



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

ALESSANDRA DA SILVA ARAÚJO

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR E DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO IFN- γ
PELA GLUCURONOXILOMANANA (GXM) DE *Cryptococcus neoformans***

UBERABA
2015

ALESSANDRA DA SILVA ARAÚJO

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR E DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO IFN- γ
PELA GLUCURONOXILOMANANA (GXM) DE *Cryptococcus neoformans***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração Parasitologia, Imunologia e Microbiologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira.

UBERABA
2015

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunobiologia e Ativação Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Recebeu apoio financeiro da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU).

DEDICATÓRIA

Nem com todas as palavras do mundo eu seria capaz de dedicar esta dissertação a quem merece de todo coração. Dedico a meus pais Hugo e Maria Luiza este trabalho fruto de muito esforço, e agradeço a confiança e as palavras que tanto me acalentaram nos momentos mais complicados que percorri. Dedico também a meu irmão e companheiro Marcelo Silva, que a todo tempo me encorajou e mostrou que sou capaz, durante toda duração desta dissertação. Por todas as noites em claro, por madrugadas adentro, por tudo, absolutamente tudo, meu muito obrigada. Eu simplesmente amo vocês, obrigada por fazerem parte desta etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que eu chegasse até aqui e por ter me concedido forças nos momentos de medo e incerteza.

Ao meu orientador Dr. David, pela oportunidade, contribuição, por todos os ensinamentos e por acreditar em mim, sem sua confiança não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Ana Carolina Santana de Oliveira, por ter sido tudo que eu precisava, nas horas boas e ruins, estar sempre presente e por ter me ensinado tudo que sei hoje. Eu realmente não sei o que seria sem a sua presença.

À Ana Cristina Lopes Tosta, pela doçura, paciência, sabedoria e carinho com todo trabalho desenvolvido. Foi através de seus ensinamentos de citometria que hoje eu concluo esta etapa.

À Renata Reis Vitalli, que me concedeu sua amizade, apoio constante, companheirismo, incentivo e alegria em todos os dias de trabalho que passei ao seu lado.

Ao amigo Marcelo Rocha Nogueira, por ter me auxiliado no desenvolvimento do trabalho, pelo apoio técnico e em especial pelos momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Imunobiologia e Pesquisa da Ativação Celular, Ana Paula Sarreta Terra, Fernanda Gonçalves Garcia, Paulo Roberto da Silva, Sílvia Baldan, Rubens José, Regina Rabelo, pelo auxílio na realização das técnicas, desenvolvimento dos experimentos e pela disponibilidade em todas as etapas desta longa jornada.

À Joicy Fornazier, pelo apoio incondicional, compreensão e por todo carinho oferecido, pelas longas horas de auxílio nas correções, formatações e consultas desta dissertação. Sem você posso afirmar sem sombra de dúvidas que minha caminhada teria sido mais triste, exaustiva e complicada.

À Nathalia Siqueira Silva Caiapó, que esteve presente nos primeiros momentos, sempre muito cuidadosa e aconselhadora. Por todo incentivo, por tornar as coisas tão simples e me apoiar sempre.

Aos alunos de iniciação científica, mestrandos, doutorandos e professores que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica causada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, leveduras capsuladas, que acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes, respectivamente. A infecção ocorre após a inalação de propágulos do microrganismo dispersos no ar, que posteriormente penetram nos pulmões, com tendência para invadir o sistema nervoso central (SNC). A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência desse fungo, composta majoritariamente por glucuronoxilomanana (GXM), componente de superfície mais externo, com grande potencial imunogênico que parece ser fundamental na proteção desses fungos contra as defesas do hospedeiro. Neste trabalho avaliamos os efeitos imunoregulatórios da GXM obtida do *C. neoformans* sobre a resposta de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares humanas de sangue periférico (PBMC) ao IFN- γ recombinante. No primeiro momento avaliamos o efeito da GXM sobre a produção de CXCL10 após estimulação com IFN- γ no sobrenadante de cultura celular, e em seguida investigamos intracelularmente em PMN e PBMC a produção desta quimiocina através de citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a GXM possui capacidade de modular a resposta de PMN e PBMC ao IFN- γ , através da diminuição na produção de CXCL10. Posteriormente, avaliamos a expressão do receptor do IFN- γ (IFN- γ R1/CD119) por citometria de fluxo. Os dados obtidos mostram que a GXM modula negativamente a expressão desse receptor. Por fim, monócitos humanos apresentaram redução significativa na fosforilação de STAT1 após pré-tratamento *in vitro* com GXM. Deste modo, nosso estudo demonstrou que a GXM de *C. neoformans* interfere na modulação da resposta ao IFN- γ e na sua via de sinalização em PMN e PBMC. Os resultados obtidos no presente estudo auxiliam no entendimento dos mecanismos patogênicos utilizados pelo *C. neoformans* na evasão do sistema imune, podendo contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a criptococose.

Palavras-chave: *Cryptococcus*, Glucuronoxilomanana (GXM), CXCL10, IFN- γ R1, STAT1.

