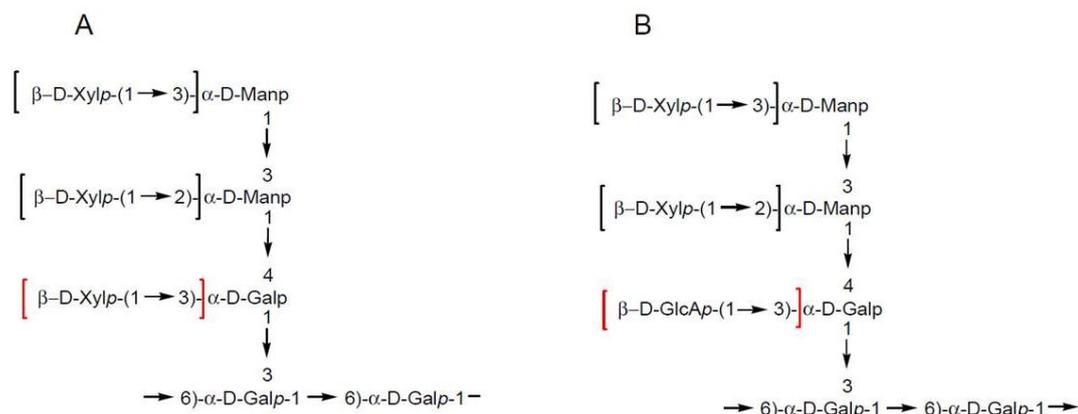


Figura 7: Estrutura da GalXM. (A) Estrutura descrita por Vaishnav *et al.*, 1998; (B) Estrutura revisada por Heise e colaboradores (2002) demonstrando a presença do ácido glucurônico ao invés da substituição pela xilose.

1.3 Resposta imune na criptococose

Células da vigilância imunológica participam da linha de resposta do sistema imunológico frente a um patógeno. Em relação aos fungos, os neutrófilos e os macrófagos são os principais mediadores dessa resposta (Voelz & May, 2010).

Os neutrófilos são células circulantes, de origem mielóide, envolvidos na fagocitose e remoção de patógenos e também, na ativação de outras células efetoras do sistema imunológico. Em seu citoplasma estão presentes grânulos que contêm enzimas de ação tóxica contra microrganismos, como lisozima e elastase. Sua ativação ocorre através de moléculas liberadas pelo patógeno ou pelo próprio hospedeiro. O processo de ativação leva à expressão de moléculas de adesão que auxiliam no processo de transmigração do endotélio para o sítio da infecção. Ao chegar ao local do estímulo infeccioso, o neutrófilo sofre completa ativação através de rearranjos moleculares que culminam com a fagocitose, desgranulação ou liberação das NETs (Rocha, 2013).

Os neutrófilos são umas das primeiras células a chegarem ao sítio da infecção na criptococose, formando um microambiente oxidativo para a remoção do fungo. Além da produção de espécies reativas de oxigênio, os neutrófilos liberam enzimas antimicrobianas e quimiocinas, que auxiliam na resposta imunológica, e estão envolvidos na fagocitose das células fúngicas. Apesar desses fatores, os neutrófilos são encontrados em baixa quantidade nos primeiros momentos da infecção, sugerindo que eles atuam especialmente como reguladores da resposta imunológica ao invés de efetores (Voelz & May, 2010).

Os macrófagos são as principais células envolvidas no reconhecimento de padrões moleculares presentes na superfície de microrganismos. Além dessa função, eles estão envolvidos na fagocitose de elementos estranhos, como os fungos, sua degradação e apresentação dos antígenos desse microrganismo e produção de citocinas. O papel de células apresentadoras de antígenos que os macrófagos exercem, assim como a produção e liberação de mediadores químicos, é uma importante etapa para a ligação dessa resposta inata inicial à resposta adaptativa (Cohen & Mosser, 2013).

Neutrófilos e macrófagos estão envolvidos no processo de fagocitose e apesar das propriedades antifagocíticas que a cápsula do *C. neoformans* possui, esse patógeno é fagocitado. Em seu trabalho, Zaragoza e colaboradores (2009) revisaram dois mecanismos que podem influenciar e favorecer a captação do *C. neoformans* pelos fagócitos: a presença de opsoninas, como anticorpos e mediadores do sistema complemento, e a remodelação

capsular do fungo, que faz com que certos epítomos presentes nos polissacarídeos capsulares sejam reconhecidos pelos receptores presentes nos fagócitos (Mukherjee *et al.*, 1995*).

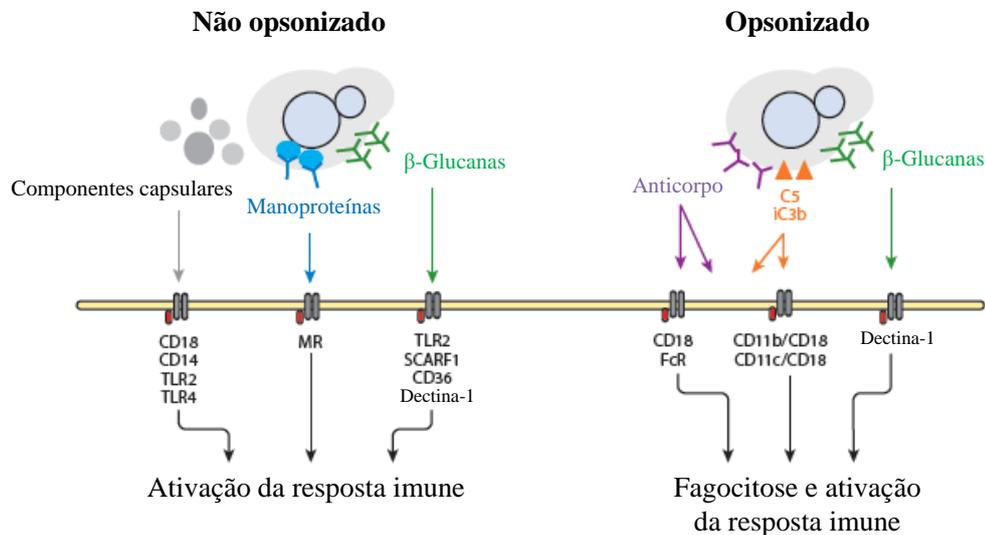


Figura 8: Esquema de reconhecimento de *Cryptococcus neoformans* por células do sistema imunológico. O reconhecimento de *C. neoformans* pelas células do sistema imunológico depende de vários receptores e extensa interação entre esses receptores. Muitos destes receptores não são de reconhecimento através da opsonização, não mediando a fagocitose. No modelo *in vivo*, acredita-se que os componentes do sistema complemento presentes no soro (iC3b e C5) funcionam como opsoninas, fazendo com que a levedura seja ingerida através da cooperação entre fatores do sistema complemento e receptores FcR e, possivelmente, Dectina-1 (adaptado de Coelho *et al.*, 2013).

1.3.1 Efeitos da GXM na resposta imune

Devido à sua distribuição e quantidade sob a cápsula do *C. neoformans*, a glucuronoxilomanana é o constituinte capsular cujos efeitos sobre o sistema imunológico do hospedeiro são mais estudados. Muitos trabalhos descreveram o envolvimento do reconhecimento da GXM por anticorpos monoclonais e como auxiliam na atividade antifúngica do organismo hospedeiro (Mukherjee *et al.*, 1995*; Mukherjee *et al.*, 1995).

Cepas selvagens (encapsuladas) ou mutantes (acapsuladas) do *C. neoformans* induzem respostas distintas dependendo do organismo e tipo celular com os quais o fungo está em contato. Grande parte dessa diferença se dá pela presença da GXM, já que cepas mutantes acapsuladas possuem deficiência em produzir o polissacarídeo, e cepas mais virulentas encapsuladas possuem alta taxa de produção e expressão de GXM (Zaragoza *et al.*, 2009).

A GXM, assim como cepas encapsuladas, ativa o sistema complemento do hospedeiro, fazendo com que ocorra a liberação do fator C3 e deposição do produto da sua clivagem na cápsula, auxiliando na fagocitose (Voelz & May, 2010). Porém, nem todas as células fúngicas encapsuladas ativam esse sistema. Estudos demonstraram que existe uma correlação entre o tamanho da cápsula, e conseqüente tamanho das moléculas de GXM, com a ativação do sistema complemento: quanto maior a cápsula polissacarídica do *C. neoformans*, maior é a facilidade do mesmo em evadir do sistema imunológico através da não ativação e não deposição do fator C3 do sistema complemento (Blackstock & Murphy, 1997; Kozel *et al.*, 1996). Em relação a esse âmbito, os receptores CD18, que fazem parte da família de receptores de complemento, e os receptores Fc, em especial FcRIIB e FcγII, são os envolvidos na responsividade ou não do sistema imunológico (Monari *et al.*, 2005 & Monari *et al.*, 2006).

Além do auxílio do sistema complemento, o *C. neoformans* pode ser reconhecido através dos receptores de reconhecimento padrão encontrados nos fagócitos. O polissacarídeo GXM pode ser diretamente reconhecido pelo receptor semelhante à Toll do tipo 4 (Voelz & May, 2010).

A literatura sugere que a GXM atua como uma molécula que contribui para a supressão da resposta imunológica ao *C. neoformans*. O polissacarídeo é um antígeno T-independente, contribuindo para a inibição da proliferação de linfócitos humanos (Zaragoza *et al.*, 2009). Cepas com alta produção de cápsula e do polissacarídeo regulam negativamente a subpopulação de linfócitos murinos do perfil Th1, falhando em conferir proteção ao hospedeiro (Blackstock *et al.*, 1999). Grande parte dessas características supressoras da resposta imune deve-se à indução na produção de IL-10, à redução na expressão de moléculas MHC-II e CD80, e consequente interferência na apresentação de antígenos (Zaragoza *et al.*, 2009), assim como pela indução da apoptose em macrófagos e linfócitos T pela expressão de Fas e FasL (Monari *et al.*, 2008 & Villena *et al.*, 2008).

Em contraste com a resposta de macrófagos e linfócitos, os neutrófilos assumem um perfil pró-inflamatório quando estimulados com cepas altamente encapsuladas ou a GXM purificada, com produção das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Zaragoza *et al.*, 2009). No entanto, esses dados comentados na literatura vão de encontro aos resultados achados pelo nosso grupo mostrando que a GXM e a cepa selvagem encapsulada, B3501, não induzem liberação de NET nos neutrófilos e, que o polissacarídeo purificado é capaz de diminuir níveis de espécies reativas de oxigênio produzidas pela incubação das células com PMA (Rocha, 2013).

1.3.2 Efeitos da GalXM na resposta imune

Ainda pouco se sabe sobre o polissacarídeo galactoxilomana. Seus efeitos sobre o sistema imunológico do hospedeiro são estudados usando-se cepas mutantes acapsuladas ou a molécula purificada. Em modelo humano, Delfino e colaboradores (1996) mostraram que a GalXM foi capaz de induzir a produção de TNF- α por células totais do sangue. O mesmo grupo, no ano posterior, mostrou a indução da citocina IL-6 por monócitos (Delfino *et al.*, 1997).

Posteriormente, Barluzzi e colaboradores (1998) mostraram que diferentemente das células sanguíneas humanas, culturas de células da glia murinas não foram capazes de produzir TNF- α na presença do polissacarídeo. No entanto, quando as células foram estimuladas com LPS, havendo a indução da citocina, a produção da mesma decaiu na presença de GalXM.

Pericolini e colaboradores (2006) observaram que a GalXM foi responsável pela inibição da proliferação de linfócitos T humanos e de monócitos sanguíneos, pela diminuição na produção das citocinas IL-10 e IFN- γ , assim como pela apoptose de células T mediada pela caspase 8.

Nosso grupo trabalhou com células de linhagem murina e mostrou que o polissacarídeo também induzia a apoptose através da ligação Fas/FasL, inclusive de um modo mais efetivo que o GXM. A morte celular mediada pela GalXM poderia reforçar o efeito supressor exercido pela GXM e contribuir para a supressão da resposta imune durante a criptococose. No entanto, apesar dos dados observados, houve a produção de TNF- α e óxido nítrico pelos macrófagos murinos da linhagem RAW, conferindo um perfil protetor induzido pela GalXM (Villena *et al.*, 2008).

De Jesus e colaboradores (2009) observaram, em modelo murino, que após a imunização com GalXM ocorre o desaparecimento de célula B no baço. Esse fenômeno foi

caracterizado como apoptose, podendo ser revertida utilizando inibidores de caspases ou camundongos deficientes de Fas.

As informações apresentadas sobre a GalXM são ao mesmo tempo contraditórias e corroborativas ao perfil supressor da cápsula do *C. neoformans*. Esses resultados sugerem que apesar desses constituintes polissacarídeos apresentarem diferentes perfis, eles agem em conjunto para suprimir a resposta imune do hospedeiro durante a infecção.

1.3.3 Papel dos macrófagos na criptococose

Macrófagos são considerados células-chave na criptococose (Kozel & Mastroianni, 1976). Embora os macrófagos possam matar o *Cryptococcus* (Bolaños & Mitchell, 1989), vários relatos demonstram que a replicação intracelular pode ocorrer resultando na saída da levedura seguida ou não por lise da célula hospedeira (Alvarez & Casadevall, 2007). O mecanismo pelo qual *Cryptococcus* sobrevive e replica no interior dos macrófagos ainda não foi bem elucidado, mas inclui secreção de fosfolipase B, que é considerado também um fator de virulência do fungo, e grandes quantidades de GXM (Turker & Casadevall, 2002; Voelz & May, 2010). A GXM secretada também é internalizada por macrófagos (Chanq *et al.*, 2006), e o polissacarídeo modula a resposta proliferativa da célula hospedeira (Villena *et al.*, 2008).

A replicação do *C. neoformans* dentro dos macrófagos é um mecanismo a ser aprofundado, pois diferentemente de outros patógenos intracelulares, o *C. neoformans* não modula ou interfere nos mecanismos pós-fagocíticos para que sua replicação celular ocorra. O fungo não impede a fusão do fagossomo com o lisossomo; permanece dentro do fagolisossomo, não evadindo para o citoplasma e não interfere na regulação do pH do fagolisossomo (Voelz & May, 2010). Por permanecer viável dentro do macrófago, o *C. neoformans* pode alcançar outros sítios dentro do hospedeiro.

Ao ser liberado através da lise celular, um microambiente inflamatório é formado, não sendo favorável ao fungo. Portanto, o mecanismo de extrusão é adotado pelo *C. neoformans* para escapar do macrófago (Voelz & May, 2010). Esse processo ocorre independentemente de como a célula fúngica tenha sido fagocitada, no entanto, as leveduras fagocitadas que foram opsonizadas com anticorpos são liberadas em aglomerados, formando um biofilme, e aquelas que foram opsonizadas por fatores do sistema complemento saem individualmente (Alvarez *et al.*, 2009).

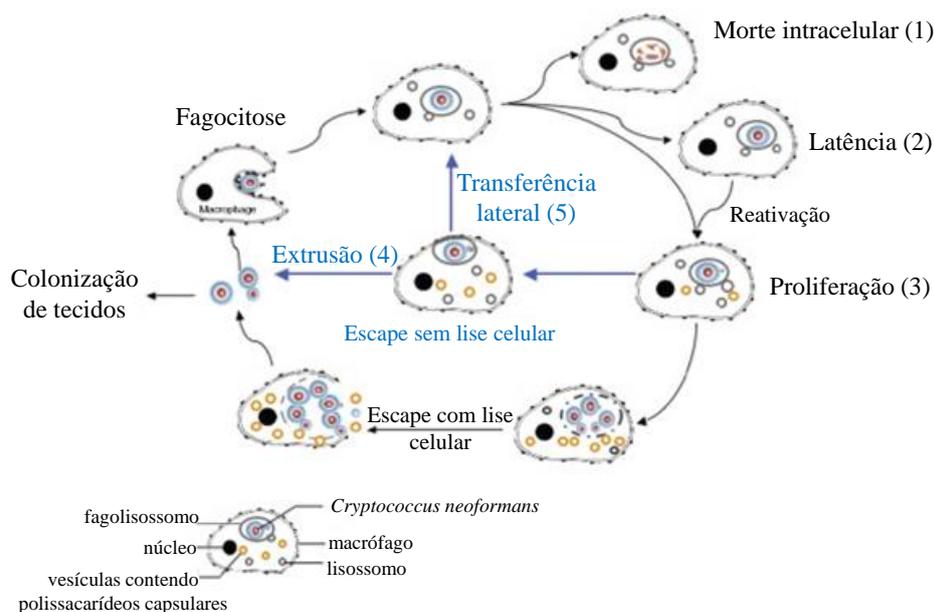


Figura 8: Macrófagos e *C. neoformans*. Após a fagocitose, o *C. neoformans* internalizado pode ser eliminado pelo fagócito (1) ou permanecer latente (2). Quando o hospedeiro apresenta algum tipo de imunocomprometimento, a levedura ou a população fúngica latente começa a proliferar dentro do macrófago (3). O aumento do número de células fúngicas é seguido pela lise do fagócito e liberação do *C. neoformans* no ambiente extracelular, ou pela evasão do fungo de dentro do macrófago sem sua ruptura. Na extrusão do fagócito (4), o *C. neoformans* não causa a ativação de mediadores inflamatórios assim como na transferência lateral (5), e em ambos os mecanismos (4) e (5) o *C. neoformans* alcança outros sítios para infecção (adaptado de Ma & May, 2009).