ABSTRACT

Cryptococcosis is an systemic fungal infection caused by *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, encapsulated yeasts, affecting mainly immunocompromised and immunocompetent individuals respectively. Infection occurs after inhalation of microorganism's propagules dispersed in the air, which subsequently penetrates into the lungs, with a tendency to invade the central nervous system. The polysaccharide capsule is the main virulence factor of this fungus, composed mostly of glucuronoxilomanan (GXM), an outer surface component, with great immunogenic potential that appears to be essential in protecting these fungi against host defenses. In this work we evaluate the immunoregulatory effects of GXM obtained from *C. neoformans* on polymorphonuclear (PMN) and peripheral blood human mononuclear cell (PBMC) response to recombinant human IFN- γ . Initially, we evaluated the effect of GXM on CXCL10 production in cell culture supernatants and subsequently, the intracellular chemokine production in PMNs and PBMCs by flow cytometry. The results showed that GXM modulates PMN and PBMC response to IFN- γ by reducing CXCL10 production. The evaluation of IFN- γ receptor alpha chain (IFN- γ R1/CD119) expression by flow cytometry revealed that GXM reduces the expression of this receptor. Finally, human monocytes significantly reduced STAT1 phosphorylation after *in vitro* incubation with GXM. Thus, our study demonstrated that GXM from *C. neoformans* interferes with cellular response to IFN- γ and its signaling pathways in human PMN and PBMC. The data obtained in the present study increases the understanding of pathogenic mechanisms used by *C. neoformans* to escape host's immune system, and may contribute to development of new therapeutic strategies for cryptococcosis.

Keywords: Cryptococcus, Glucuronoxilomanan (GXM), CXCL10, IFN- γ R1, STAT1.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Histórico.....	16
1.2 Epidemiologia.....	17
1.3 Agente etiológico e patologia da criptococose.....	20
1.4 Manifestações clínicas.....	23
1.5 Diagnóstico laboratorial.....	25
1.6 Cápsula polissacarídica.....	26
1.7 Resposta imune ao <i>Cryptococcus</i>	28
1.8 CXCL-10 / IP-10.....	33
2 JUSTIFICATIVA.....	36
3 HIPÓTESE.....	37
4 OBJETIVOS.....	38
4.1 Objetivo geral.....	38
4.2 Objetivos específicos.....	38
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1 Casuística.....	39

5.1.1 Voluntários saudáveis.....	39
5.2 Obtenção de células mononucleares (PBMC) e polimorfonucleares (PMN) de sangue periférico.....	39
5.3 Cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i>	40
5.4 Extração e caracterização do antígeno polissacarídico capsular (GXM).....	40
5.5. Prova do Criptolátex.....	41
5.6 ELISA com anticorpo monoclonal anti-GXM (Mab18b7) para identificação da GXM obtida de <i>C. neoformans</i>	41
5.7 Cultura celular, coleta e armazenamento de sobrenadante.....	42
5.8 Testes de viabilidade celular.....	43
5.8.1 Metabolização do sal tetrazólico (MTT) por PMNs e PBMCs.....	43
5.8.2 Método do azul de tripan.....	43
5.9 Quantificação de quimiocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	44
5.10 Citometria de fluxo para avaliação de receptores de membrana.....	45
5.10.1 Estratégia de análise para receptores de membrana.....	45
5.11 Citometria de fluxo para avaliação intracelular de CXCL10 e STAT1.....	46
5.11.1 Estratégia de análise para a citometria de fluxo intracelular.....	47
5.12 Análise estatística.....	47
5.13 Aspectos éticos.....	48
6 RESULTADOS.....	49
6.1 Casuística.....	49
6.2 Reatividade ao criptolátex.....	49
6.3 Reatividade ao anticorpo monoclonal (18b7) anti-GXM por ELISA.....	50
6.4 Quantificação do número de células viáveis, pelo azul de tripan, após cultivo de PMNs e PBMCs com a GXM de <i>C. neoformans</i>	51
6.5 Avaliação da citotoxicidade da GXM pelo método do MTT por PMNs e PBMCs..	52

6.6 Avaliação da resposta de PBMCs e PMNs ao IFN- γ recombinante em diferentes períodos de cultura celular <i>in vitro</i>	53
6.7 Avaliação da produção de CXCL10 por PBMCs e PMNs estimuladas com diferentes concentrações de IFN- γ recombinante.....	55
6.8 Efeito do pré-tratamento com GXM de <i>C. neoformans</i> sobre a produção de CXCL10 por PMNs e PBMCs <i>in vitro</i>	56
6.9 Citometria de fluxo.....	57
6.9.1 Análise da produção de CXCL10 intracelular em PMNs e PBMCs pré-tratados com GXM de <i>C. neoformans</i>	57
6.9.2 Análise da expressão da cadeia alfa do receptor do IFN- γ (CD119/ IFN- γ R1) em PMNs e PBMCs pré-tratados com a GXM de <i>C. neoformans</i>	58
6.9.3 Avaliação da fosforilação de STAT1 em PBMCs.....	61
7 DISCUSSÃO	63
8 CONCLUSÃO	73
9 REFERÊNCIAS	74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** ELISA com anticorpo monoclonal anti-GXM (Mab 18B7) para identificação da GXM obtida de *C. neoformans* da cepa CBS 132 (GXM A) e GXM da cepa H99 (GXM H99).....50
- Figura 2:** Efeito da GXM obtida de *C. neoformans*, cepa CBS 132 (GXM-A) sobre a metabolização de MTT por PMNs e PBMCs (5×10^5 células/poço) pré-incubada a 37°C em estufa a 5% de CO₂ durante 4 horas na presença ou ausência de doses crescentes de GXM (0, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL)..... 52
- Figura 3:** Efeito da GXM obtida de *C. neoformans*, cepa H99 (GXM-H99) sobre a metabolização de MTT por PMNs e PBMCs (5×10^5 células/poço) pré-incubada a 37°C em estufa a 5% de CO₂ durante 4 horas na presença ou ausência de doses crescentes de GXM (0, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL)..... 53
- Figura 4:** Curva da produção da quimiocina CXCL10 por células polimorfonucleares humanas (PMNs - $1,0 \times 10^6$ células/poço) após estímulo com 10,0 ng/mL de IFN- γ recombinante em diferentes períodos de incubação (1, 2, 4 e 18 horas)54
- Figura 5:** Curva da produção da quimiocina CXCL10 por células mononucleares humanas (PBMCs - $1,0 \times 10^6$ células/poço) após estímulo com 10,0 ng/mL de IFN- γ recombinante em diferentes períodos de incubação (1, 2, 4 e 18 horas)54
- Figura 6:** Curva da produção da quimiocina CXCL10 por células polimorfonucleares humanas (PMN - $1,0 \times 10^6$ células/poço) após estímulo com diferentes concentrações de IFN- γ recombinante (1,0; 2,0; 5,0 e 10 ng/mL)..... 55
- Figura 7:** Curva da produção da quimiocina CXCL10 por células mononucleares humanas (PBMCs - $1,0 \times 10^6$ células/poço) após estímulo com diferentes concentrações de IFN- γ recombinante (0,25; 0,5; 1 e 10 ng/mL)..... 56