Como dito anteriormente, o *C. neoformans* é um fungo neurotrópico quando existe a disseminação sistêmica da levedura e há estudos demonstrando que os macrófagos auxiliam na dispersão. O macrófago ficou conhecido como o “cavalo de Tróia” da criptococose (Casadevall, 2010) por ser uma célula capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Trabalhos demonstraram que a ausência dessas células fagocíticas durante a infecção pelo *C. neoformans* proporcionaram sobrevida de camundongos (Charlier *et al.*, 2009) e que a depleção de macrófagos alveolares dificultou a disseminação do fungo para o sistema nervoso central (Kechichian *et al.*, 2007). Porém, o fungo também pode alcançar o sistema nervoso central como leveduras circulantes, sem a ajuda do fagócito (Shi *et al.*, 2010).

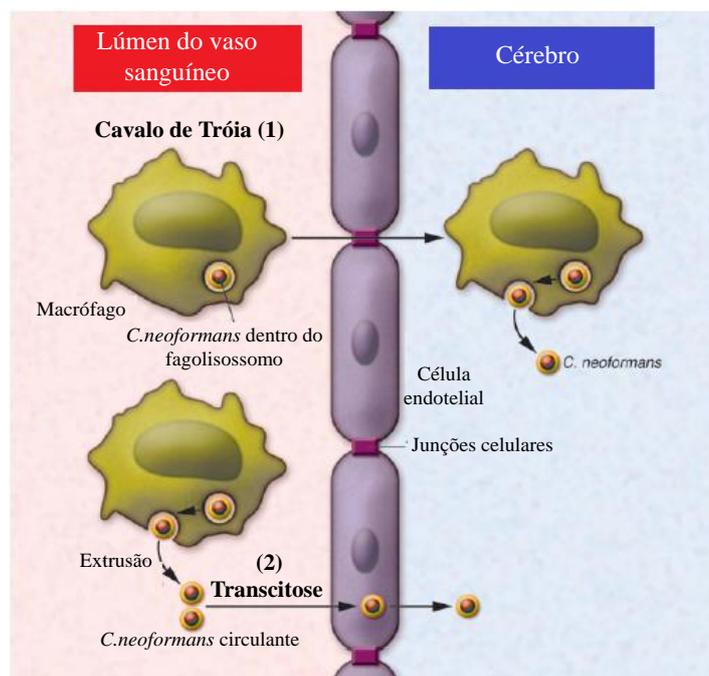


Figura 9: Mecanismos pelos quais o *C. neoformans* atravessa a barreira hematoencefálica e chega ao sistema nervoso central. O fungo pode circular pela corrente sanguínea livremente ou associado ao macrófago. (1) No mecanismo chamado Cavalo de Tróia, o *C. neoformans* atinge o cérebro dentro uma célula fagocítica infectada que o transporta através do lúmen de um capilar cerebral para o sistema nervoso central. (2) Na transcitose, o *C. neoformans* atinge o cérebro pela transmigração direta da célula endotelial. (Casadevall, 2010).

Além dos mecanismos descritos até aqui na interação *C. neoformans*/macrófago, outro importante fato observado e descrito na literatura é a transferência lateral de células fúngicas de um fagócito para outro (Alvarez *et al.*, 2007). Esse fenômeno é dependente da actina presente no citoesqueleto do macrófago (Ma *et al.*, 2007) e, juntamente com a capacidade do fungo de replicar dentro do macrófago e a extrusão das leveduras, corrobora com a teoria que o macrófago funciona como um carreador do *C. neoformans* dentro do organismo (Voelz & May, 2010).

A importância do macrófago e as escassas informações sobre o papel deste tipo celular na infecção pelo *C. neoformans* em cães, nos impulsionaram a estudar o efeito modulador exercido pelos polissacarídeos capsulares nessas células. Dentro dessa abordagem, nos pareceu extremamente interessante estudar a infecção canina, onde se observa a síndrome neurológica, que representa o sucesso do fungo em alcançar o sistema nervoso central. Escolhemos trabalhar com a linhagem DH82 na tentativa de produzir mais informações sobre esta linhagem de macrófagos caninos, contribuindo com a consolidação do modelo *in vitro*, para que estudos iniciais com diferentes abordagens possam ser realizados antes da utilização do modelo *in vivo*.

2 JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma infecção fúngica globalizada causada pelo *C. neoformans* que afeta diferentes espécies de animais e inclusive o homem. Dentre os animais de companhia, acomete principalmente o gato e o cão (Castellà *et al.*, 2008; Robson & Smith, 2011). A infecção ocorre pela inalação dos esporos ou células fúngicas desidratadas (Lester *et al.*, 2011) sendo, portanto, o sistema respiratório o primeiro sítio de colonização pelo *C. neoformans*. O estabelecimento do quadro clínico e disseminação da infecção parecem estar intimamente relacionados ao não funcionamento do sistema imunológico do hospedeiro (Marcasso *et al.*, 2005).

A cápsula do *Cryptococcus* é considerada um dos principais fatores de virulência e o mais estudado (McClelland *et al.*, 2006). Estudos bioquímicos evidenciaram que a cápsula do *C. neoformans* é composta majoritariamente pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), além de manoproteínas em menores quantidades. Trabalhos mostraram que a cápsula total exerce influências no sistema imunológico do hospedeiro, modulando o mesmo para um perfil de favorecimento da levedura (Zaragoza *et al.*, 2009; Villena *et al.*, 2008; Rocha 2013).

A imunomodulação exercida pela cápsula é sofrida principalmente pelos macrófagos, que fazem parte da primeira linha de defesa de um organismo. O *C. neoformans* pode ser morto pelos mecanismos antimicrobianos dessas células, entretanto, que é capaz de induzir morte criando um ambiente anti-inflamatório (Villena *et al.*, 2008), além de conseguir sobreviver em seu interior onde se replica (Coelho *et al.*, 2013).

Os dados apresentados até o momento na literatura e a importância do macrófago na infecção pelo *C. neoformans*, atuando como um possível carreador do fungo e auxiliando a disseminação do mesmo, direcionaram nosso estudo a fim de avaliar o efeito modulador dos polissacarídeos capsulares e da cápsula bruta na linhagem de macrófagos caninos DH82; visto a importância do cão como animal de companhia e pelas manifestações clínicas semelhantes à criptococose humana, com disseminação pelo sistema nervoso central.

3 OBJETIVO GERAL

Estudar a capacidade dos polissacarídeos capsulares, GalXM e GXM, e da cápsula bruta do fungo *C. neoformans* em induzir e/ou modular uma resposta imunológica a partir dos macrófagos, observando mecanismos iniciais e tardios da ativação deste tipo de célula, utilizando para tal estudo a linhagem de macrófagos caninos DH82, a fim de contribuir com o estabelecimento de um modelo *in vitro*, que venha contribuir com o entendimento de como a levedura se dissemina pelo cão, atingindo principalmente o SNC.

3.1 Objetivos específicos

- 1- Avaliar o efeito da GXM, GalXM e da cápsula bruta na viabilidade da linhagem de macrófagos caninos DH82.
- 2- Avaliar o efeito da GXM, GalXM e da cápsula bruta na atividade fagocítica e expressão de moléculas co-estimulatórias em células DH82.
- 3- Caracterizar a modulação na produção de citocinas de células DH82 na presença de GXM, GalXM e cápsula bruta.
- 4- Investigar a modulação de moléculas envolvidas na sinalização intracelular de macrófagos ativados pelo tratamento com GXM, GalXM ou cápsula bruta.

4 METODOLOGIA

4.1 Micorganismos

Cepas de *Cryptococcus neoformans var neoformans* sorotipo D foram utilizadas, sendo B3501 a cepa selvagem, e CAP67 a cepa mutante acapsulada. Os microrganismos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Leonardo Nimrichter do IMPPG/UFRJ. Ambas as cepas foram mantidas em meio definido (10mM de D-Glicose, 29,4mM de KH_2PO_4 , 13 mM de Glicina, 10mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 3 μM de Tiamina; pH 5.5 – Merck, DEU) sob agitação (100 rpm) a 30°C. As cepas foram estocadas a 4°C após 72h de crescimento em placas de petri contendo meio YPD sólido, contendo 0,2 g/L de D-glucose; 0,1 g/L de extrato de levedura; 0,2 g/L de peptona; 0,2 g/L de ágar, a 37°C.

4.2 Obtenção dos polissacarídeos capsulares

Os polissacarídeos capsulares do *C. neoformans* foram extraídos do sobrenadante de cultura das cepas B3501 (para extração da GXM) e CAP67 (para extração da GalXM) crescidas em meio CDCB2550 (22 mM de D-Glicose, 21 mM de Uréia, 6 mM de glutamato de sódio, 8,8 mM de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,2 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 μM de Tiamina HCl e 3 μM de biotina- Sigma-Aldrich,USA) por 5 dias a 37°C sob agitação (100rpm). Após esse período, as células foram centrifugadas (12000 x g, por 15 minutos a 4°C) e o sobrenadante foi coletado. Esse sobrenadante foi concentrado em rotavapor e precipitado em 3 volumes de etanol 95% gelado. Esse precipitado foi solubilizado em água destilada e o processo foi repetido por mais duas vezes, seguido de liofilização e obtenção do material capsular bruto.

A fim de separar os polissacarídeos presentes na cápsula das manoproteínas, o material capsular bruto (400 mg em 50 mL) foi ressuscitado em tampão ConA (5mM de Acetato de Sódio, 100 mM de NaCl, 1 mM de MnCl_2 , e 1 mM de CaCl_2 ; pH5.2) e solubilizado por irradiação ultra-sônica. O material insolúvel foi centrifugado e a solução restante foi filtrada em um filtro 0,45 μm (EMD Millipore,USA). As manoproteínas possuem afinidade de ligação com a concanavalina A, assim, essa solução foi fracionada por cromatografia de afinidade em uma coluna carregada com 70 mL de ConA-Sepharose 4B (GE Healthcare, USA) a 4 °C. Frações de 10 mL foram coletadas e lavadas em tampão ConA. Para avaliar a ausência de manoproteínas foi realizado um SDS-PAGE e uma coloração com Azul de Comassie (Sigma-Aldrich,USA) e a coloração fenol-sulfúrico para confirmação da presença de carboidratos (Dubois *et al.*, 1951). Após confirmação da ausência de proteínas e da presença de carboidratos, o material obtido foi dialisado em água destilada e liofilizado.

Para a obtenção da GalXM esse material livre de manoproteínas proveniente do sobrenadante da cepa mutante CAP67 foi solubilizado em tampão Tris HCL pH 7,6 e fracionado em coluna Mono-Q HR16/10. O material (200 mg em 25 mL de Tris HCL pH 7,6) foi submetido a um gradiente linear de cloreto de sódio (0 a 1000 mM). As frações coletadas (12mL por tubo) foram monitoradas para presença de carboidratos neutros (Dubois *et al.*, 1951), dialisadas separadamente em água corrente por 24 horas e liofilizadas. O isolamento da GalXM foi realizado de acordo Vaishnav e colaboradores (Vaishnav *et al.*, 1998). A presença única de GalXM nessas frações foi avaliada de acordo com a descrição publicada pelo nosso grupo (Villena *et al.*, 2008).

Para a obtenção da GXM, foi utilizada uma técnica descrita por Cherniak e colaboradores (Cherniak *et al.*, 1991) chamada de precipitação diferencial por CTAB. Nela o material capsular livre de manoproteínas, proveniente do sobrenadante da cultura do fungo selvagem (B3501), foi solubilizado vagarosamente em 0,2M de cloreto de sódio associado a brometo de cetiltrimetilamonio-CTAB (3 mg de CTAB para cada 1 mg de polissacarídeo livre

de manoproteína adicionado). Após isso, uma solução 0,05% de CTAB foi adicionada e fez com que a GXM fosse precipitada de maneira seletiva. O precipitado foi recolhido por centrifugação e lavado com uma solução de 2% de ácido acético e 90% de etanol gelado. Após isso, foi adicionado ao precipitado uma solução de 1M de NaCl e 3 volumes de etanol. E, finalmente, foi adicionada uma solução 95% de etanol. A GXM precipitada foi diluída em água destilada, seguida de diálise por 72h e liofilização. A qualidade da purificação foi avaliada de acordo com a descrição publicada pelo nosso grupo (Villena *et al.*, 2008).

Ambas as moléculas foram diluídas em água apirogênica e para garantir a ausência de LPS nas preparações uma solução de 10 mg de cada molécula foi passada em coluna de polimixina B/Agarose. As soluções foram incubadas por 30 minutos na coluna e eluídas com água apirogênica. Após isso, as amostras foram liofilizadas e ressuspensas em PBS pH 7,2 livre de LPS (Gibco, USA) em uma concentração estoque de 1 mg/mL.

4.3 Cultivo da linhagem DH82

A linhagem de macrófagos caninos DH82 (gentilmente cedida pelo Professor Marcelo Bahia Labruna-USP) foi mantida em garrafas de 25 cm² em meio DMEM (3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 1 mL/L de gentamicina, 2,383 g/L de HEPES, pH 7.0 - Gibco) suplementado com aminoácidos não-essenciais, L-glutamina, β-mercaptoetanol, piruvato de sódio (concentração de 10 mL/L) e adicionado de soro fetal bovino 5% (Gibco) a 37°C e 5% CO₂.

As situações experimentais foram feitas com DMEM suplementado, como descrito acima, e 10% de soro fetal bovino. Os estímulos só eram adicionados à cultura após o tempo de aderência celular (2h a 4h).

4.4 Cultivo da linhagem RAW

A linhagem de macrófagos murinos Raw (ATCC) foi utilizada como controle positivo para algumas técnicas usadas durante o trabalho. A linhagem foi mantida nas mesmas condições, tanto de cultura quanto experimentais que as células DH82.

4.5 Ensaio de citotoxicidade

A verificação se as moléculas capsulares e a cápsula bruta apresentavam toxicidade aos macrófagos foi feita através do ensaio colorimétrico de XTT (Sigma), que quantifica o metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória na presença do acceptor de elétrons, PMS.

Os macrófagos caninos foram cultivados em placas de 96 poços e incubados com diferentes concentrações (10, 50 e 100 µg/mL) de GXM, GalXM e cápsula bruta nos tempos de 24h (10⁵ células/poço) e 48h (10⁴ células/poço). Após os períodos de incubação, uma solução de XTT (1,8 mg de XTT, 75 µL de PMS e 1425 µL de PBS 1x) foi preparada e 50 µL/poço foram adicionados. A placa foi incubada na estufa pelo período de 3h e a leitura foi feita utilizando um filtro de 490 nm em um leitor de microplacas (Spectramax M3).

4.6 Ensaio de proliferação

Os macrófagos caninos foram incubados em placa de 24 poços (10⁵ células/poço) com GalXM, GXM e cápsula bruta (100 µg/mL), na presença ou ausência de LPS (400 ng/mL) e IFN-γ (1,5 ng/mL). Após os períodos de incubação de 24h e 48h, as células foram lavadas

uma vez com PBS 1x, soltas da placa com tripsina e contadas (1:10 com Azul de Trypan - Sigma) utilizando uma Câmara de Neubauer.

4.7 Preparo das leveduras usadas para o ensaio de aderência e fagocitose

A quantidade de 2 mg da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico seco instantâneo – Saf-instant) foram homogeneizadas dentro de tubo falcon utilizando 50 mL do próprio meio para o experimento, como descrito acima. Após completa solubilização das leveduras, elas foram contadas em câmara de Neubauer e usadas nos ensaios descritos a seguir.

4.8 Ensaio de aderência e fagocitose

As células DH82 foram plaqueadas em lamínulas de vidro (10^4 células/poço) e incubadas da noite para o dia com diferentes concentrações (10, 50 e 100 µg/mL) de GXM, GalXM e cápsula bruta. No dia seguinte, foi adicionada às células a levedura *S. cerevisiae* na proporção 20:1 por 40 minutos (ensaio de aderência) ou 4h (ensaio de fagocitose) e incubadas a 37 °C e 5% CO₂. Após os determinados períodos de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x para retirada das leveduras não aderidas e não fagocitadas. As lamínulas foram, então, coradas pelo método Panótico (Laborclin). Após a coloração e montagem em lâminas, as leveduras foram contadas em microscópio óptico com objetiva em aumento de 100X.

4.9 Avaliação da viabilidade de leveduras após a fagocitose por macrófagos caninos da linhagem de DH82

Os macrófagos caninos foram cultivados em placas de cultura de 24 poços (10^4 células/poço) e incubados com os polissacarídeos capsulares e a cápsula bruta da noite para o dia nas concentrações descritas anteriormente. Após esse período, a levedura *S.cerevisiae* foi incubada junto aos macrófagos por 4h. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e lisadas com água gelada (500 µL). O lisado foi diluído na proporção 1:10 em PBS 1x. O volume de 30 µL do lisado diluído foi semeado em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud. As placas foram incubadas a 37 °C por 48h e após esse período as unidades formadoras de colônias foram contadas (Oliveira *et al.*, 2010).

4.10 Dosagem de óxido nítrico

A verificação se as células DH82 eram capazes de produzir óxido nítrico foi avaliada indiretamente pela presença de nitrito no sobrenadante da cultura. A possível presença de nitrito foi avaliada pelo método de Griess. As células foram cultivados em placas de cultura de 24 poços (2×10^5 células/poço) e incubados por 24h ou 48h na presença de LPS (Gibco) em diferentes concentrações de (100, 200 e 400 ng/mL) e IFN- γ canino (1,5 ; 2,25 ; 3 e 10 ng/mL - R&D Systems). Após os períodos de incubação, 50 µL do sobrenadante foi recolhido para uma placa de cultura de 96 poços. Uma curva de diluição seriada de nitrito de sódio (100 µM) foi realizada. O volume de 50 µL das soluções de Griess (solução A: sulfanilamida 1% e ácido ortofosfórico 5%; solução B: N-(1-naphthyl)-ethylendiamin 0,1% - Sigma) na proporção 1:1 foi adicionado ao sobrenadante previamente recolhido e à curva de nitrito de sódio. A leitura da placa foi feita utilizando um filtro de 540 nm em um leitor de microplacas (Spectramax M3).

4.11 Dosagem de espécies reativas de oxigênio

As células foram cultivadas em uma placa de 96 poços de fundo claro e laterais escuras (Costar 3603 - Corning) na concentração de 5×10^4 células/poço e incubadas na estufa 37°C e 5% CO_2 por 2h para aderência. Logo após, elas foram lavadas uma vez com Hanks sem soro e sem corante (HBSS - Gibco) e incubadas com a sonda H2DCFDA (Invitrogen) ($10\mu\text{M}$ /poço, volume do poço de $100\mu\text{L}$) na estufa durante 20 minutos. As células foram lavadas duas vezes com Hanks e os estímulos adicionados (polissacarídeos capsulares e cápsula bruta 50 e $100\mu\text{g/mL}$; LPS 400 ng/mL ; $\text{IFN-}\gamma$ $1,5\text{ ng/mL}$). A placa foi analisada na emissão de 530 nm e excitação de 485 nm utilizando um fluorímetro (Spectramax M3) nos tempos 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1h, 2h e 3h após incubação com os estímulos. Durante a incubação com os estímulos, a placa permaneceu na estufa.

4.12 Citometria de fluxo

Foi visto o padrão da expressão de moléculas de superfície das células DH82 mediante estímulo com a GalXM, GXM e a cápsula bruta, na presença ou ausência de LPS e $\text{INF-}\gamma$. As células foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços (10^6 células/poço) e incubadas pelo período de 24h junto com os polissacarídeos capsulares ($100\mu\text{g/mL}$), LPS (400 ng/mL) e $\text{INF-}\gamma$ ($1,5\text{ ng/mL}$). Após o período de incubação, as células foram lavadas uma vez com tampão FACS (PBS 1x, azida 0,02% e soro fetal bovino 3%), soltas com rodinho e centrifugadas (1600 RPM por 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em $500\mu\text{L}$ de solução bloqueadora (PBS 1x, soro fetal bovino 2%, soro de camundongo 1%) e incubadas no gelo por 15 minutos. Após uma nova centrifugação, as células foram incubadas no gelo durante 30 minutos com o anticorpo anti-MHC CLASS II canino (MCA1044F – AbDSerotec), gentilmente cedido pela profa. Lúcia Helena Pinto da Silva/UFRRJ. O volume de 1 mL de tampão FACS foi adicionado às células e, posteriormente, elas foram centrifugadas. O sobrenadante foi descartado, as células foram fixadas ($500\mu\text{L}$ de paraformoldeído 1%) e analisadas em citômetro de fluxo (FACSCALIBUR Becton & Dicknson).

4.13 ELISA

As citocinas IL-12 (R&D), IL-10 (R&D), $\text{TNF-}\alpha$ (eBioscience) e $\text{TGF-}\beta$ (R&D) foram dosadas no sobrenadante da cultura celular pelo ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Todo o ensaio foi realizado de acordo com o fabricante do kit de cada citocina e o kit utilizado é murino.

As células foram plaqueadas em DMEM suplementado, como descrito acima, adicionado de nutridoma 1% (ROCHE) na concentração de 3×10^5 células/poço em placas de cultura de 48 poços. Os estímulos foram adicionados (GalXM, GXM e cápsula bruta $100\mu\text{g/mL}$; LPS $400\mu\text{g/mL}$; $\text{IFN-}\gamma$ canino $1,5\mu\text{g/mL}$) e a placa incubada na estufa por 24h. Após o período, o sobrenadante foi recolhido e mantido a -80°C . Para a dosagem do $\text{TGF-}\beta$, as amostras foram acidificadas com HCl 1N ($10\mu\text{L}$ para $50\mu\text{L}$ de sobrenadante) por 10 minutos e neutralizadas com NaOH 1,2N HEPES 0,5M ($6,5\mu\text{L}$ para $50\mu\text{L}$ de sobrenadante) no momento da utilização.

Foram utilizadas placas próprias para ELISA (Costar 3590 - Corning) para dosagem de cada citocina. As placas foram sensibilizadas pelo anticorpo de captura, diluído em PBS, e incubadas a 4°C de um dia para o outro. As placas foram lavadas três vezes com PBS - Tween 0,05% (Tween 20 - Sigma) e deixadas 2h em temperatura ambiente com $200\mu\text{L}$ /poço de PBS-SFB 10%. Após três lavagens, as amostras foram adicionadas às placas, assim como o anticorpo recombinante (formação da curva padrão), diluído em PBS-SFB 10%. As placas

foram então incubadas a 4 °C de um dia para o outro. Após três lavagens, as placas foram deixadas em temperatura ambiente durante 2h30 com o anticorpo de detecção. Após três novas lavagens, as placas foram incubadas na estufa (37 °C e 5% CO₂) por 1h junto com fosfatase alcalina conjugada a estreptoavidina (Invitrogen) diluída em PBS-SFB 10% na proporção 1:2000. O volume de 50 µL/poço do substrato, PNPP (SouthernBiotech), diluído em TrisMgCl₂, foi adicionado após três lavagens. As placas foram deixadas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, até o momento da leitura, que foi feita em um leitor de ELISA utilizando um filtro de 405 nm (Spectramax M3).

4.14 Western Blot

As células foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços (10⁶ células/poço) e mantidas na estufa durante 24h junto com os estímulos (GalXM, GXM e cápsula bruta 100 µg/mL; IFN-γ canino 1,5 e 10 ng/mL; LPS 200 e 400 ng/mL). O sobrenadante foi descartado e as células lavadas duas vezes com PBS gelado. Foi adicionado às células tampão de lise (Sigma) e inibidores de protease (Sigma) (10 µL de inibidores em 1mL de tampão de lise – 80 µL/poço). As células foram raspadas com rodinho e incubadas no gelo por 30 minutos. Posteriormente, elas foram centrifugadas (10000 RCF por 20 minutos a 4 °C) e o sobrenadante estocado a -80°C até o momento de uso.

Após a quantificação de proteínas de cada situação pelo método de Bradford, o tampão de amostra foi adicionado (1:1) e as amostras foram fervidas a 100 °C por 5 minutos. A separação das proteínas foi feita em eletroforese SDS-PAGE 10% ou 12% (para expressão de iNOS) a 100 V. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em um sistema de blotting. A membrana foi então incubada com tampão TBS 5%BSA durante 1h em temperatura ambiente para o bloqueio de ligações inespecíficas. Após, a membrana foi incubada a 4 °C sob agitação com os anticorpos primários anti-iNOS (160862 – Cayman Chemical), anti-ERK (4696S – Cell Signaling), anti-pERK murina (4370S – Cell Signaling) e anti-PPAR-γ murino (2435 – Cell Signaling) de um dia para o outro. Então, a membrana foi lavada seis vezes com tampão de lavagem TBS 0,1% Tween 20 e incubada em temperatura ambiente, sob agitação, durante 1h, com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase. A revelação das reações foi feita utilizando um kit de quimioluminescência (ECL Western Blotting Substrate – Promega – w1015) de acordo com as instruções do fabricante.

Neste ensaio foi realizado um gel para cada proteína de interesse.

4.15 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) para amostras não-pareadas e pelo pós-teste de Dunnett para comparações individuais com o grupo controle, utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0. Análises mostrando p<0,05 foram consideradas significativas.

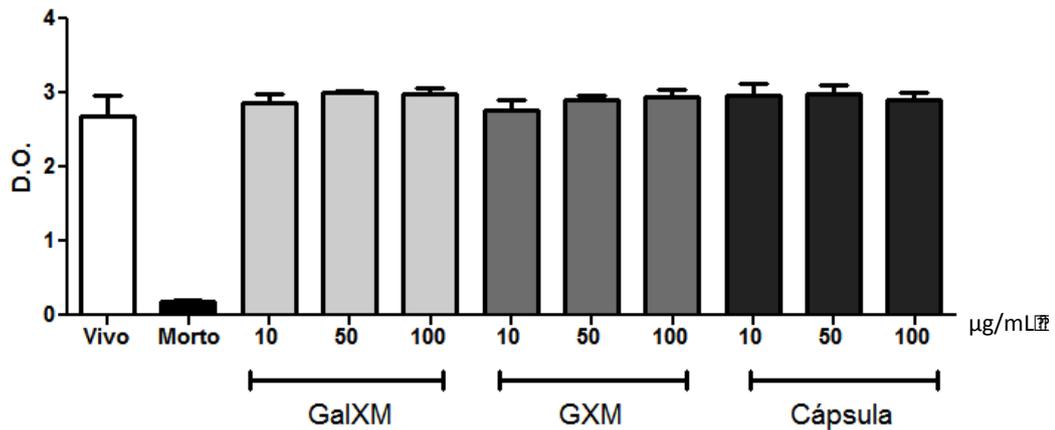
5 RESULTADOS

5.1 Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta não apresentaram efeito tóxico sobre as células da linhagem de macrófagos caninos DH82

Os polissacarídeos capsulares de *C. neoformans* foram descritos anteriormente como indutores de apoptose em macrófagos murinos (Villena *et al.*, 2008). Desse modo, inicialmente foi analisado se os polissacarídeos purificados, assim como a cápsula bruta, teriam algum efeito tóxico sobre os macrófagos caninos da linhagem DH82.

Para isso, culturas de células da linhagem DH82 foram cultivadas e tratadas com GalXM, GXM ou cápsula de *C. neoformans* em diferentes concentrações e incubadas por 24h e 48h. Após os tempos estabelecidos pelo ensaio, foram analisadas pelo teste de XTT que avalia a atividade mitocondrial das células. Observamos em nossos experimentos que, os polissacarídeos e a cápsula bruta não apresentaram nenhum comprometimento da viabilidade para a linhagem de células DH82 após 24 horas de incubação (Figura 10A) ou após 48 horas de incubação (Figura 10B).

A)



B)

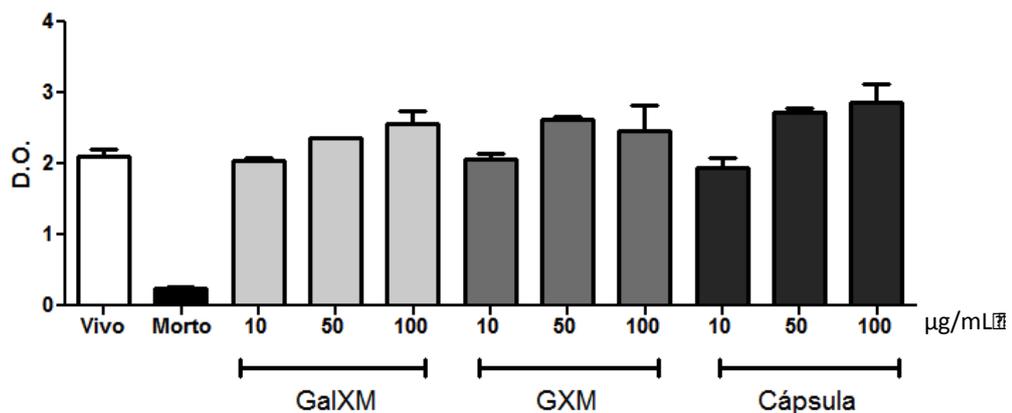


Figura 10: Efeito dos polissacarídeos purificados e a cápsula bruta na viabilidade de células DH82. Culturas de células DH82 foram cultivadas na concentração de 10^5 células/poço e 10^4 células/poço, para os respectivos tempos de 24h (A) e 48h (B) de incubação, em um volume de 150 µL/poço. As células foram tratadas com as concentrações de GalXM, GXM e cápsula indicadas (µg/mL). As amostras foram lidas após a incubação. O controle morto foi feito pela adição de 1 µL de Triton antes da adição do XTT. Foi adicionado 50

μ L de XTT em cada amostra antes da leitura. Resultado representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Os grupos foram comparados através do teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) para amostras não pareadas e não foi observada diferença estatística.

5.2 Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta do *C. neoformans* induzem a proliferação de macrófagos caninos DH82

O próximo passo do trabalho foi avaliar se o contato com os polissacarídeos purificados ou a cápsula poderiam induzir na linhagem DH82 uma resposta proliferativa. Para isso foi realizado um ensaio de proliferação da linhagem celular em contato com os polissacarídeos ou a cápsula.

A linhagem de macrófagos caninos DH82 foram postos em cultura juntamente com a GalXM, GXM ou a cápsula bruta durante um período de 24h. Os resultados mostraram que a GXM e a cápsula estimulam de forma significativa a proliferação da linhagem celular de macrófagos caninos.

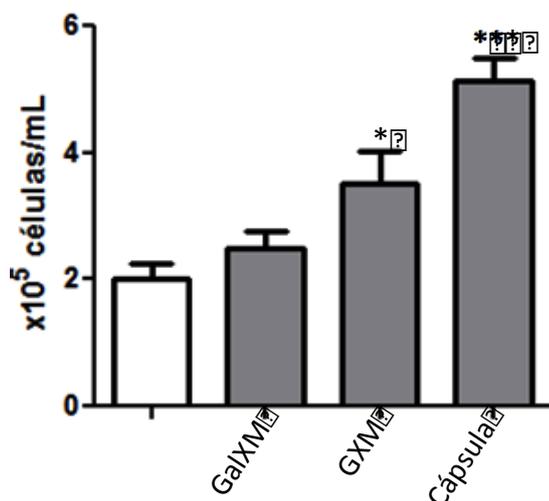


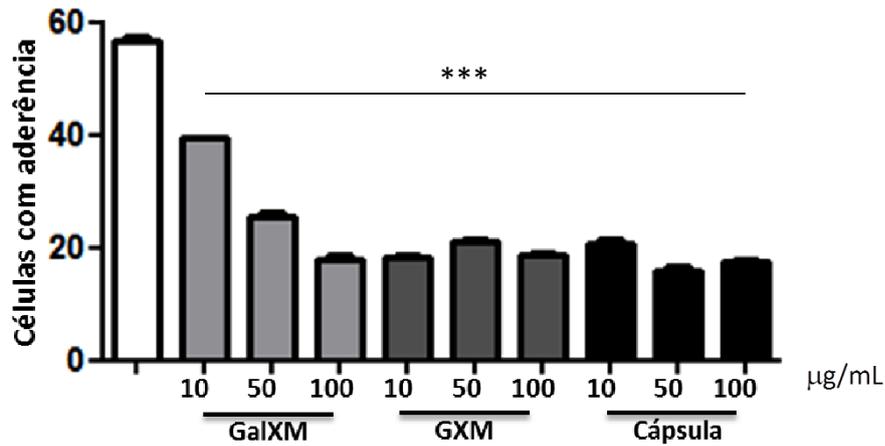
Figura 11: Efeito dos polissacarídeos purificados e da cápsula na proliferação celular da linhagem DH82. A cultura dos macrófagos DH82 foi estabelecida na concentração de 10^5 /poço e incubada juntamente com GalXM, GXM ou a cápsula ($100\mu\text{g/mL}$) durante 24h. Em seguida, as células foram soltas da placa, diluídas em azul de trypan e contadas na câmara de Neubauer. O resultado é representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Os grupos foram analisados pelo teste estatístico ANOVA e pelo pós - teste Dunnett. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

5.3 Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta de *C. neoformans* inibem a aderência e atividade fagocítica da linhagem de macrófagos caninos DH82

Em seguida iniciamos experimentos com o intuito de avaliar as atividades funcionais da linhagem de macrófagos caninos DH82. Como a capacidade de aderência e fagocitose é uma das principais atividades desse tipo celular, iniciamos a avaliação do efeito do contato das células DH82 com os polissacarídeos GalXM, GXM ou a cápsula bruta nos mecanismos de aderência e na habilidade dos macrófagos em fagocitar. Para isso, as células DH82 foram mantidas em cultura na presença dos polissacarídeos purificados ou da cápsula e, posteriormente, incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Após a devida incubação observamos que as células tratadas com os polissacarídeos ou a cápsula apresentaram uma redução na capacidade de aderência, demonstrado pelo menor número de leveduras aderidas a superfície de células DH82 (Figura 12A e 12B).