- Figura 8:** Produção de CXCL10 por PMNs e PBMCs ($1,0 \times 10^6$) pré-tratadas com doses crescentes de GXM de *C. neoformans* (10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) por 18 horas, na presença de IFN- γ recombinante (10 ng/mL), exceto o grupo CN (controle negativo)..... 57
- Figura 9:** Produção de CXCL10 intracelular por PMNs e PBMCs pré-tratados com GXM de *C. neoformans*..... 58
- Figura 10:** Expressão da cadeia alfa do receptor 1 do IFN- γ (CD119/IFNGR1) em células polimorfonucleares humanas (PMNs) pré-tratadas com a GXM obtida do *C. neoformans* avaliada por citometria de fluxo..... 59
- Figura 11:** Expressão da cadeia alfa do receptor 1 do IFN- γ (CD119/ IFN- γ R1) em células mononucleares humanas (PBMCs) pré-tratadas com a GXM obtida do *C. neoformans* avaliada por citometria de fluxo..... 60
- Figura 12:** Fosforilação de STAT1 por células CD14⁺ pré-tratadas com GXM.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Número e porcentagem de indivíduos incluídos na casuística segundo gênero, idade e níveis séricos de proteína C reativa..... 49

Tabela II: Média dos valores individuais das porcentagens de viabilidade das culturas de PMNs em diferentes concentrações do GXM de *C. neoformans* submetidas ao teste de exclusão do azul de tripan..... 51

Tabela III: Média dos valores individuais das porcentagens de viabilidade das culturas de PBMCs em diferentes concentrações do GXM de *C. neoformans* submetidas ao teste de exclusão do azul de tripan..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- °C - Graus Celsius
- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- BCG - Bacilo Calmette-Guérin
- BSA – Albumina do soro bovino
- C – Controle
- CCL2 – Proteína quimiotática de monócitos 1
- C. gattii* - *Cryptococcus gattii*
- C. neoformans* - *Cryptococcus neoformans*
- CD – Grupo de diferenciação
- CD119 - PE - Anticorpo anti-CD119 (IFN- γ R1) marcado com ficoeritrina
- CD14-FITC - Anticorpo anti-CD14 marcado com isotiocianato de fluoresceína
- CGB - L-canavanina-glicina-azul de bromotimol
- CN - Controle negativo
- CP - Controle positivo
- CXCL10 (IP-10) - Proteína de 10 kDa induzida por IFN- γ
- CXCL8 (IL-8) - Interleucina 8
- CXCR3 – Receptor de quimiocina 3
- D. O. - Densidade óptica
- ELISA - *Ensaio de imunoabsorção enzimática*
- ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
- FACS - Fluorescente Activated Cell Sorting
- FITC - Isotiocianato de fluoresceína
- g - Força g (gravitacional)
- GalXM - Galactoxilomanana
- GXM - Glucuronoxilomanana
- GXM-A - Antígeno polissacarídico capsular obtido do *C. neoformans* sorotipo A
- H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- IFN- γ - Interferon gama
- IFN- γ R1 - Receptor1 de IFN- γ
- IFN- γ R2 - Receptor 2 de IFN- γ

IgG1 - Imunoglobulina G1

IL – Interleucina

IL- 1 β - Interleucina 1 beta

IL- 2 - Interleucina 2

IL- 4 - Interleucina 4

IL- 5 - Interleucina 5

IL- 10 - Interleucina 10

IL- 12 β 2- Interleucina 12 beta 2

IL- 12 p35 – Subunidade p35 da interleucina 12

IL- 12p40 - Subunidade p40 da interleucina 12

IL- 13 - Interleucina 13

IL- 17 - Interleucina 17

JAK - Janus quinase

L-CGB - (L-canavanina, glicina e azul de bromotimol)