A)



B)

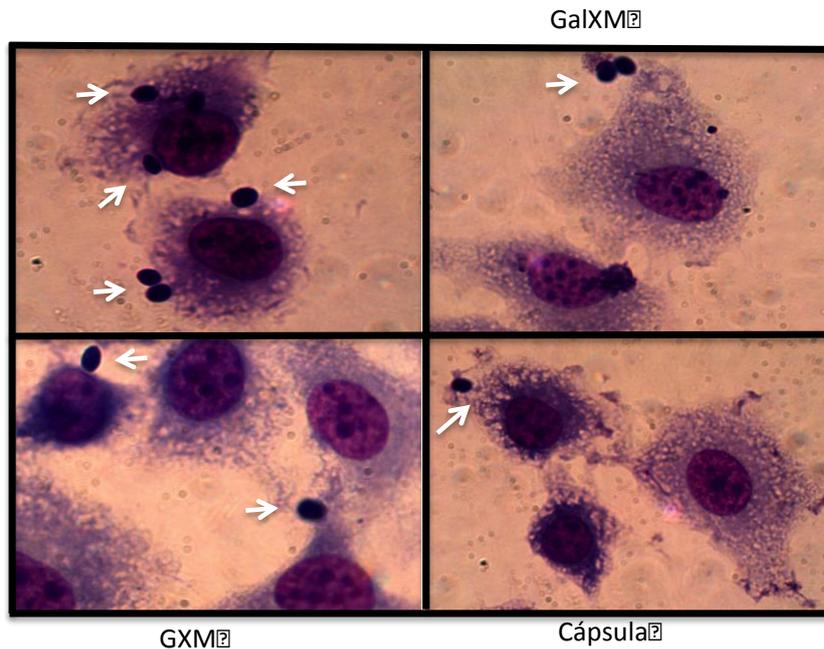
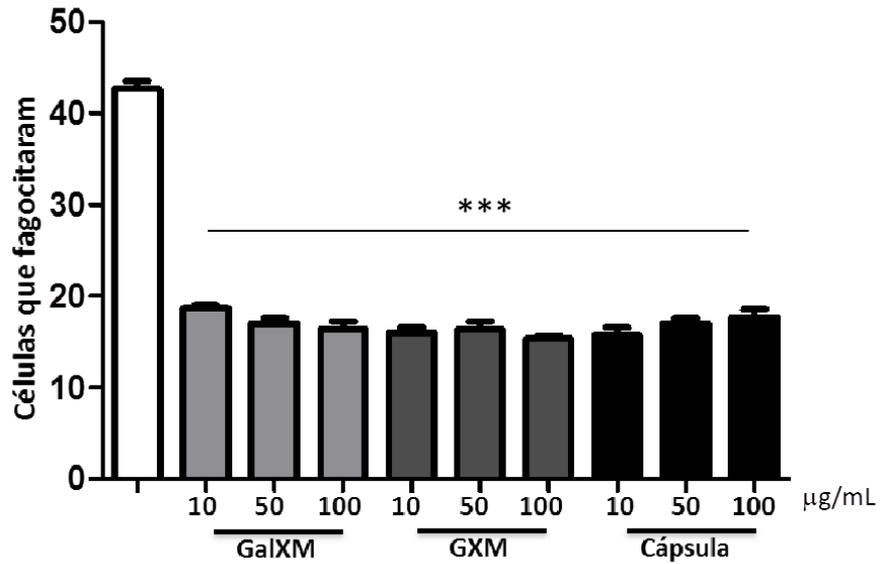


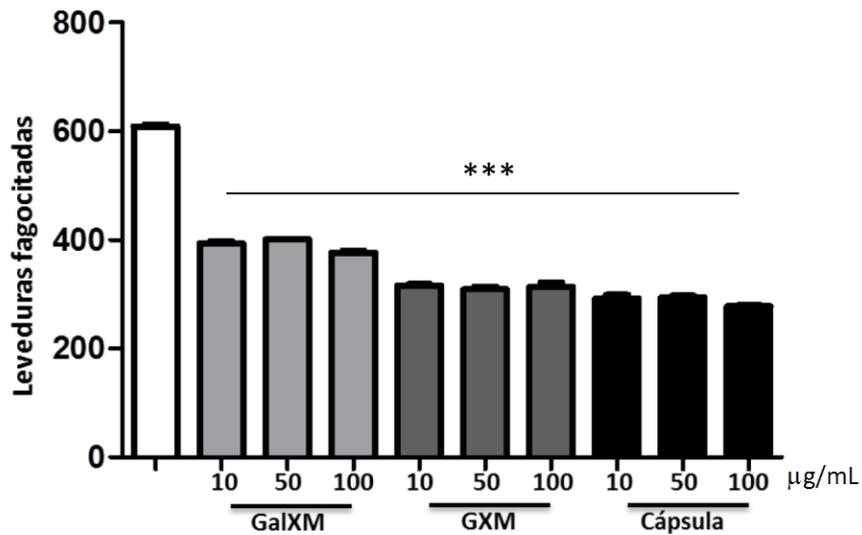
Figura 12: Leveduras aderidas às células DH82 na presença dos polissacarídeos ou cápsula. Células DH82 foram plaqueadas em lamínula de vidro (10^4 células/poço) e incubadas com GalXM, GXM e cápsula nas concentrações indicadas. Após 24h, *S. cerevisiae* (20×10^4 células/poço) foi adicionado à cultura. Após 40 minutos, as lamínulas foram lavadas, coradas e montadas. (A) A quantificação do número de leveduras aderidas à DH82 foi feita a partir da contagem de 100 células em microscópio óptico com objetiva de 100x. (B) Foto representativa de *S. cerevisiae* (indicadas por setas brancas) aderidas à DH82 pré-tratadas na presença de 100 µg/mL dos polissacarídeos capsulares ou cápsula. Resultado representativo de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Os grupos foram analisados pelo teste estatístico ANOVA e pelo pós - teste Dunnett. *** $p < 0,001$.

Fenômeno semelhante foi observado em relação à atividade fagocítica das células DH82 tratadas. Evidenciamos que as células na presença dos polissacarídeos ou da cápsula apresentaram uma significativa redução da fagocitose. Isso foi demonstrado pela redução no número de células que fagocitaram leveduras (Figura 13A) e no número de leveduras fagocitadas (Figura 13B e 13C). Nossos resultados indicam que o contato com os polissacarídeos purificados de *C. neoformans* ou a cápsula pode diminuir a capacidade de células DH82 aderirem à partículas e subsequente fagocitose.

A)



B)



C)

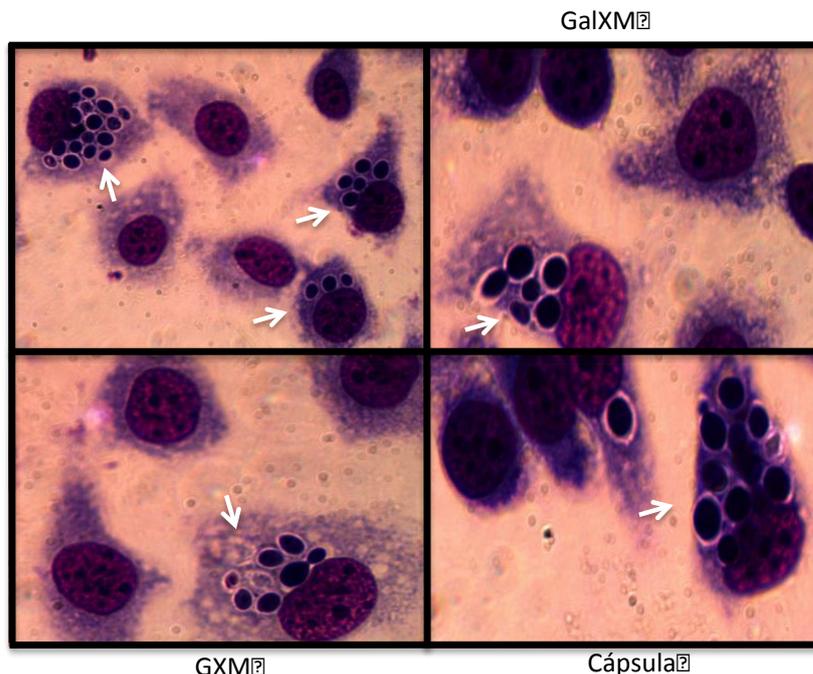


Figura 13: Leveduras fagocitadas pelas células DH82 na presença dos polissacarídeos ou cápsula. Células DH82 foram plaqueadas em lamínula de vidro (10^4 células/poço) e incubadas com GalXM, GXM e cápsula nas concentrações indicadas. Após 24h, *S. cerevisiae* (20×10^4 células/poço) foi adicionado à cultura. Após 4h de incubação, as lamínulas foram lavadas, coradas e montadas. A quantificação do número de macrófagos que possuíam leveduras internalizadas (A) e a quantificação do número de leveduras fagocitadas pelas células DH82 (B) foi feita a partir da contagem de 100 células em microscópio óptico com objetiva de 100x. (C) Foto representativa de *S. cerevisiae* aderidas à DH82 pré-tratadas na presença de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos polissacarídeos capsulares ou cápsula bruta. Resultado representativo de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Os grupos foram analisados pelo teste estatístico ANOVA e pelo pós - teste Dunnett. *** $p < 0,001$.

5.4 Os polissacarídeos e a cápsula bruta inibem a atividade microbicida/fungicida da linhagem de macrófagos caninos DH82

Como a presença da GalXM, GXM e cápsula alteraram mecanismos de aderência e fagocitose das células DH82, fomos analisar se a capacidade de eliminar o material fagocitado poderia ser afetada pelo contato com os polissacarídeos ou com a cápsula. O experimento em questão visou recuperar leveduras de *S. cerevisiae* e avaliar sua viabilidade após serem fagocitadas por células da linhagem de macrófagos caninos, tratados ou não com os polissacarídeos do *C. neoformans*.

As células DH82 foram plaqueadas e incubadas da noite para o dia com a GalXM, GXM ou a cápsula bruta. Em seguida, o *S. cerevisiae* foi adicionada à cultura e o sistema incubado por um período de 4h. As leveduras foram obtidas através da lise dos macrófagos e semeadas em ágar Sabouraud, utilizando protocolo descrito anteriormente por Oliveira e colaboradores (2010).

Foi observado um maior número de unidades formadoras de colônias a partir da semeadura de leveduras recuperadas de células DH82 que foram tratadas com os polissacarídeos ou a cápsula. As leveduras recuperadas de células tratadas com os polissacarídeos de *C. neoformans* na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram crescimento significativo quando comparadas com as leveduras recuperadas de células que não foram

submetidas ao tratamento com os polissacarídeos (Figura 14), indicando uma provável alteração nos mecanismos microbicidas do macrófago.

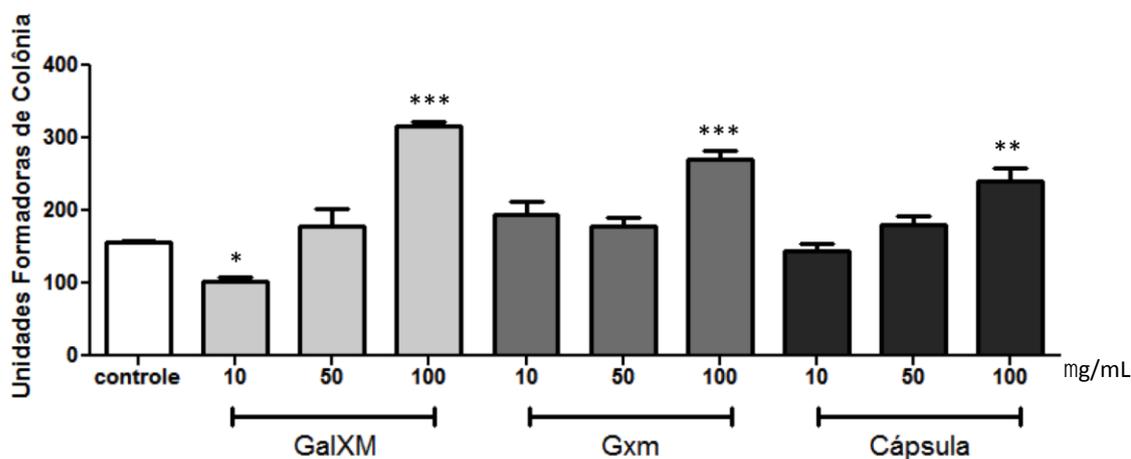


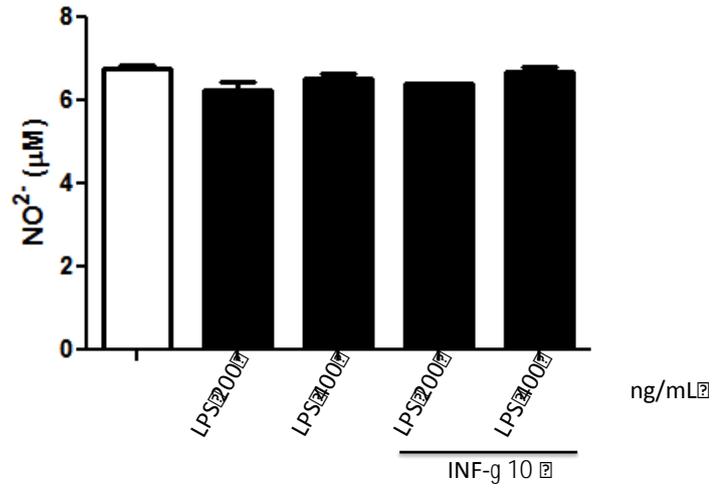
Figura 14: Atividade fungicida da linhagem de macrófagos caninos DH82 tratados com polissacarídeos purificados e cápsula bruta. Culturas de células DH82 foram estabelecidas (10^4 células/poço) e tratadas com GalXM, GXM ou cápsula bruta nas concentrações indicadas ($\mu\text{g/mL}$). *S. cerevisiae* (20×10^4 células/poço) foi adicionado à cultura para a determinação do número de unidades formadoras de colônias. As unidades foram contadas após 3 dias de incubação em placas de ágar Sabouraud semeadas com as leveduras recuperadas através do lisado dos macrófagos caninos. Resultado representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Os grupos foram comparados através do teste estatístico ANOVA e do pós - teste Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.5 A linhagem de macrófagos caninos DH82 não apresentou produção de óxido nítrico detectável

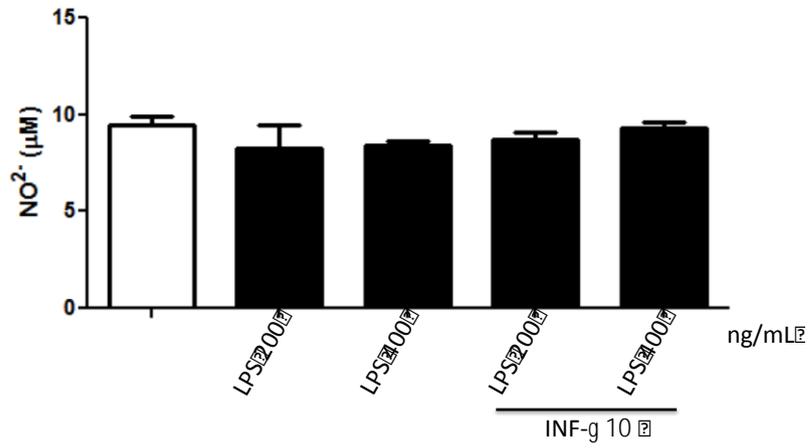
Com o objetivo de estudar os possíveis mecanismos microbicidas do macrófago que poderiam ser alvos da inibição causada pelos polissacarídeos do *C. neoformans*, já que as leveduras recuperadas do lisado das células DH82 se apresentavam viáveis, foi avaliada a produção indireta de NO através da dosagem de nitrito no sobrenadante das culturas de células DH82.

Os macrófagos caninos da linhagem DH82 foram tratados com diferentes concentrações de LPS na presença, ou não, de $\text{IFN-}\gamma$ e incubados durante um período de 24h (Figura 15A) ou 48h (Figura 15B). Nossos resultados mostraram que não houve uma produção significativa de NO pelas células DH82. Para excluir a possibilidade do NO estar sendo degradado antes de ser dosado, realizamos experimentos para avaliar a expressão de iNOS, enzima precursora da produção de óxido nítrico, pela técnica de *Western Blot* (Figura 15C). Nossos resultados revelaram que em nosso modelo as células DH82 não apresentaram a capacidade de produzir óxido nítrico, como já havia sido mostrado anteriormente (Wasserman *et al.*, 2012).