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LPS - Lipopolissacarídeos

LT CD4+ - Linfócito T CD4+

LT CD8+ - Linfócito T CD8+

M - Molar

mg - Miligrama

MIG/CXCL9 - Monocina induzida por interferon gama

min - Minuto

mL - Mililitro

MP - Manoproteína

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

N - Número de amostra

NFk β – Fator nuclear kappa beta

ng - Nanograma

NK - Natural Killer

NO - Óxido nítrico

OH - Radical Hidroxila

PAMPs - Padrões moleculares associados aos patógenos

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PBS - Solução salina tamponada com fosfato
PCR - Proteína C reativa
PMN - Leucócitos Polimorfonucleares
RPMI - Instituto Roswell Park Memorial
SDS - Duodecil sulfato de sódio
SNC - Sistema nervoso central
SOCS 1 - Supressores da sinalização de citocinas 1
SOCS3 - Supressores da sinalização de citocinas 3
spp. - Espécies
STAT1- Transdutores de sinal e ativadores de transcrição 1
LT CD4+ - Linfócito T CD4+
Th - T auxiliar
Th1 - T auxiliar do tipo I
Th2 - T auxiliar do tipo II
TLR – Receptores Toll-like
TLR1 – Receptor Toll-like 1
TLR2 - Receptor Toll-like 2
TLR4 - Receptor Toll-like 4
TLR6 - Receptor Toll-like 6
TLR9 - Receptor Toll-like 9
TMB - Tetrametilbenzidina
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral *Alfa*
var. - Variedades
 μg - micrograma
 μL - microlitro

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A criptococose é uma doença fúngica bem caracterizada, causada preferencialmente por duas leveduras encapsuladas, de grande relevância clínica e epidemiológica, *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) e *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*), acometendo o homem e os animais. É uma infecção aguda, subaguda ou crônica, de caráter sistêmico, capaz de ocasionar infecções fatais envolvendo pulmão, cérebro, ossos, e diversos órgãos do hospedeiro. (CASTELLÁ, ABARCA e CABAÑES, 2008; BYRNES et al., 2009; DUNCAN, STEPHEN e CAMPBELL, 2006; GUO et al., 2012; BIANCHERI et al., 2012; BATISTA et al., 2011).

C. neoformans é um patógeno distribuído mundialmente, e sua prevalência aumentou drasticamente, acompanhado da epidemia de pacientes imunossuprimidos, incluindo com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Receptores de transplante de órgãos, cirrose, malignidades hematológicas, doenças reumatológicas, diabetes melitus e uso de corticosteróides, são alguns dos principais fatores de risco envolvidos na infecção por este agente etiológico (PAPPAS, 2013; MORANOVA, KAWAMOTO, RACLAVSKY, 2009).

Em contraste, *C. gattii* é um patógeno primário, com ampla distribuição geográfica, isolado de árvores, solo, ar e água de áreas endêmicas e regiões de surto emergentes, capaz de afetar pessoas imunocompetentes e sua infecção muitas vezes é fatal se não tratada (BYRNES, 2011; HAGEN et al., 2013; MCFADDEN, ZARAGOZA e CASADEVALL, 2006).

A primeira descrição da criptococose ocorreu em 1861, porém, devido a dificuldades na evidência da cultura do microrganismo, sua validação era questionável. Em 1894, Otto Busse e Abraham Buschke observaram corpúsculos ovais obtidos de uma lesão de sarcoma de tíbia, e a patogenicidade deste microrganismo foi confirmada após a reinoculação do mesmo na pele de outro indivíduo, que morreu em decorrência da disseminação fúngica. Ainda no mesmo ano, na Itália, Francesco Sanfelice isolou uma levedura encapsulada em um suco de pêssogo, e o nomeou como *Saccharomyces neoformans* (MITCHEL; PERFECT 1995; SANFELICE, 1984; BUSSE, 1984).

Sua nomenclatura sofreu modificações ao longo do tempo. Torulose, blastomicose européia, doença de Buschke e meningite já foram utilizadas. Os agentes etiológicos por sua vez também receberam diversos nomes como, *Saccharomyces neoformans*, *Blastomyces neoformans*, *Cryptococcus hominis* e *Torula histolytica*. A etimologia da palavra *Cryptococcus*, é oriunda da palavra grega "Kryptos", que significa escondido, misterioso, secreto e obscuro (MITCHEL; PERFECT 1995).

Os focos de contaminação da criptococose indicam que a levedura está presente no solo, ninho e excretas de pombos. Uma vez que a temperatura de crescimento do *Cryptococcus* é em torno de 28°C, estudos apontam que os pombos não apresentam manifestações clínicas pelo fato de sua alta temperatura corporal (entre 40 e 42°C), porém são os principais propagadores da doença. Estima-se que a cada grama de fezes de pombos possa haver em torno de 107 células fúngicas (SILVA e GAGLIANI, 2014).

A relação de *C. neoformans* com imunossupressão tornou-se evidente a partir da década de 1950, com o advento de terapia com corticosteróides e citostáticos para o tratamento de doenças hematológicas malignas e transplante de órgãos. A partir de 1981 com o surgimento da AIDS a incidência de infecções fúngicas aumentou significativamente e na atualidade esta síndrome é considerada o principal fator de risco para criptococose. Esta micose constitui a infecção fúngica mais frequente no sistema nervoso central (SNC) (PERFECT e CASADEVALL, 2002).

1.2 Epidemiologia

Atualmente o gênero *Cryptococcus* é classificado em cinco sorotipos: A, B, C, D e AD, de acordo com suas reações de aglutinação capsular. Os sorotipos A, D e o híbrido AD pertencem à espécie *C. neoformans*, e as cepas com sorotipos B e C são classificadas como *C. gattii*. O sorotipo A foi nomeado como *C. neoformans* var. *grubii*, e o sorotipo D é classificado em *C. neoformans* var. *neoformans*. Além das reações capsulares, cada uma das duas espécies compreende ainda quatro tipos moleculares: *C. neoformans* (VNI, VNII, VNIII, VNIV), e *C. gattii* (VGI, VGII, VGIII, VGIV) (OLIVEIRA et al., 2015).

Mundialmente, dentre todos os sorotipos do *Cryptococcus*, o sorotipo A é o mais comum nos isolados clínicos, sendo identificado em até 90% dos casos, seguido pelos sorotipos B e AD, respectivamente. Os sorotipos D e C possuem menos relatos, agentes

considerados menos patogênicos. Em diferentes partes do planeta a incidência dos sorotipos D e C tende a variar, na África Central e leste asiático a ocorrência de casos é relatada em torno de 20%, na Europa Central e Estados Unidos a incidência é de 5 a 10% (SILVA e GAGLIANI, 2014; LITVINTSEVA et al., 2005; RANDHAWA et al., 2008; RIBEIRO e NGAMSKULRUNGROJ, 2008; BARONI et al., 2006).

Em regiões economicamente menos desenvolvidas a meningite criptocócica infecta grande número de indivíduos, como África Subsaariana e sudeste da Ásia, uma vez que estas regiões têm a maior população infectada pela AIDS e acesso limitado à terapia antiretroviral. Ainda se tratando da região da África Subsaariana, a estimativa é que ocorram anualmente 720.000 casos, seguida pelo sul e sudeste da Ásia, com 120.000 casos/ano e América Latina com 54.400 casos/ano. Na América do Norte a estimativa aponta um encargo anual de 7.800 casos, enquanto Europa Ocidental e Central e Oceania foram calculadas com as menores incidências da infecção, com 500 e 100 casos/ano, respectivamente (DEAK e PARK, 2011).

O Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos relata que mundialmente um milhão de novos casos de criptococose surge por ano em pacientes infectados pela AIDS (DEL POETA & CASADEVALL, 2012). A população mais acometida pela criptococose está incluída na faixa etária economicamente mais produtiva (30 a 50 anos) e no gênero masculino, fato que pode estar relacionado à influência de estrógenos ou a exposições ocupacionais (MORA et al., 2012; SHAH, PATEL e VEGAD, 2011; MCMULLAN et al., 2012).

Um estudo de vigilância ativa em quatro áreas dos Estados Unidos mostrou que a incidência de criptococose em indivíduos não infectados pelo HIV, varia de 0,2 a 0,8 casos em 100.000 habitantes, dependendo da região geográfica, e os índices de morbidade e letalidade da doença ainda permanecem elevados, mesmo com o surgimento de abordagens terapêuticas diversas (HAJJEH et al., 1999; PAPPAS, 2013; TSENG et al., 2013).

O perfil epidemiológico do gênero *Cryptococcus* no Brasil foi avaliado em um trabalho envolvendo 467 isolados clínicos e ambientais das cinco regiões do país. De acordo com a classificação, o sorotipo A foi o mais incidente, com 77,95% dos isolados, seguido do sorotipo B (18,2%), sorotipo AD (1,3%), sorotipo D (0,4%), sorotipo C (0,2%) e não tipificáveis (1,93%). Nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, prevaleceram o sorotipo A, enquanto nas regiões norte e nordeste foram predominantes o sorotipo B (NISHIKAWA et al., 2002).

Na região sul, Mezzari e colaboradores (2013), analisaram 42 prontuários de pacientes com criptococose, onde o gênero masculino foi o mais acometido (55%), em sua

maioria brancos (85%), entre 30 e 49 anos, e o principal fator de imunossupressão associado à criptococose era AIDS.

Em Uberaba, MG, região sudeste, Mora et al., (2012), revisaram registros médicos e laboratoriais de pacientes com criptococose de 1998 a 2012. No total, 131 casos foram analisados, 90,8% tinham AIDS, 69,4% homens e 78,6% possuíam meningite criptocócica. Em relação aos isolados clínicos, 95,0% correspondiam a *C. neoformans* e apenas 4,8% a *C. gattii*. Moreira e colaboradores (2006) na cidade de Uberlândia, avaliaram 96 pacientes no período de 1998 a 2003, com diagnóstico clínico e laboratorial de criptococose, sendo 81,3% portadores de AIDS. A pesquisa direta do fungo juntamente a cultura demonstrou a presença do microrganismo em 98,3% e 100% das amostras, respectivamente, sendo provenientes do líquido, sangue, secreção brônquica, medula óssea e lesão cutânea. Ainda na região sudeste, Teodoro e colaboradores (2013) determinaram o percentual de espécies isoladas em fezes de pombos, provenientes de nove lugares distintos na cidade de Araraquara, São Paulo. Como resultados, foram identificadas as seguintes espécies: *Cryptococcus neoformans* (17,2%), *Cryptococcus gattii* (5,2%), *Cryptococcus ater* (3,5%), *Cryptococcus laurentii* (1,7%), e *Cryptococcus luteolus* (1,7%). Entretanto, 70,7% dos isolados não foram identificados em nível de espécie e foram referidos apenas como *Cryptococcus spp.*

Dados da região centro-oeste, em Mato Grosso do Sul, mostram o perfil clínico epidemiológico retrospectivo de 123 casos de criptococose de 1995 a 2005. Segundo Lindenberg e colaboradores (2008), em acordo com outros trabalhos, o principal fator de risco para a infecção era associado ao HIV (84,9%), e o gênero masculino foi predominante (68,3%). O envolvimento do SNC ocorreu em 83,7% (103) dos pacientes, e os sintomas mais frequentes foram cefaléia e vômitos. A espécie *C. neoformans* foi identificada na maioria dos casos (89,6%), enquanto *C. gattii* foi responsável por apenas 10,4% das infecções.