A)



B)



C)

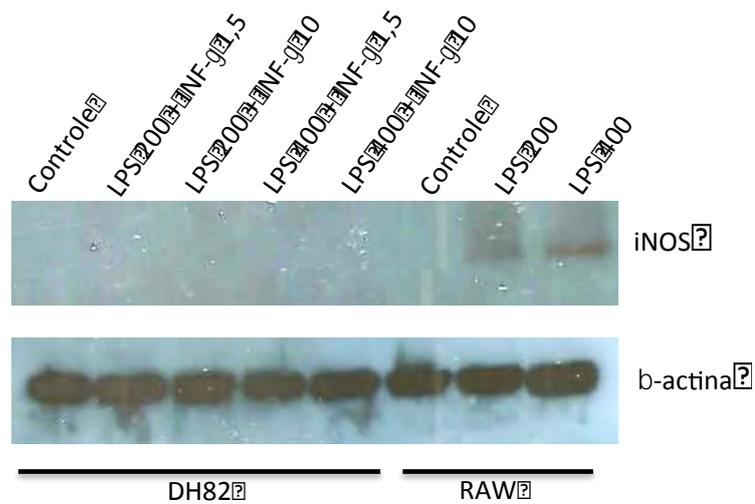


Figura 15: Avaliação da produção de NO e expressão de iNOS pelos macrófagos DH82. Culturas de DH82 foram estabelecidas (2×10^5 células/poço) e incubadas com LPS (ng/mL), na presença ou ausência de IFN- γ (ng/mL), durante o período de 24h (A) ou 48h (B). Para o Western Blot (C), as células foram plaqueadas

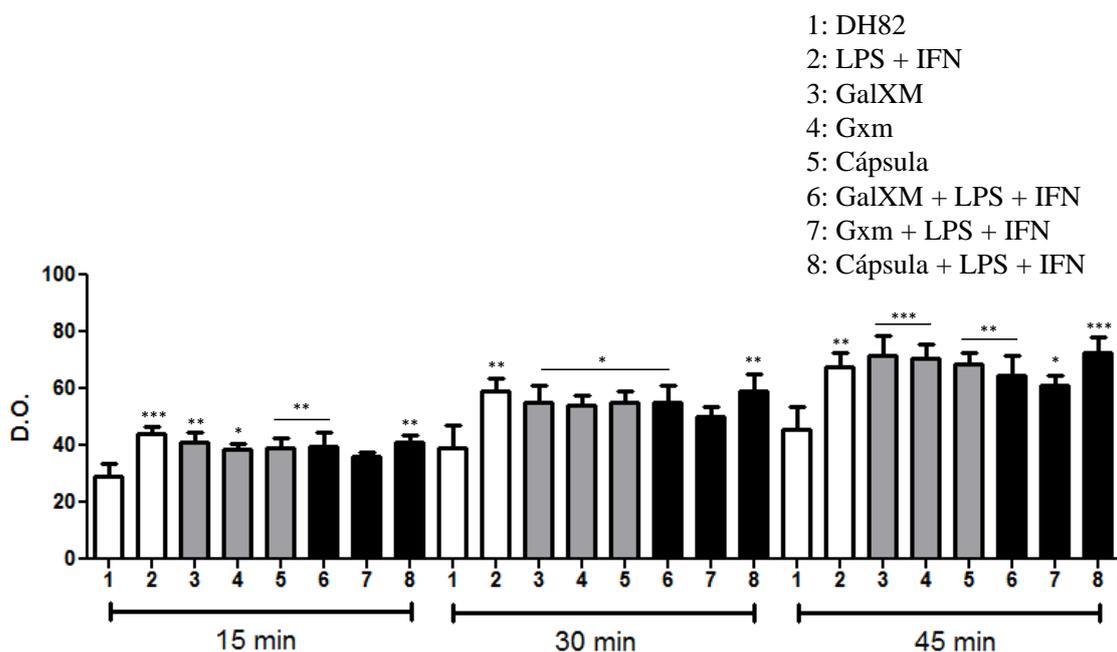
(10^6 células/poço) com LPS e IFN- γ (ng/mL) nas concentrações indicadas na figura durante o período de 24h. Os resultados A e B são representativos de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Os grupos foram analisados pelo teste ANOVA e não apresentou significância estatística. O resultado C é representativo de 2 experimentos independentes.

5.6 Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta induzem a produção de espécies reativas de oxigênio na linhagem de macrófagos caninos DH82

Outro mecanismo importante para a função microbicida do macrófago é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Por esse motivo, avaliamos o efeito do tratamento com os polissacarídeos e da cápsula bruta na produção de ROS em macrófagos DH82.

Para a obtenção de tal dado, as células DH82 foram plaqueadas na presença dos polissacarídeos purificados ou da cápsula de *C. neoformans* e incubadas com uma sonda fluorescente que mede a concentração intracelular de ROS. O resultado foi obtido através de uma cinética de minutos (Figura 16A) e horas (Figura 16B). Observamos que GalXM, GXM e a cápsula bruta, foram capazes de induzir um aumento significativo na produção de ROS de forma semelhante a observada em células previamente ativadas com LPS e INF- γ . Indicando que possivelmente essa via não foi modulada na presença dos polissacarídeos do fungo.

A)



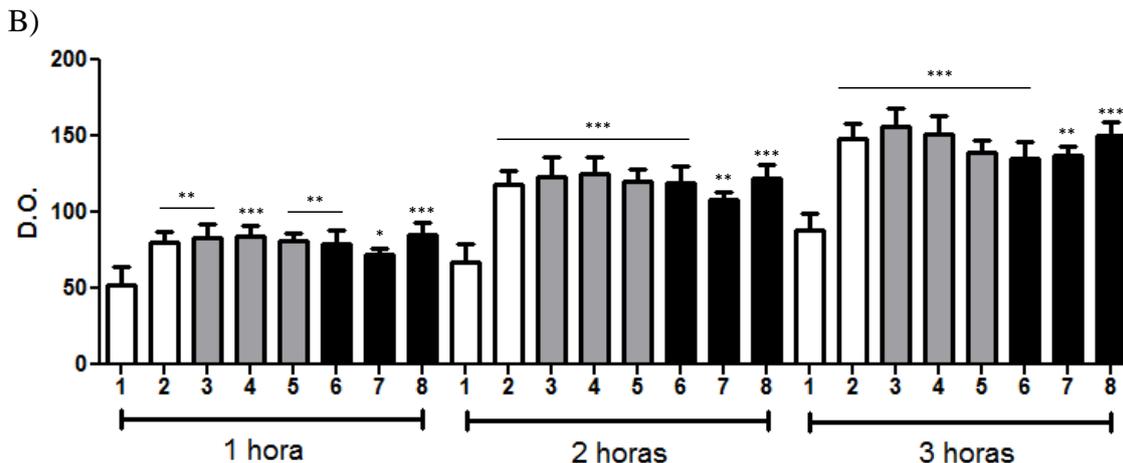


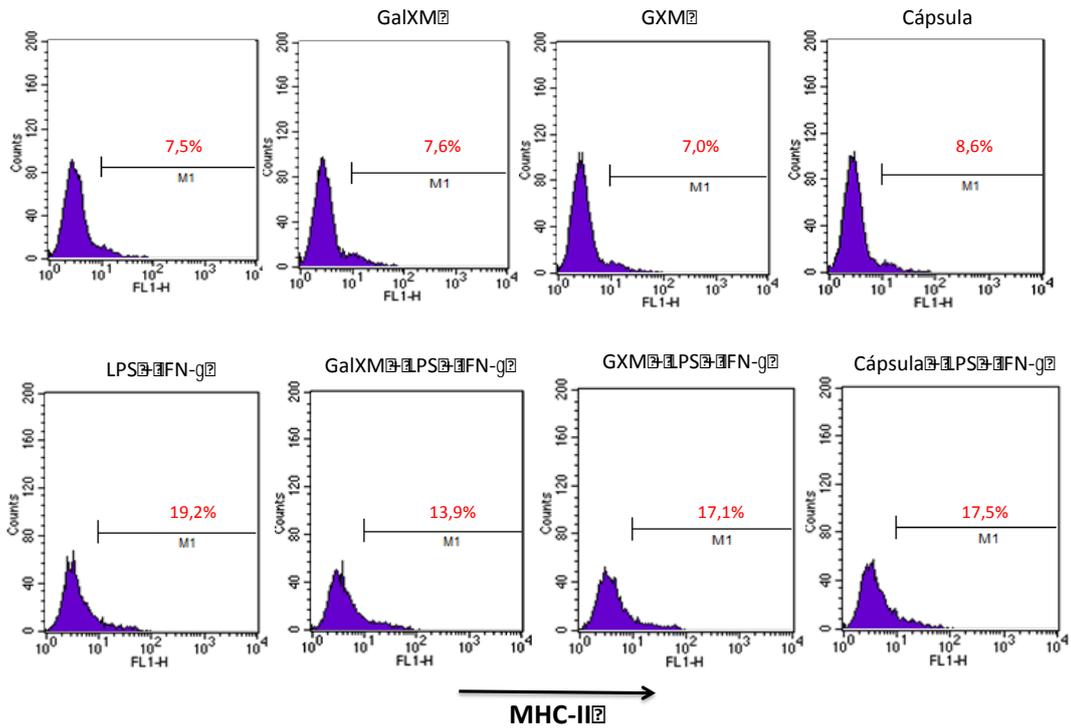
Figura 16: Produção de ROS pelas células DH82 em contato com os polissacarídeos capsulares e cápsula bruta. Células DH82 foram estabelecidas (5×10^4 /poço) e incubadas com a sonda fluorescente H2DCFDA ($10 \mu\text{M}$). Após a lavagem da sonda, os estímulos GalXM, GXM e cápsula ($100 \mu\text{g/mL}$), LPS (400ng/mL) e IFN- γ ($1,5 \text{ng/mL}$) foram adicionados e incubados para a realização de uma cinética em minutos (A) e horas (B). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Os grupos foram comparados através do teste estatístico ANOVA e do pós - teste Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.7 A GalXM purificada do *C. neoformans* modula a expressão de moléculas de MHC de classe II

Outro modo de avaliar o grau do estímulo que os polissacarídeos e a cápsula exercem sobre a célula DH82 é através da avaliação da expressão de moléculas de superfície, em especial marcadores celulares ligados à ativação de macrófagos, como por exemplo, MHC de Classe II (MHC-II).

Os macrófagos DH82 foram plaqueados e incubados juntamente com a GalXM, GXM ou a cápsula, na presença ou não do estímulo adicional de LPS e IFN- γ , para que a expressão de molécula de MHC-II fosse avaliada pela técnica de citometria de fluxo. Nossos resultados revelaram que os polissacarídeos não foram capazes de alterar a expressão de MHC-II em células não ativadas. No entanto, na presença dos estímulos adicionais LPS e IFN- γ , a GalXM induziu uma redução de 27.8% da expressão dessas moléculas (Figura 17A e 17B). Nossos resultados sugerem que células em contato com os polissacarídeos capsulares de *C. neoformans* não aumentam a expressão de MHC-II, entretanto se receberem um estímulo ativador parecem perder a habilidade de responder com toda sua capacidade.

A)



B)

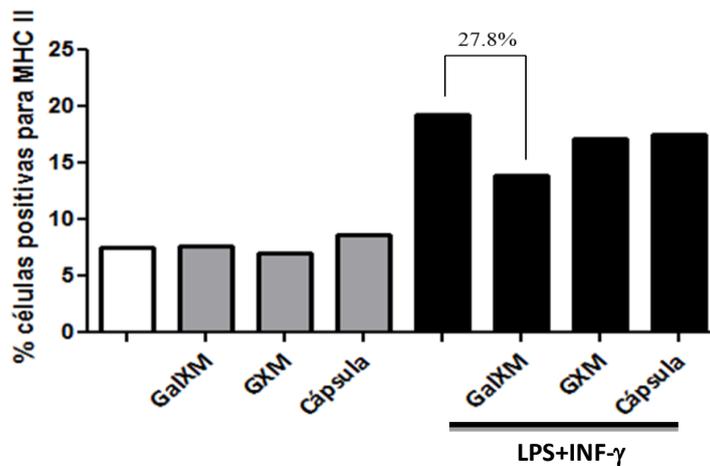


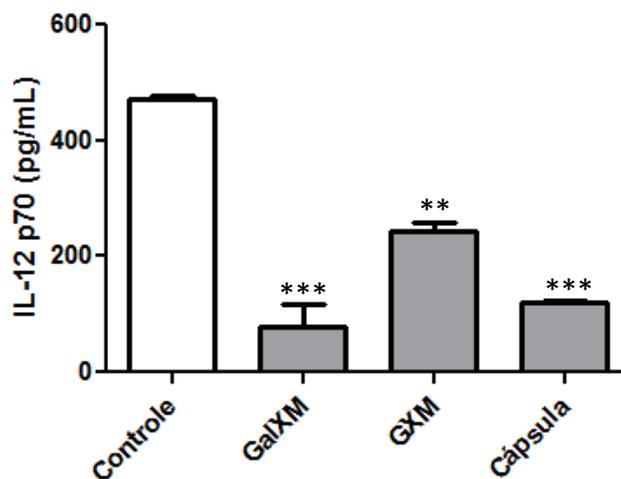
Figura 17: Expressão de MHC-II de macrófagos DH82 na presença de GalXM, GXM ou cápsula de *C. neoformans*. Culturas de DH82 foram estabelecidas (10^6 células/poço) e incubadas na presença dos polissacarídeos capsulares ou cápsula bruta ($100\mu\text{g/mL}$), LPS (400ng/mL) e $\text{IFN-}\gamma$ ($1,5\text{ng/mL}$) pelo período de 24h. Após, as células foram recolhidas, processadas e incubadas com anticorpo anti-MHC-II (1:20) por 30 minutos antes da leitura por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo da porcentagem de células DH82 marcadas com anti-MHC-II. (B) Representação gráfica da porcentagem de células positivas para MHC-II. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

5.8 Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta alteram a produção de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios

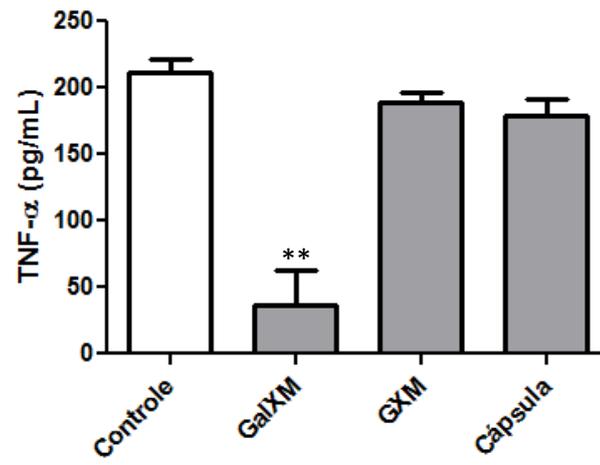
A cápsula do *C. neoformans* já foi descrita na literatura como sendo um importante fator de virulência do fungo (Zaragoza *et al.*, 2009). Além disso, já foi demonstrado pelo nosso grupo que os polissacarídeos de *C. neoformans* podem direcionar a produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias em macrófagos murinos (Villena *et al.*, 2008). Desse modo, foi avaliado o papel dos polissacarídeos e da cápsula bruta na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e TNF- α , assim como a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e o TGF- β .

Células da linhagem DH82 foram cultivadas durante 24h na presença de GalXM, GXM e da cápsula bruta e as citocinas foram dosadas a partir do sobrenadante das culturas pela técnica de ELISA. Nossos resultados mostraram que a produção de IL-12 foi inibida pela GalXM, GXM e a cápsula de forma significativa (Figura 18A). A análise da produção de TNF- α mostrou que GalXM foi capaz de inibir a produção dessa citocina, enquanto que as células DH82 incubadas com GXM e a cápsula não alteraram a produção de TNF- α (Figura 18B). Vimos também que células DH82 na presença da cápsula de *C. neoformans* apresentam uma diminuição significativa na produção de IL-10, enquanto que na presença da GalXM ou GXM a produção desta citocina não foi alterada (Figura 18C). Outra citocina que acompanhamos a produção em nosso modelo foi o TGF- β . Nossos experimentos revelaram que GalXM foi capaz de inibir significativamente a produção de TGF- β (Figura 18D), o que não foi observado frente a GXM e a cápsula. Os resultados obtidos através da análise da produção de citocinas em células DH82 sugerem que o contato com os polissacarídeos capsulares de *C. neoformans* tendem a modular negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias direcionando as células a um perfil anti-inflamatório que poderia ser um fator importante para a permanência de leveduras no interior dos macrófagos.

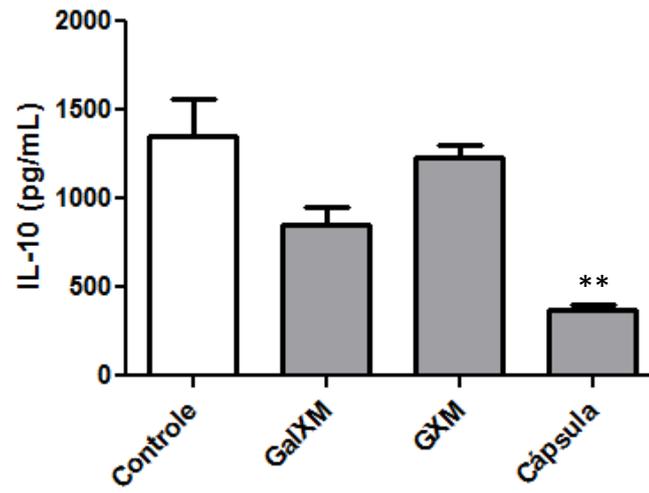
A)



B)



C)



D)

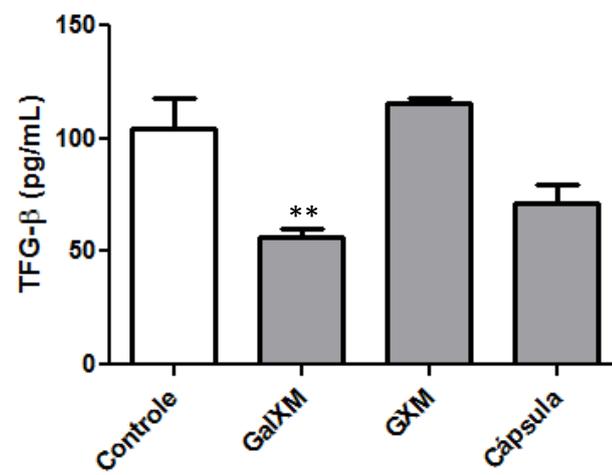


Figura 18: Produção de citocinas pelos macrófagos DH82 na presença dos polissacarídeos capsulares ou cápsula bruta. As células DH82 foram plaqueadas (3×10^5 células/poço) e incubadas na presença de GalXM, GXM ou cápsula bruta (100µg/mL). Após 24h, o sobrenadante das culturas foi recolhido para dosagem dos mediadores pró-inflamatórios IL-12 (A) e TNF- α (B); e anti-inflamatórios IL-10 (C) e TGF- β (D). O resultado é representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Os grupos foram comparados através do teste estatístico ANOVA e do pós - teste Dunnett. **p<0,01 e ***p<0,001.

5.9 Os polissacarídeos purificados e a cápsula bruta de *C. neoformans* modulam a fosforilação de ERK e a expressão de PPAR- γ

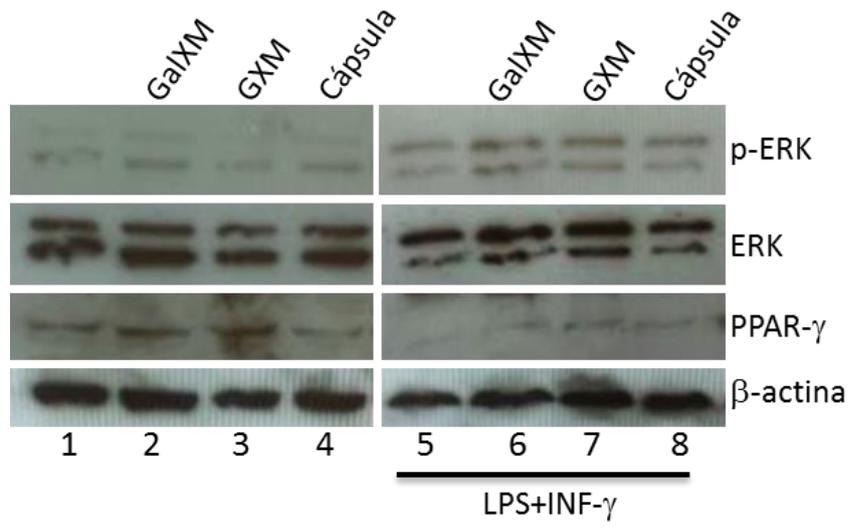
A fosforilação de proteínas quinases é um evento indispensável a diversas funções celulares, como proliferação e diferenciação. Essas proteínas são moléculas intracelulares bem conservadas, podendo ser usadas de modo a se investigar se determinada célula está sendo regulada positiva ou negativamente. Com o intuito de avaliar os efeitos do tratamento com os polissacarídeos ou cápsula bruta de *C. neoformans* na sinalização intracelular de células DH82, decidimos analisar a fosforilação da proteína quinase ERK que é fundamental nos processos de ativação de macrófagos.

Além de proteínas quinases alguns fatores nucleares podem estar relacionados a fenômenos supressores em macrófagos (Johann *et al.*, 2006; Freire-de-lima *et al.*, 2006). Assim, decidimos avaliar se a expressão do fator nuclear PPAR- γ poderia ser um alvo dos polissacarídeos capsulares. Realizamos ensaios com o objetivo de verificar se a modulação da fosforilação de ERK ou expressão de PPAR- γ poderia ser responsável pela tendência à inibição de atividades microbidas importantes para os macrófagos como a fagocitose e produção de citocinas com perfil pró-inflamatório que observamos até aqui.

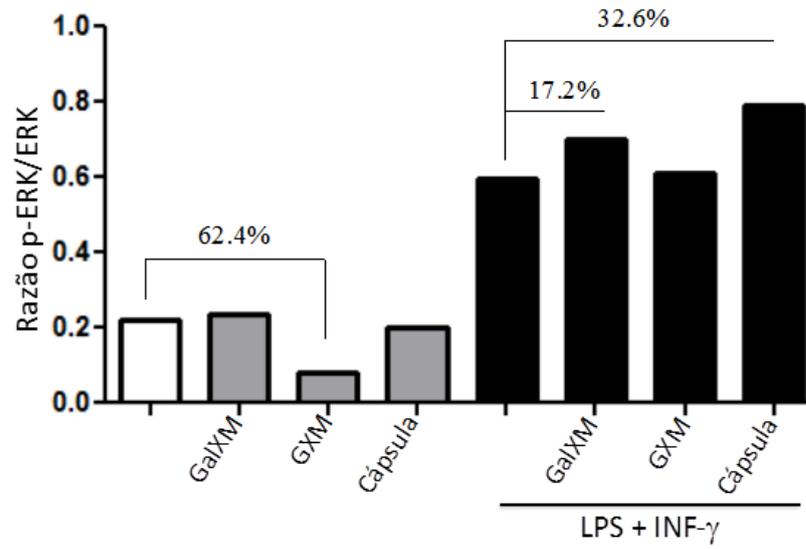
Para isso células DH82 foram incubadas juntamente com a GalXM, GXM ou a cápsula bruta, na presença ou ausência de LPS e IFN- γ , durante um período de 24h. Após esse tempo, o extrato de proteínas foi obtido com ajuda de tampão de lise e inibidores proteicos e analisado pela técnica de *Western blot*.

Analisando a fosforilação de ERK nossos resultados mostraram que na presença de GXM houve uma diminuição da fosforilação de ERK. Entretanto, quando as células DH82 foram ativadas com LPS e INF- γ observamos que houve aumento da fosforilação de ERK frente à GalXM, GXM e cápsula (Figura 19A e 19B). Sugerindo que células DH82 não ativadas podem ser moduladas negativamente pela GXM, enquanto que células ativadas em contato com os polissacarídeos incrementam a sinalização intracelular dependente da via ERK. Um panorama antagônico foi observado quanto à expressão de PPAR- γ . Células DH82 tem a expressão desse fator nuclear aumentada na presença de GalXM e GXM (Figura 19A e 19C), sugerindo que as células DH82 na presença desses polissacarídeos possam ser direcionadas a adquirirem um perfil inibidor o que favoreceria a permanência do fungo no organismo.

A)



B)



C)

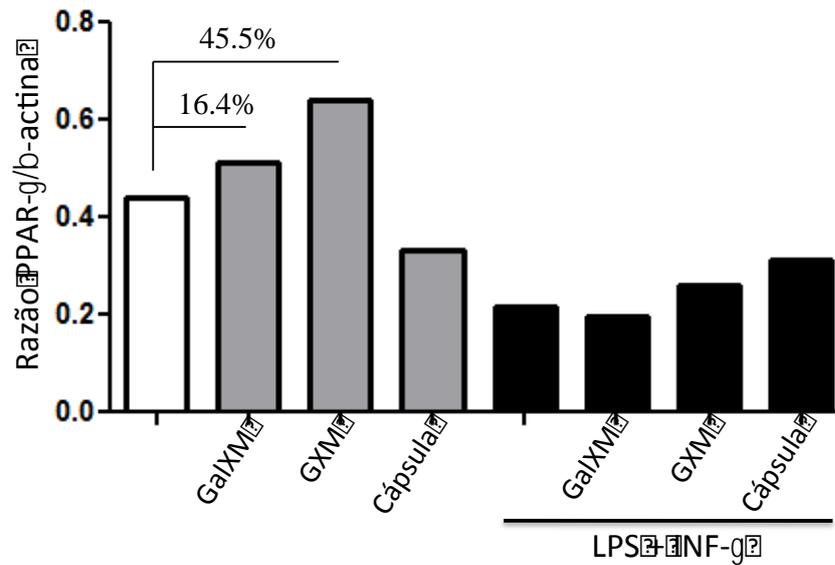


Figura 19: Efeito dos polissacarídeos capsulares e cápsula bruta na fosforilação de ERK e expressão de PPAR- γ pelos macrófagos caninos DH82. Culturas de células da linhagem DH82 foram estabelecidas (10^6 células/poço) e incubadas juntamente com GalXM, GXM ou cápsula ($100\mu\text{g/mL}$), na presença ou não de LPS (400 ng/mL) e IFN- γ ($1,5\text{ ng/mL}$). Após 24h, as células foram recolhidas na presença de inibidores de proteases e tampão de lise para obtenção do extrato proteico, que foi analisado pela técnica de *Western blot* (A). Representação gráfica da razão das áreas das bandas analisadas pelo programa de processamento de imagens ImageJ (B e C). O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

Em conjunto nossos resultados sugerem que em contato com os polissacarídeos capsulares de *C. neoformans*, a linhagem de macrófagos caninos DH82 apresenta várias de suas funções comprometidas. A capacidade reduzida de aderência e fagocitose e a sobrevivência de leveduras internalizadas por esses fagócitos podem representar um mecanismo facilitador para um fungo que use o espaço intracelular como mecanismo de escape da resposta imune. Além disso, a inibição na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF- α , aliado a inibição da fosforilação de ERK e aumento da expressão de PPAR- γ , apontam para um direcionamento ao perfil anti-inflamatório induzido pelos polissacarídeos do fungo nas células DH82.

6 DISCUSSÃO

A criptococose é uma enfermidade causada pelo fungo leveduriforme pertencente ao gênero *Cryptococcus*. Dentre as espécies deste fungo, duas, em especial, são as mais encontradas em casos clínicos: *Cryptococcus gatti* e *Cryptococcus neoformans* (Lester *et al.*, 2011). Ambas as espécies estão distribuídas mundialmente e são encontradas principalmente em excretas de aves e no solo, mas há relatos de contaminação de água e ar (Kidd *et al.*, 2004; Araujo *et al.*, 2012).

O *Cryptococcus* spp. é reconhecido como um fungo oportunista devido a sua disseminação sistêmica dentre indivíduos imunocomprometidos, como os portadores de AIDS, ou imunossuprimidos, como aqueles em tratamento quimioterápico (Li & Mody, 2010). O mesmo pode ser dito sobre sua disseminação dentre os animais. Gatos portadores de FIV ou FeLV estão mais propensos a desenvolverem criptococose sistêmica (Pereira *et al.*, 2013), apresentando quase a totalidade dos sistemas respiratório e tegumentar comprometidos. No entanto, ainda não se pode afirmar a existência ou não em relação ao comprometimento do sistema imunológico de cães, visto que há falhas na anamnese tanto por parte do corpo veterinário quanto por parte dos responsáveis pelo animal (Sykes *et al.*, 2010; Marcasso *et al.*, 2005; Robson & Smith, 2011).

Pode-se inferir, no entanto, que pela razão de cães apresentarem manifestações clínicas referentes a muitas outras enfermidades, inclusive suspeitas de displasias (Marcasso *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2013), durante a criptococose, fazem com que o animal seja pré-tratado antes do diagnóstico conclusivo para *C. neoformans*, aumentando as probabilidades de imunocomprometimento e disseminação sistêmica da levedura devido à esses tratamentos.

Nos últimos anos, assim como cresceu o número de casos de indivíduos com criptococose, sendo uma doença de alta prevalência e mortalidade dentre específicos grupos imunossuprimidos (Prado *et al.*, 2009), também aumentou o número de casos dessa doença entre cães (Sykes *et al.*, 2010; Marcasso *et al.*, 2005; Robson & Smith, 2011; Vorathavorn *et al.*, 2013) apesar deste grupo de animais de companhia ser em torno de 7 a 10 vezes menos susceptíveis ao *Cryptococcus* spp. do que outro grupo de grande valor afetivo representado pelos gatos (Pereira *et al.*, 2013).

Nos cães, assim como no homem, o *C. neoformans* é o agente etiológico mais encontrado na clínica e esta levedura, nesses hospedeiros em especial, possui predileção pelo SNC (Lavelly & Lipsitz, 2005; Casadevall, 2010). O primeiro sítio de contato do fungo com o hospedeiro é o sistema respiratório, já que a infecção se dá através da inalação dos esporos do *Cryptococcus* spp. (Queiroz *et al.*, 2008) e, como dito anteriormente, a disseminação do fungo depende do grau de imunidade do hospedeiro (Queiroz *et al.*, 2008; Li & Mody, 2010). Nos canídeos, além do sistema nervoso, o *C. neoformans* também atinge a visão e pode provocar lesões ulcerativas na pele (Lavelly & Lipsitz, 2005; Robson & Smith, 2011; Pereira *et al.*, 2013;).

Nos pulmões, o *C. neoformans* entra em contato com os macrófagos alveolares (García-Rodas & Zaragoza, 2012). Essas células são de grande valor para qualquer infecção devido à fagocitose de corpos estranhos e seu processamento, e produção de mediadores inflamatórios (Cohen & Mosser, 2013).

O *Cryptococcus* spp. é um fungo encontrado no ambiente e por esse motivo apresenta fatores de defesa, que dentro de um hospedeiro, se tornam fatores de virulência. O principal conhecido e estudo deste fungo é sua cápsula polissacarídica (Idnurm *et al.*, 2005; Zaragoza *et al.*, 2009). Uma vez dentro do organismo, o *C. neoformans* aumenta a espessura de sua cápsula (Zaragoza *et al.*, 2009; Vorathavorn *et al.*, 2013). Vários fatores estão envolvidos no crescimento dessa estrutura e, fisiologicamente, os pulmões, que representa o primeiro sítio de

infecção, proporciona um ambiente ideal para esse crescimento devido às concentrações de CO₂ (Zaragoza *et al.*, 2009).

A cápsula do *C. neoformans* é composta, majoritariamente, pelo polissacarídeo GXM, além de manoproteínas e de outro polissacarídeo, o GalXM, ambos em menores quantidades (Rodrigues *et al.*, 2011). Essa estrutura completa, assim como seus componentes purificados, já foi descrita ser responsável pela modulação de integrantes celulares do sistema imunológico (Zaragoza *et al.*, 2009; Villena *et al.*, 2008; Voelz & May, 2011).

Visto o crescente número de casos de criptococose em cães; a capacidade moduladora da cápsula do *C. neoformans* nas células do sistema imunológico; a importância do macrófago nessa infecção em especial, já que há descrições da sobrevivência do fungo no interior do fagolisossomo (Alvarez & Casadevall, 2007; Coelho *et al.*, 2013) e a escassez de informações sobre como o *C. neoformans* se comporta diante do hospedeiro canídeo; todos esses motivos nos levaram a investigar o comportamento do macrófago canino diante dos polissacarídeos capsulares de *C. neoformans* e sua cápsula bruta, pois além dos motivos descritos acima, observamos que na literatura há numerosas descrições de casos clínicos e não há estudos de pesquisa científica mais detalhada.

Em nosso trabalho, lançando mão de um método de substituição, utilizamos a linhagem celular de macrófagos caninos DH82 (Wellman *et al.*, 1988), visto que a obtenção de cães para o estudo seria inviável devido à inexistência de um canil apropriado. A obtenção de animais voluntariados também seria dificultada, pois não saberíamos ao certo a procedência do animal ou existência de possíveis infecções prévias tendo em vista a relação delicada existente entre donos de animais, principalmente cães e gatos, e pesquisadores. Além disso, a literatura mostra esta linhagem celular em modelos utilizando parasito, vírus ou bactéria (Hines & Maury, 2001; Harrus *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2007), não existindo modelos fúngicos ou com seus derivados estabelecido.

Nosso grupo vem trabalhando com os polissacarídeos GalXM e GXM, além da cápsula bruta do *C. neoformans*, e observamos que os polissacarídeos induzem a apoptose de macrófagos murinos da linhagem Raw através da indução da expressão de Fas/FasL (Villena *et al.*, 2008). Já foi descrito também a apoptose de linfócitos T, *in vitro*, pelo mesmo mecanismo (Monari *et al.*, 2005), além da apoptose de esplenócitos e células pulmonares *in vivo* (Chiapello *et al.*, 2003), proporcionando um microambiente anti-inflamatório, que é favorável a permanência do fungo no organismo. No entanto, este presente trabalho mostra que as moléculas capsulares ou a cápsula total da cepa selvagem B3501 não induzem a morte dos macrófagos DH82 (Figura 10), dado semelhante àquele visto em neutrófilos humanos (Rocha, 2013).

O próximo passo, visto que a GalXM, GXM e a cápsula do *C. neoformans* não induzem a morte celular, foi avaliar se esses polissacarídeos ou a cápsula seriam capazes de estimular a proliferação celular apesar da inibição da resposta imunológica já ter sido descrita (Zaragoza *et al.*, 2009). Observamos que o polissacarídeo GXM e a cápsula do *C. neoformans* induzem a proliferação dos macrófagos DH82 de maneira significativa enquanto que a GalXM provocou um leve aumento no número de células (Figura 11). A expressiva proliferação dos macrófagos na presença da cápsula pode ser explicada pela sua composição, já que na cápsula bruta há presença de ambos os polissacarídeos junto com manoproteínas, uma importante molécula indutora de reações imunológicas, que estimula a resposta de macrófagos, linfócitos e células dendríticas (Delfino *et al.*, 1997; Pietrella *et al.*, 2005; Dan *et al.*, 2008). Os macrófagos, através do TLR-4, respondem as mananas presentes nas moléculas de GXM (Voelz & May, 2010).

Diante da proliferação celular frente à GXM e a cápsula do *C. neoformans*, fomos investigar outros mecanismos importantes no primeiro contato de macrófagos com microrganismos: a aderência da célula ao microrganismo e consequente fagocitose.