MASCARENHAS-BATISTA, SOUZA e SACRAMENTO (2013) fizeram uma análise do perfil clínico-epidemiológico de 50 pacientes com meningoencefalite criptocócica em Salvador, região Nordeste e os resultados mostraram que 70% dos pacientes eram masculinos, 52% tinham sorologia positiva para HIV, e a taxa de letalidade foi de 22%.

1.3 Agentes etiológicos e patologia da criptococose

Inicialmente o gênero *Cryptococcus* era composto por aproximadamente 30 membros, distribuídos mundialmente na natureza. Entretanto, trabalhos recentes relatam que aproximadamente 100 espécies já fazem parte deste gênero. As predominantemente responsáveis por desencadear a criptococose em homens e animais são *C. neoformans* e *C. gattii* (PAZ RODRIGUES, 2014; TEODORO et al., 2013; CANÓNICO-GONZÁLEZ, et al., 2013; LEITE JR et al., 2012; CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006).

A criptococose ocorre após a inalação de propágulos em forma de leveduras dessecadas ou basidiósporos presentes no meio ambiente, liberados por espécies que atualmente compõem o complexo *Cryptococcus*. Logo depois, *Cryptococcus* coloniza o sistema respiratório sem apresentar dano. No entanto, por razões desconhecidas ele pode desencadear um processo infeccioso, que é detectado por macrófagos alveolares, dando início assim a uma reação inflamatória granulomatosa com a participação de linfócitos T CD4+ na liberação de citocinas. (WOZNIAK; YOUNG; WORMLEY, 2011; KWON-CHUNG; VARMA 2006; FONSECA et al., 2010).

C. neoformans e *C. gattii* apresentam-se como leveduras globosas ou ovaladas, com 3 a 8µm de diâmetro, brotamento único ou múltiplo, de colo estreito, e envolvidas por uma cápsula mucopolissacáride. Normalmente se apresentam como colônias de cor branca a creme, brilhante, de textura mucóide, margem lisa e inteira após três dias à temperatura de 25 a 37°C, em cultivo nos meios como ágar sabouraud glicose 2% e ágar extrato de malte e levedura. As cepas mais brilhantes macroscopicamente são correlacionadas com maior quantidade e tamanho de cápsula mucopolissacarídica, e geralmente são cepas mais virulentas (MORETTI et al., 2008; JAIN e FRIES, 2008). Os dois agentes etiológicos apresentam numerosas diferenças entre si, como, distribuição geográfica, nicho ecológico, epidemiologia, patobiologia, características clínicas, moleculares, virulência, e genética populacional (KAOCHAROEN et al., 2013; HAGEN et al., 2013; BYRNES et al., 2009; COGLIATI, 2013).

O SNC e o trato respiratório são os órgãos mais comumente envolvidos nas infecções causadas por *C. neoformans* e *C. gattii*. Há evidências de que esse tropismo pelo SNC pode ser explicado pela capacidade das leveduras de converter catecolaminas em melanina, um polímero pigmentado que protege as células fúngicas da fagocitose, da ação microbicida dos leucócitos, do estresse oxidativo e fármacos, através da formação de intermediários tóxicos

para as células hospedeiras. Outra possível explicação seria a baixa concentração de proteínas do sistema complemento no SNC, desfavorecendo o processo de opsonização e fagocitose das leveduras, processo este que é essencial para controlar a doença (MITCHELL; PERFECT, 1995; CASADEVALL, ROSAS e NOSANCHUK, 2000).

A invasão do SNC apresentada por *Cryptococcus* pode ser derivada de três processos principais, no qual a barreira hematoencefálica é atravessada. No primeiro, denominado modelo de transmigração transcelular, o fungo por si só atinge a corrente sanguínea, interage e atravessa as células endoteliais microvasculares cerebrais, mecanismo que induz a reorganização de estruturas celulares do hospedeiro. O segundo mecanismo é denominado “cavalo de Tróia”, onde *C. neoformans* é internalizado por células fagocíticas (monócitos e macrófagos) circulantes, e as mesmas atravessam a barreira hematoencefálica e atingem o SNC. Após ser internalizado, *C. neoformans* causa danos teciduais mínimos, e pode escapar ileso do ataque de células fagocíticas por um mecanismo de extrusão fagossomal e a partir deste ponto ser hábil em invadir outros fagócitos. Por fim existe ainda o processo denominado transferência lateral, onde fagócitos infectados transferem a levedura para o interior de células endoteliais dos capilares da barreira hematoencefálica (MA e MAY, 2009; LIU; PERLIN; XUE, 2012).

A associação entre o genótipo e a clínica da criptococose é capaz de demonstrar o efeito do potencial de virulência sobre a gravidade da doença. Genótipos associados à alta mortalidade do paciente apresentam cápsula maior, produção de melanina e uma resposta de citocinas com tendência ao perfil Th2 (WIESNER et al., 2012).

C. gattii parece ser pouco eficiente para atravessar a barreira hematoencefálica, e raramente causa infecções nas meninges e SNC (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012; GEORGI et al., 2009). Já o *C. neoformans* é o causador mais comum de infecção, ocorrendo em aproximadamente 80% dos casos em pacientes infectados com HIV ou imunocomprometidos, que possui predileção para invadir o SNC, causando meningoencefalite (YAUCH et al., 2004).

C. neoformans possui características que o diferem do *C. gattii*, incluindo um contraste entre o perfil do hospedeiro que reduz sua sensibilidade a certos agentes antifúngicos, o que pode desencadear um tratamento mais lento. Inicialmente *C. gattii* era relacionado geograficamente aos climas tropical e subtropical, mas ele pode ser encontrado mundialmente, inclusive em regiões de clima não tropical (KLEIN et al., 2009). Atualmente é encontrado em áreas de países temperados, demonstrando que o fungo pode se adaptar a

ambientes novos e não conhecidos (SPRINGER; CHATURDEVI, 2010; NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012; BYRNES, 2011).

Nos últimos anos, a incidência de infecções oportunistas causadas por outras espécies, como *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus albidus* tem aumentado, e juntas, são responsáveis por 80% dos casos de criptococose não-*neoformans* e não-*gattii*. Outras espécies anteriormente consideradas saprófitas e de pouca importância médica como, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus humicolus* e *Cryptococcus euniguttulatus* atualmente já estão sendo correlacionadas a doença (LEE et al., 2004; SALUJA e PRASAD, 2007).

Cryptococcus laurentii é frequentemente estudado pelo seu potencial no controle biológico e inibição das podridões de frutos, devido sua forte atividade antagonista contra patógenos de pós-colheita de maçãs, peras, pêssegos, entre outros. Entretanto, apesar de seus benefícios, *C. laurentii* já é correlacionado como responsável por causar infecções em seres humanos. (ZHANG et al., 2004; BLUM et al., 2004).

No trabalho de Shankar et al., (2006), um caso de criptococose pulmonar foi descrito, e seu agente etiológico era *C. laurentii* que infectou um paciente diabético, portador do HIV e em tratamento antituberculose e antiretroviral. Outra ocorrência foi publicada por Cheng et al., (2001) que descreveram um episódio de fungemia por *Cryptococcus laurentii* em um neonato prematuro. Dentre vários fatores que predis põe a infecção, as condições imunes do hospedeiro podem ser citadas. Neste último caso, o uso de cateter intravascular, alimentação parenteral, peso extremamente baixo, nutrição pobre, má absorção entérica e a defesa microbiana insuficiente foram fatores importantes para que a doença pudesse se estabelecer. *Cryptococcus albidus*, apesar de saprófito, vem sendo descrito como patógeno emergente, e desenvolveu um quadro de encefalite em paciente HIV positivo, quadro que levou o mesmo a óbito três dias após o diagnóstico (LIU et al., 2014).

O hospedeiro constitui um microambiente importante para a adaptação de *C. neoformans* e *C. gatti*, que sofrem mudanças fenotípicas constantemente, se tornando desta forma patógenos de sucesso e causa de doença persistente. A principal mudança fenotípica de *Cryptococcus* é a alteração de sua cápsula polissacarídica que aumenta sua virulência, modifica o resultado da infecção e causa uma resposta inflamatória diferente no hospedeiro, alterando por fim a terapêutica antifúngica (XIE et al., 2012).

Grande parte do diagnóstico de *Cryptococcus*, não é realizado em nível de espécie, sendo então indistinguível qual agente etiológico foi causador da infecção. Além de ambos serem intimamente relacionados em sua identificação, os métodos e reagentes necessários não estão prontamente disponíveis. Desta forma, informações clínicas e epidemiológicas sobre *C.*

gattii vem tanto dos estudos ambientais, que são parciais e distantes entre si ou de avaliação retrospectiva de isolados clínicos de *C. neoformans* / *C. gattii*. As verdadeiras incidências e características deste agente em ensaios envolvendo homens ou animais não são descritas, uma vez que estudos envolvendo o gênero *Cryptococcus*, são altamente voltados para a espécie *C. neoformans*. (MCDUGALL et al., 2011; SPRINGER e CHATURDEVI, 2010).

O emprego de um método que utiliza ágar CGB (L-canavanina glicina bromotimol) é de baixo custo e complexidade, podendo ser facilmente incorporado no fluxo de trabalho clínico de laboratórios de qualquer tamanho. *C. gattii* cresce na presença de L-canavanina e utiliza glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, o que aumenta o pH do meio e provoca a mudança do indicador azul no meio, caracterizando resultado positivo, ao contrário do *C. neoformans* que não cresce na presença de canavanina e não utiliza glicina, desta forma a cor do meio permanece inalterada e o resultado é considerado negativo (KLEIN et al., 2009).

1.4 Manifestações clínicas

Na maioria dos casos os sinais e sintomas estão geralmente presentes por diversas semanas e incluem cefaléia, febre, rigidez de nuca e pescoço, náuseas, vômito e sinais de irritação meníngea, neuropatia craniana, perda de memória, e podem evoluir para o coma (SEVERO, GAZZONI e SEVERO, 2009; THOMPSON, 2005).

A forma disseminada da criptococose pode afetar locais variados, como adrenais, rins, linfonodos de mediastino, pele, ossos, olho, trato urinário, sangue, miocárdio, endocárdio, tireóide, testículo, hipófise, entre outros, e geralmente o paciente inicia seu quadro clínico com febre indeterminada (MORETTI et al., 2008).

Manifestações oculares podem ser encontradas após a instalação e propagação do fungo, e em grande parte são um quadro clínico da doença quando atinge o SNC ou se dissemina para outros locais, porém pode ocorrer o acometimento isolado apenas do globo ocular. Nesses casos o segmento posterior do olho é afetado, onde coriorretinite é a lesão predominante e pode vir acompanhada de diplopia, coroidite, retinite, papilite, atrofia óptica e neurite óptica e por fim pode ocorrer a perda da visão (MORETTI et al., 2008).