Observamos que a presença dos polissacarídeos e da cápsula diminuiu a capacidade dos macrófagos em aderirem a microrganismos assim como a fagocitose dos mesmos. Os polissacarídeos e a cápsula inibem a aderência da DH82 (Figura 12). Verificamos também um declínio da fagocitose induzido pelos polissacarídeos e pela cápsula do mesmo modo em qualquer concentração (Figura 13). Vimos uma redução tanto do número de macrófagos que fagocitaram quanto o número de leveduras de *S. cerevisiae* fagocitadas por cada macrófago. Esta influência dos polissacarídeos e da cápsula nesses processos iniciais de reconhecimento do patógeno pode estar relacionada à característica de baixa responsividade do sistema imunológico diante deste patógeno (Murphy & Cozad, 1972).

A partir do momento que o GalXM, GXM e a cápsula do *C. neoformans* influenciaram nas etapas iniciais do reconhecimento do sistema imunológico através da fagocitose, investigamos se as leveduras de *S. cerevisiae* fagocitadas sofreriam ação fungicida por parte dos macrófagos DH82, através da contagem de CFU de leveduras recuperadas após a fagocitose. Oliveira e colaboradores (2010), no modelo de macrófagos murinos, sugerem que a presença ou ausência de GXM em vesículas secretadas pelo *C. neoformans* influenciam na quantidade de CFU de leveduras fagocitadas. Em nossos resultados, os altos números de colônias recuperadas a partir de células tratadas com as concentrações de 100µg/mL dos polissacarídeos (Figura 14) sugerem uma relação dose dependente, que poderia ser extrapolada ao modelo fisiológico, inferindo uma maior modulação do sistema imunológico pelo *C. neoformans* atrelada a sua carga fúngica (Murphy & Cozad, 1972). A presença de numerosas CFU em macrófagos com polissacarídeos sugere que estes diminuem a atividade fungicida do macrófago.

Apesar do reduzido índice de fagocitose na presença dos polissacarídeos capsulares ou cápsula do *C. neoformans*, foi mostrado que as leveduras fagocitadas por esses macrófagos permaneceram viáveis e capazes de crescer. Isso nos levou a investigar os mecanismos microbicidas exercidos pelos macrófagos, como a produção de NO, ROS e citocinas.

Wasserman e colaboradores (2012) já descreveram que macrófagos caninos da linhagem DH82 não alteram a taxa de NO quando estimulados por LPS quando comparadas com a situação controle sem estímulo. Avaliamos então a produção de NO pelas células DH82 em diferentes combinações de concentrações de LPS e IFN- γ , uma potente citocina ativadora de macrófagos através da indução da produção e liberação de NO (Tajima & Wada, 2013). O mesmo resultado observado por Wasserman foi visto em nosso trabalho, tanto em momentos iniciais (24h) quanto em tempo mais prolongado (48h). Nossos dados corroboram os da literatura indicando que em nosso modelo não foi possível observar a produção de óxido nítrico (Figura 15A e 15B). Com isso, fomos investigar se incapacidade de detectar NO seria devido à degradação do mesmo em cultura. Desse modo, verificamos a expressão da enzima iNOS, utilizando como controle positivo da técnica uma linhagem celular que já se sabe que expressa iNOS (Villena *et al.*, 2008). Observamos que a incapacidade de quantificar NO se reflete na ausência da expressão de iNOS em de culturas de células DH82, na presença de estímulos clássicos ativadores de macrófagos (15C).

A possível causa da viabilidade do *S. cerevisiae* fagocitado pelos macrófagos DH82 poderia ser a inexistência de NO. No entanto, o nosso modelo não pode ser comparado à viabilidade de *C. neoformans* dentro dos macrófagos de outros modelos já descritos, em células primárias ou *in vivo* (Chaturvedi *et al.*, 1996; Mambula *et al.*, 2000), pois se sabe da existência da produção de NO, em especial nos modelos *in vivo* (Perfect *et al.*, 1980).

Posteriormente, fomos analisar outro mecanismo microbicida de produção de oxidantes por fagócitos, o ROS, que é um fator que auxilia no processo inflamatório, visto que na criptococose canina, a formação de granulomas é expressiva (Lavelly & Lipsitz, 2005; Sykes *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2013). Ainda não há nada descrito na literatura se os macrófagos caninos da linhagem DH82 produzem ou não espécies reativas de oxigênio.

Nossos resultados mostram que as células DH82 foram capazes de induzir ROS. Além disso, a estimulação produzida pelas moléculas do fungo levou a uma produção de ROS semelhante à induzida por LPS e INF- γ (Figura 16). Sendo assim, a sobrevivência de microrganismos fagocitados por células DH82 tratadas com os polissacarídeos ou a cápsula de *C. neoformans* não é afetada mesmo na presença de quantidades aumentadas de ROS, se mostrando como uma via refratária a inibição frente às moléculas do fungo.

Os macrófagos atuam na apresentação e processamento de antígenos fagocitados, fazendo uma ponte com a resposta imune adaptativa. Nesse sentido, a expressão de moléculas de MHC e sua modulação frente a um estímulo são importantes, pois através da expressão de MHC-II, os macrófagos são regulados positivamente, atuando como APCs e funcionando como coadjuvante na ativação de linfócitos, que mediante o estímulo, direcionarão a resposta imunológica (Ramachandra *et al.*, 2009). Os macrófagos DH82 ao serem estimulados com os polissacarídeos capsulares ou a cápsula bruta, não alteraram sua expressão basal de MHC-II, colaborando para a não responsividade do sistema imunológico que o *C. neoformans* exerce sobre o hospedeiro (Zaragoza *et al.*, 2009). Com relação à expressão basal de MHC-II apresentada em nossos resultados, ela é semelhante àquela encontrada por Barnes e colaboradores (2000), porém bem menor das apresentadas por Harrus e colaboradores (2003), e Wasserman e colaboradores (2011). Este fato pode ser influenciado pela afinidade do anticorpo anti-MHC-II utilizado, assim como pelo número da passagem que a linhagem celular se encontrava no momento do experimento (Harrus *et al.*, 2003).

Ao serem estimulados com LPS e IFN- γ , os macrófagos caninos aumentam a expressão de MHC-II, visto a já conhecida capacidade que esses fatores exercem sobre a expressão dessa proteína de membrana (Harrus *et al.*, 2003; Wasserman *et al.*, 2012). No entanto, essa expressão apresenta uma diminuição de 27,8% na presença do polissacarídeo GalXM, indicando uma possível supressão da resposta de macrófagos caninos DH82 mediada por essa molécula purificada da cápsula do *C. neoformans*, dado este descrito aqui pela primeira vez, já que grande parte dos trabalhos referem-se a GXM (Retini *et al.*, 1998). No entanto, se sabe que a célula de *C. neoformans* induz a expressão de MHC-II em células gliais quando estas entram em contato com o fungo (Aguirre & Miller, 2002).

Um dos mecanismos importantes e essenciais dos macrófagos é a produção e liberação de citocinas que medeiam e encaminham a resposta imunológica de um indivíduo diante de uma infecção. Recentemente, foi visto o especial papel desse tipo celular na criptococose, mostrando que a polaridade dos macrófagos, mediante o perfil de citocinas presentes, influencia no curso da infecção por *C. neoformans* (Davis *et al.*, 2013). Nosso objetivo foi avaliar o perfil predominante de citocinas que as células DH82 produzem frente ao estímulo com GalXM, GXM ou cápsula de *C. neoformans*, pela técnica de ELISA, uma metodologia da quantificação de citocinas diferente da apresentada por outros trabalhos (Barnes *et al.*, 2000; Fujimoto *et al.*, 2012). Avaliamos duas citocinas pró-inflamatórias, que auxiliam na proteção do hospedeiro, e duas anti-inflamatórias, que favorecem a permanência do patógeno, já que a criptococose é uma infecção de equilíbrio entre perfil Th1 e Th2 (Li & Mody, 2010). Nossos resultados mostram que GalXM, GXM e a cápsula inibem a produção de IL-12, porém somente o GalXM inibe a produção da outra citocina pró-inflamatória, o TNF- α , e esta mesma molécula é a mais expressiva na redução de IL-12, um fator de importante sinalização autócrina na ativação de macrófagos (Pillarisetty *et al.*, 2005). Apesar de trabalhos descrevendo o papel anti-inflamatório de GXM (Villena *et al.*, 2008; Zaragoza *et al.*, 2009), em nossos resultados não observamos nenhuma modificação em relação esse polissacarídeo na quantificação das citocinas IL-10 e TFG- β , diferentemente das situações estimuladas com GalXM ou a cápsula total, que apresentam um declínio na produção desses mediadores anti-inflamatórios.

Nossos resultados em relação à produção de citocinas pela linhagem de macrófagos caninos DH82 quando tratadas com polissacarídeos do *C. neoformans* ou a cápsula bruta mostram que apesar do declínio da produção de mediadores anti-inflamatórios, as taxas de produção dos mediadores pró-inflamatórios são bem menores, prevalecendo o papel regulador anti-inflamatório característico da criptococose. No entanto, diferentemente do que apresentado na literatura até o momento, como dito anteriormente, os nossos resultados mostram um papel anti-inflamatório mais expressivo da GalXM. Recentemente, no modelo de artrite reumatoide humano, Pericolini e colaboradores (2013) mostram a influência desse polissacarídeo na regulação de linfócitos T ativados, evitando o processo de inflamação crônica existente na doença.

Aprofundando a discussão nos resultados obtidos na dosagem de citocinas, observamos altas taxas basais produzidas pela linhagem de macrófagos DH82 tanto dos mediadores pró quanto anti-inflamatórios. Não há para estes dados, infelizmente, algum respaldo na literatura, já que a grande parte dos trabalhos que mostram dosagem de citocinas na linhagem DH82 é feita através da quantificação de mRNA (Barnes *et al.*, 2000; Grone *et al.*, 2002; Fujimoto *et al.*, 2012) e por ser tratar de uma célula de linhagem, algumas características fisiológicas falham em ser mimetizadas. Porém, Kim e colaboradores (2006) fizeram a quantificação de IL-6 no sobrenadante das culturas de DH82 estimuladas com LPS pela técnica de ELISA, podendo observar que os índices basais dessa citocina são baixos.

Os resultados apresentados até o momento levam ao perfil de supressão dos macrófagos caninos DH82, com isso, fomos então investigar a sinalização intracelular frente ao estímulo com os polissacarídeos capsulares ou cápsula do *C. neoformans*. Os resultados obtidos mostram que GalXM, GXM ou a cápsula não induzem a fosforilação de ERK, que ocorre na presença de LPS e IFN- γ . Observamos também a diminuição da fosforilação da célula estimulada com LPS e IFN- γ na presença de GXM, mostrando mais uma vez a característica supressora do sistema imunológico dessa molécula, visto que ERK faz parte da grande família de MAPKinases, que estão envolvidas em diversos mecanismos celulares, inclusive proliferação e ativação celular mediante estímulo (Carneiro *et al.*, 2013; Rojas-Bernabé *et al.*, 2014). Outro marcador intracelular que investigamos foi o PPAR- γ , um fator nuclear que é ativado na presença de estímulos supressores (Johann *et al.*, 2006; Von Knethen *et al.*, 2013). Em comparação com a já sabida ativação que LPS e IFN- γ causam em macrófagos, observamos através da expressão de PPAR- γ que os polissacarídeos capsulares, em especial o GXM, e a cápsula do *C. neoformans* induzem a supressão dos macrófagos caninos DH82.

Portanto, nossos resultados em conjunto apontam um papel supressor dos polissacarídeos capsulares e da cápsula de *C. neoformans*, apesar da indução de ROS por essas moléculas. Através deste perfil de supressão do macrófago canino, podemos inferir que o fungo poderia permanecer viável dentro do macrófago e passível de desencadear uma infecção sistêmica. O macrófago apresentando sinais de supressão como fagocitose diminuída, favorecimento da produção de citocinas anti-inflamatórias e expressão aumentada de PPAR- γ seria capaz de carrear o *C. neoformans* oculto atingindo diferentes sítios do hospedeiro, inclusive o SNC, por se tratar de uma célula que atravessa a barreira hematoencefálica.

Esse trabalho mostra pela primeira vez o papel modulador de polissacarídeos capsulares de *C. neoformans* atuando sobre células de origem canina. Entendemos a necessidade de avaliações mais detalhadas em células DH82. Além disso, a posterior confirmação desses dados em macrófagos caninos obtidos do sangue periférico.

7 CONCLUSÕES

- 1- A GalXM, GXM e a cápsula bruta de *C. neoformans* não apresentaram efeitos tóxicos quanto em contato com células da linhagem canina DH82.
- 2- A GXM e a cápsula bruta de *C. neoformans* induzem a proliferação de células DH82.
- 3- A capacidade de aderir e fagocitar dos macrófagos caninos da linhagem DH82 foi diminuídas após o tratamento com os polissacarídeos e a cápsula bruta de *C. neoformans*.
- 4- Leveduras de *S. cerevises* recuperados após serem fagocitadas por células DH82, tratadas com os polissacarídeos e a cápsula bruta de *C. neoformans*, apresentam-se viáveis e capazes de crescer em quantidades significativas quando cultivadas.
- 5- Em nosso modelo não fomos capazes de detectar a produção de óxido nítrico ou a expressão de iNOS quando células DH82 foram estimuladas com LPS e INF- γ .
- 6- Macrófagos caninos DH82 foram capazes de produzir ROS quando estimuladas com LPS e INF- γ ou quando tratadas com os polissacarídeos ou a cápsula bruta na mesma intensidade.
- 7- A expressão das moléculas de MHC II não foi afetada pelo tratamento com os polissacarídeos ou cápsula bruta de *C. neoformans*. Entretanto células estimuladas com LPS e INF- γ apresentaram uma diminuição da expressão dessas moléculas quando estavam na presença de GalXM.
- 8- Células DH82 na presença dos polissacarídeos e da cápsula bruta apresentaram uma produção diminuída de IL-12. Na presença de GalXM houve uma diminuição na produção de TNF- α e TGF- β .
- 9- A fosforilação de ERK foi inibida pela GXM, enquanto que em células ativadas houve um aumento da fosforilação na presença de GalXM e da cápsula.
- 10- A expressão do fator nuclear PPAR- γ se mostrou aumentado quando macrófagos da linhagem canina DH82 foram incubados com GalXM e GXM.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, K.; MILLER, S. MHC class II-positive perivascular microglial cells mediate resistance to *Cryptococcus neoformans* brain infection. **Glia**, v. 39, p. 184–188, 2002.
- ALVAREZ, M.; BURN, T.; LUO, Y.; PIROFSKI, L.; CASADEVALL, A. The outcome of *Cryptococcus neoformans* intracellular pathogenesis in human monocytes. **BMC Microbiology**, v. 9(51), 2009.
- ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. **BMC Immunology**, v.16, p. 8-16, 2007.
- ARAUJO, G. S.; FONSECA, F. L.; PONTES, B.; TORRES, A.; CORDERO, R. J. B.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; CASADEVALL, A.; VIANA, N. B.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; GARCIA, E. S.; SOUZA, W.; FRASES, S. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PLoS One**, v. 7(1), p. 1-11, 2012.
- BARLUZZI, R.; BROZZETTI, A.; DELFINO, D.; BISTONI, F.; BLASI, E. Role of the capsule in microglial cell-*Cryptococcus neoformans* interaction: impairment of antifungal activity but not of secretory functions. **Medical Mycology**, v. 36(4), p. 189–197, 1998.
- BARNES, A.; BEE, A.; BELL, S.; GILMORE, W.; MEE, A.; MORRIS, R.; CARTER, S. D. Immunological and inflammatory characterization of three canine cell lines: k1, k6 and DH82. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 75, p. 9-25, 2000.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14:¹ medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v.27, p. 875-904, 2010.
- BLACKSTOCK, R. Cryptococcal capsular polysaccharide utilizes an antigen-presenting cell to induce a T suppressor cell to secrete TsF. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34(1), p. 19–30, 1996.
- BLACKSTOCK, R.; MURPHY, J. W. Secretion of the C3 component of complement by peritoneal cells cultured with encapsulated *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 65(10), p. 4114–4121, 1997.
- BOLAÑOS, B.; MITCHELL, T. G. Phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages in the absence of serum. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 46(6), p. 521-528, 1989.
- BOSE, I.; REESE, A. J.; ORY, J. J.; JANBON, G.; DOERING, T. L. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 2(4), p. 655–663, 2005.
- CARNEIRO, A. B.; IACIURA, B. M.; NOHARA, L. L.; LOPES, C. D.; VEAS, E. M.; MARIANO, V. S.; BOZZA, P. T.; LOPES, U. G.; ATELLA, G. C.; ALMEIDA, I. C.; SILVA-NETO, M. A. Lysophosphatidylcholine triggers TLR2- and TLR4-mediated signaling pathways but counteracts LPS-induced NO synthesis in peritoneal macrophages by inhibiting NF- κ B translocation and MAPK/ERK phosphorylation. **PloS One**, v. 8(9), 2013.
- CASADEVALL, A. Criptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120(5), p. 1389-1392, 2010.
- CASADEVALL, A. Fungi and rise of mammals. **PLoS Pathogens**, v. 8(8), p. 1-3, 2012.
- CASTELLÁ, G.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Criptococcosis y animals de compañía. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 19-24, 2008.
- CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Molecular and Cell Biology**, v. 14(7), p. 4912-4919, 1994.
- CHANG, Z. L.; NETSKI, D.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Binding and internalization of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus*

- neoformans*, by murine peritoneal macrophages. **Infection and Immunology**, v. 74(1), p. 144–151, 2006.
- CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F.; DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunology**, v. 77(1), p. 120–127, 2009.
- CHATURVEDI, V.; WONG, B.; NEWMAN, S. L. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. **Journal of Immunology**, v.156, p.3836–3840, 1996.
- CHERNIAK, R.; JONES, R. G.; REISS, E. Structure determination of *Cryptococcus neoformans* serotype A-variant glucuronoxylomannan by ¹³C-n.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 172(1), p. 113-138, 1988.
- CHERNIAK, R.; SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 62(5), p. 1507–1512, 1994.
- CHIAPELLO, L. S.; AOKI, M. P.; RUBINSTEIN, H. R.; MASIH, D. T. Apoptosis induction by glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 41(4), p. 347-353, 2003.
- CHRISMAN, C. J.; ALBUQUERQUE, P.; GUIMARÃES, A. J.; NIEVES, E.; CASADEVALL, A. Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 7(5), p. 1-15, 2011.
- COELHO, C.; BOCCA, A.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 219-238, 2013.
- COHEN, H. B.; MOSSER, D. M. Extrinsic and intrinsic control of macrophage inflammatory responses. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94(5), p. 913-919, 2013.
- CORDERO, R. J. B.; PONTES, B.; GUIMARÃES, A. J.; MARTINEZ, L. R.; RIVERA, J.; FRIES, B. C.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; VIANA, N. B.; CASADEVALL, A. Chronological aging is associated with biophysical and chemical changes in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 79(12), p. 4990-5000, 2011.
- DAN, J. M.; WANG, J. P.; LEE, C. K.; LEVITZ, S. M. Cooperative stimulation of dendritic cells by *Cryptococcus neoformans* mannoproteins and CpG oligodeoxynucleotides. **PLoS ONE**, v. 3(4), 2008.
- DAVIS, M. J.; TSANG, T. M.; QIU, Y.; DAYRIT, J. K.; FREIJ, J. B.; HUFFNAGLE, G. B.; OLSZEWSKI, M. A. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **MBio**, v. 4(3), 2013.
- DE JESUS, M.; PARK, C. G.; SU, Y.; GOLDMAN, D. L.; STEINMAN, R. M.; CASADEVALL, A. Spleen deposition of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan in rodents occurs in red pulp macrophages and not marginal zone macrophages expressing the C-type lectin SIGN-R1. **Med Mycol**, v. 46(2), p. 153–162, 2008.
- DELFINO, D.; CIANCI, L.; LUPIS, E.; CELESTE, A.; PETRELLI, M. L.; CURRO, F.; CUSUMANO, V.; TETI, G. Interleukin-6 production by human monocytes stimulated with *Cryptococcus neoformans* components. **Infection and Immunity**, v. 65(6), p. 2454–2456, 1997.
- DELFINO, D.; CIANCI, L.; MIGLIARDO, M.; MANCUSO, G.; CUSUMANO, V.; CORRADINI, C.; TETI, G. Tumor necrosis factor inducing activities of *Cryptococcus neoformans* components. **Infection and Immunity**, v. 64(12), p. 5199–5204, 1996.
- DOERING, T. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review Microbiology**, v. 63, p. 223-247, 2009.
- FINDLEY, K.; RODRIGUEZ-CARRES, M.; METIN, B.; KROISS, J.; FONSECA, A.; VILGALYS, R.; HEITMAN, J. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus*

- species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. **Eukaryot Cell**, v. 8(3), p. 353-361, 2009.
- FREIRE-DE-LIMA, C. G.; XIAO, Y. Q.; GARDAL, S. J.; BRATTON, D. L.; SCHIEMANN, W. P.; HENSON, P. M. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. **J Biol Chem**, v. 281(50), p. 38376-84, 2006.
- FUJIMOTO, Y.; NAKATANI, N.; KUBO, T.; SEMI, Y.; YOSHIDA, N.; NAKAJIMA, H.; ISERI, T.; AZUMA, Y. T.; TAKEUCHI, T. Adenosine and ATP Affect LPS-Induced Cytokine Production in Canine Macrophage Cell Line DH82 Cells. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74(1), p. 27-34, 2012.
- GARCIA-HERMOSO D.; DROMER F.; JANBON G. *Cryptococcus neoformans* capsule structure evolution in vitro and during murine infection. **Infect Immun**, v. 72(6), p. 3359-3365, 2004.
- GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 64(2), p. 147-161, 2012.
- GRONE, A.; FONFARA, S.; BAUMGARTNER, W. Cell Type-Dependent Cytokine Expression after Canine Distemper Virus Infection. **Viral Immunology**, v. 15(3), p. 493-505, 2002.
- HARRUS, S.; WANER, T.; FRIEDMANN-MORVINSKI, D.; FISHMAN, Z.; BARKA, H.; HARMELIND, A. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with . **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 239-143, 2003.
- HARRUS, S.; WANER, T.; FRIENDMAN-MORVINSKI, D.; FISHMAN, Z.; BARK, H.; HARMELIN A. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 239-243, 2003.
- HEISE, N.; GUTIERREZ, A. L.; MATTOS, K. A.; JONES, C.; WAIT, R.; PREVIATO, J. O.; MENDONCA-PREVIATO, L. Molecular analysis of a novel family of complex glycoinositolphosphoryl ceramides from *Cryptococcus neoformans*: structural differences between encapsulated and acapsular yeast forms. **Glycobiology**, v. 12(7), p. 409-420, 2002.
- HINES, R.; MAURY, W. DH82 cells: a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia virus. **Journal of Virological Methods**, v. 95, p.47-56, 2001.
- IDNURM, A.; YONG-SUN, B.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J. A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 3, p. 753-764, 2005.
- JOHANN, A. M.; VON KNETHEN, A.; LINDEMANN, D.; BRUNE, B. Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and attenuates the oxidative burst. **Cell Death Differ**, v. 13(9), p. 1533-1440, 2006.
- KECHICHIAN, T. B.; SHEA, J.; DEL, P. M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. **Infection and Immunology**, v. 75(10), p. 4792-4798, 2007.
- KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARLETT, K. H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K. J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101(49), p. 17258-17263, 2004.

- KIM, S. K.; SHIN, M. S.; JUNG, B. K.; SHIM, J. Y.; WON, H. S.; LEE, P. R.; KIM, A. Effect of dehydroepiandrosterone on lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production in DH82 cultured canine macrophage cells. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 70, p. 71-81, 2006.
- KOZEL, T. R.; MASTROIANNI, R. P. Inhibition of Phagocytosis by Cryptococcal Polysaccharide: Dissociation of the Attachment and Ingestion Phases of Phagocytosis. **Infection and Immunity**, v. 14(1), p. 62-67, 1976.
- KOZEL, T. R.; TABUNI, A.; YOUNG, B. J.; LEVITZ, S. M. Influence of opsonization conditions on C3 deposition and phagocyte binding of large- and small-capsule *Cryptococcus neoformans* cells. **Infection and Immunity**, v. 64(6), p. 2336–2338, 1996.
- LAVELY, J. & LIPSITZ, D. Fungal Infections of the Central Nervous System in the Dog and Cat. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 20, p. 212-219, 2005.
- LESTER, S. J.; MALIK, R.; BARLETT, K. H.; DUNCAN, C. G. Cryptococcosis: updates and emergence of *Cryptococcus gattii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40(1), p. 4-17, 2011.
- LI, S. S. & MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, p. 186-196, 2010.
- LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infections, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 401-416, 2009.
- LIN, X.; HEITMAN, J. A. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 69-105, 2006.
- LIN, X.; HULL, C. M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature**, v. 434, p. 1017-1021, 2005.
- MA, H.; CROUDACE, J. E.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. **Current Biology**, v. 16(21), p. 2156–2160, 2006.
- MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 67, p. 131-190, 2009.
- MAIA, C.; ROLÃO, N.; NUNES, M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 103, p.150–155, 2007.
- MAMBULA, S. S.; SIMONS, E. R.; HASTEY, R.; SELSTED, M. E.; LEVITZ, S. M. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v.68, p.6257–6264, 2000.
- MARCASSO, R. A.; SIERRA, S.; BAHR ARIAS, M. V. B.; BRACARENSE, A. P. R. L.; YAMAMURA, A. A. M.; DE BIASI, F.; LOPES, B. A.; AMUDE, A. M.; CORTÊZ, D. E. A. Criptococose no sistema nervoso de cães - relato de três casos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26(2), p. 229-238, 2005.
- MARTINS, D. B.; BARBOSA, A. L. T. B.; CAVALHEIRO, A.; LOPES, S. T. A.; SANTURIO, J. M.; SCHOSSLER, J. E.; MAZZANTI, A. Diagnóstico de criptococose canina pela citologia aspirativa por agulha fina. **Ciência Rural**, v.38(3), p.826-829, 2008.
- MAXSON, M. E.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A.; ZARAGOZA, O. Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Eukaryot Cell**, v. 6(1), p. 95–109, 2007.
- MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. **Infection and Immunity**, v. 74(3), p. 1500-1504, 2006.
- MCFADDEN, D. C.; DE JESUS, M.; CASADEVALL, A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281(4), p. 1868-1875, 2006.

- McFADDEN, D. C.; FRIES, B. C.; WANG F.; CASADEVALL, A. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 6(8), p. 1464-1473, 2007.
- MONARI, C.; KOZEL, T. R.; PAGANELLI, F.; PERICOLINI, E.; PERITO, S.; BISTONI, F.; CASADEVALL, A.; VECCHIARELLI, A. Microbial immune suppression mediated by direct engagement of inhibitory Fc receptor. **Journal of Immunology**, v. 177(10), p. 6842–6851, 2006.
- MONARI, C.; PAGANELLI, F.; BISTONI, F.; KOZEL, T. R.; VECCHIARELLI, A. Capsular polysaccharide induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. **Cellular Microbiology**, v. 10(10), p. 2129-2137, 2008.
- MONARI, C.; PERICOLINI, E.; BISTONI, G.; CASADEVALL, A.; KOZEL, T. R.; VECCHIARELLI, A. *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. **Journal of Immunology**, v. 174(6), p. 3461–3468, 2005.
- MUKHERJEE, J.; NUSSBAUM, G.; SCHARFF, M. D.; CASADEVALL, A. Protective and nonprotective monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* originating from one B cell. **Brief Definitive Report**, v. 181, p. 405-409, 1995. (*)
- MUKHERJEE, S.; LEE, S. C.; CASADEVALL, A. Antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan enhance antifungal activity of murine macrophages. **Infection and Immunity**, v. 63(2), p. 573-579, 1995.
- MURPHY, J. W.; COZAD, G. C. Immunological unresponsiveness induced by cryptococcal capsular polysaccharide assayed by the hemolytic plaque technique. **Infection and Immunity**, v. 5(6), p.896–901, 1972.
- NIMRICHTER, L.; FRASES, S.; CINELLI, L. P.; VIANA, N. B.; NAKOUZI, A.; TRAVASSOS, L. R.; CASADEVALL, A.; RODRIGUES, M. L. Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. **Eukaryotic Cell**, v. 6(8), p. 1400–1410, 2007.
- OLIVEIRA, D. L.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infection and Immunity**, v. 78(4), p. 1601-1609, 2010.
- OLIVEIRA, D.L.; G. FREIRE-DE-LIMA, C.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A., RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L. Extracellular Vesicles from *Cryptococcus neoformans* Modulate Macrophage Functions. **Infection and Immunity**, v. 78(4), p. 1601-1609, 2010.
- PEREIRA, M. F.; SANTOS, B. M.; SILVA, V. C. L.; PEREIRA, H. N. S.; SILVA, L. B. G.; PAIVA, B. H. A.; BARROS, R. B.; DIAS, M. B. M. C.; NEVES, A. K. R.; OLIVEIRA, A. A. F. Aspectos clínicos e anatomopatológicos da criptococose nasal com disseminação sistêmica em cão: relato de caso. **Medicina Veterinária**, v.7(2), p.7-15, 2013.
- PERFECT, J. R.; LANG, S. D.; DURACK, D. T. Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits. **The American Journal of Pathology**, v.102, p.177–194, 1980.
- PERICOLINI, E.; ALUNNO, A.; GABRIELLI, E.; BARTOLONI, E.; CENCI, E.; CHOW, S.; BISTONI, G.; CASADEVALL, A.; GERLI, R.; VECCHIARELLI, A. The microbial capsular polysaccharide galactoxylomannan inhibits IL-17^a production in circulating T cells from rheumatoid arthritis patients. **PLoS One**, v. 8(1), p. 1-11, 2013.
- PERICOLINI, E.; CENCI, E.; MONARI, C.; DE JESUS, M.; BISTONI, F.; CASADEVALL, A.; VECCHIARELLI, A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. **Cellular Microbiology**, v. 8(2), p. 267–275, 2006.

- PIETRELLA, D.; CORBUCCI, C.; PERITO, S.; BISTONI, G.; VECCHIARELLI, A. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. **Infection and Immunity**, v. 73(2), p.820–827, 2005.
- PILLARISETTY, V. G.; KATZ, S. C.; BLEIER, J. I.; SHAH, A. B.; DEMATTEO, R. P. Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. **Journal of Immunology**, v. 174(5), p. 2612-2618, 2005.
- PRADO, M.; DASILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in associate on with AIDS in Brazil: a review from1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 513–521, 2006.
- QUEIROZ, J. P. A. F.; SOUSA, F. D. N.; LAGE, R. A.; IZAEEL, M. A.; SANTOS, A. G. A Criptococose – Uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2(2), p. 32-38, 2008.
- RAMACHANDRA, L.; SIMMONS, D.; HARDING, C. V. MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. **Current Opinion of Immunology**, v. 21(1), p. 98-104, 2009.
- RETINI, C.; VECCHIARELLI, A.; MONARI, C.; BISTONI, F.; KOZEL, T. R. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* with glucuronoxylomannan inhibits the antigen-presenting capacity of monocytes. **Infection and Immunity**, v. 66(2), p. 664–669, 1998.
- ROBSON, K.; SMITH, P. M. Cryptococcal meningoencephalitis in a dog. **Veterinary Record**, v. 168, p. 538-540, 2011.
- ROCHA, J. D. B. Modulação das redes extracelulares de neutrófilos (NETs) pelo fungo oportunista *Cryptococcus neoformans*. 2013. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; CORDERO, R. J. B.; CASADEVALL, A. Fungal polysaccharides: biological activity beyond the usual structural properties. **Frontiers in Microbiology**, v. 2(171), p. 1-4, 2011.
- SHI, M. *et al.* Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120(5), p. 1683-1693, 2010.
- SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31(2), p. 47-60, 2014.
- SYKES, J. E.; STURGES, B. K.; CANNON, M. S.; GERICOTA, B.; HIGGINS, R. J.; TRIVEDI, S. R.; DICKINSON, P. J.; VERNAU, K. M.; MEYER, W.; WISNER, E. R. Clinical Signs, Imaging Features, Neuropathology, and Outcome in Cats and Dogs with Central Nervous System Cryptococcosis from California. **Journal of Veterinary International Medicine**, v. 24, p. 1427-1438, 2010.
- TAJIMA, T.; WADA, M. Inhibitory effect of interferon gamma on frequency of Ehrlichia canis-infected cells in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 156(3-4), p. 200-204, 2013.
- TRIVEDI, S. R.; SYKES, J. E.; CANNON, M. S.; WISNER, E. R.; MEYER, W.; STURGES, B. K.; DICKINSON, P. J.; JOHNSON, L. R. Clinical features and epidemiology of cryptococcosis in cats and dogs in California: 93 cases (1988-2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 239(3), p. 357-369, 2011.
- TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles

- containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99(5), p. 3165–3170, 2002.
- VAISHNAV, V. V.; BACON, B. E.; O'NEILL, M. Cherniak R. Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. **Carbohydrate Research**, v. 306(12), p. 315–330, 1998.
- 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. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cellular Microbiology**, v. 10(6), p. 1274-1285, 2008.
- VOELZ, K. & MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryotic Cell**, v. 9(6), p. 835-846, 2010.
- VON KNETHEN, A.; SHA, L. K.; KUCHLER, L.; HEEG, A. K.; FUHRMANN, D.; HEIDE, H.; WITTIG, I.; MAIER, T. J.; STEINHILBER, D.; BRUNE, B. 5-Lipoxygenase contributes to PPAR- γ activation in macrophages in response to apoptotic cells. **Cellular Signaling**, v. 25(12), p. 2762-2768, 2013.
- VORATHAVORN, V. I.; SYKES, J. E.; FELDMAN, D. G. Cryptococcosis as an emerging systemic mycosis in dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23(5), p. 489-497, 2013.
- WASSERMAN, J.; DIESE, L.; VANGUNDY, Z.; LONDON, C.; CARSON, W. E.; PAPENFUSS, T. L. Suppression of canine myeloid cells by soluble factors from cultured canine tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.145, p. 420– 430, 2012.
- WELLMAN, M. L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R. M.; KOCIBA, G.J. A macrophage – monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 24(3), p. 223-229, 1988.
- ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 68, p. 133-216, 2009.