O trato geniturinário também pode ser acometido por *Cryptococcus*, embora este acontecimento seja raro. Os achados clínicos incluem pielonefrite, prostatite, orquite e

epididimite. A sintomatologia pode se apresentar como disúria, urgência miccional, hematúria, sintomas de obstrução vesical, retenção urinária, desconforto retal e dor lombosacra (MORETTI et al., 2008).

A criptococose do SNC é incomum em pessoas sem imunossupressão, mas causa uma mortalidade significativa e morbidade de longo prazo. Em um estudo realizado por Ecevit et al., (2006), nove pacientes eram imunocompetentes, entretanto desenvolveram neurocriptococose por *C. gattii* e *C. neoformans* var. *grubii*, e apresentaram entre os sintomas: fraqueza, anorexia, perda auditiva, fotofobia, paralisia do nervo craniano, ataxia, letargia, náusea e vômitos, tonturas e visão borrada.

Em casos de infecção hepática as manifestações clínicas incluem entre outros, necrose, hepatite, microabscessos hepáticos, colangite, colecistite e dor abdominal aguda (LIU, YANG e SHI, 2009).

Indivíduos em fase avançada de AIDS, apresentam contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 100 células/ μ L, onde o comportamento da criptococose é denominado crítico e sua evolução é mais agressiva. Através desta redução pode ocorrer o envolvimento do SNC em 65-94% dos doentes com criptococose pulmonar associada ao HIV. A contagem baixa de linfócitos T CD4+ é acompanhada de aumento nos títulos de antígeno polissacarídico no líquido, e pacientes com este perfil tem prognóstico desfavorável. Entretanto, quando o paciente possui contagem de linfócitos T CD4+ maior que 200 células/ μ L por um período superior a seis meses e restabelece suas funções imunes, o tratamento antifúngico deve ser interrompido. (OSAZUWA et al., 2012; KISENGE et al., 2007; RIBEIRO, et al. 2009; COSTA, 2010).

Casos graves de meningite criptocócica são associados com mal-estar, dores generalizadas, rigidez do pescoço, estado mental alterado e elevação da pressão intracraniana (maior que 20 cm de H₂O). Este último é responsável por muitos dos sinais, sintomas e mortalidade associados à doença, e ocorre como resultado de inibição na reabsorção do LCR, devido a uma abundância de organismos e polissacarídeo capsular. Outras manifestações podem incluir convulsões, confusão ou incapacidade de tolerar ruídos altos (LIU, PERLIN e XUE, 2012; DEAK; PARK, 2011).

1.5 Diagnóstico laboratorial

Por uma infinidade de fatores, como tropismo neurológico, excesso de elementos fúngicos no líquido e lesões, presença evidente de cápsula polissacarídica, diagnóstico imunológico e coloração tecidual específica, a criptococose tornou-se uma das micoses de diagnóstico mais fácil na atualidade (MORETTI et al., 2008).

O exame direto revela leveduras ovais ou arredondadas, com brotamento único ou múltiplo, envoltas por cápsula polissacarídica, altamente evidente quando a amostra é preparada com tinta da China ou nigrosina (SAHA, XESS e JAIN, 2008).

A cultura é o exame que comprova a presença do *Cryptococcus*, que cresce facilmente no ágar sabouraud a 25°C ou ágar infusão de cérebro-coração a 35°C, e adquire macroscopicamente coloração creme, forma colônias lisas e mucóides e pode ser feita a partir de uma variedade de materiais clínicos como, escarro, lavado broncoalveolar, sangue, urina, amostras do trato respiratório, fragmentos de tecido e LCR. Microscopicamente as leveduras possuem formas regulares, globosas, arredondadas, encapsuladas, com presença ou ausência de brotamento e sem hifas ou pseudo-hifas. As colônias formadas tornam-se tipicamente visíveis com 2 a 5 dias, e no LCR a positividade da cultura é de aproximadamente 89% em pacientes HIV negativos, e 95-100% nos pacientes com AIDS. As espécies de *Cryptococcus* são diferenciadas por uma reação de cor quando cultivadas em ágar CGB (GAZZONI et al., 2009; CONTIN et al., 2011; CARLOS; HAGE, 2012; LINDSLEY et al., 2011).

O teste de aglutinação em látex para detecção do antígeno polissacarídico capsular criptocócico no soro e LCR foi estabelecido como um método rápido para o diagnóstico de infecção por *C. neoformans*, cuja sensibilidade e especificidade são cerca de 98% e 99%, respectivamente. Mas ele ainda sofre com certas limitações de resultados errôneos. Por exemplo, a presença de tumor maligno, sarcoidose, lúpus eritematoso sistêmico, fator reumatóide, infecção com *Trichosporon beigelii* e HIV pode causar reações falso-positivas. Por outro lado, o efeito prozona, fenômeno causado pela alta concentração de antígeno criptocócico pode levar ao mascaramento causado por proteínas não específicas desconhecidas *in vivo*. (XU et al., 2012).

Técnicas gênicas aplicadas na detecção de sequências nucleotídicas específicas de *C. neoformans* e *C. gattii* estão sendo utilizadas no diagnóstico, porém, ainda há restrições para o uso no diagnóstico de rotina, quanto ao custo dos equipamentos, reagentes e complexidade nos procedimentos, quando em comparação com os testes microbiológicos convencionais. O

método de PCR oferece uma alternativa excelente no diagnóstico inicial de criptococose por ser rápido, detectar o fungo em pequena quantidade de amostra, além de ser altamente sensível e específico (SAHA et al., 2009; SILVA et al., 2012; SANTOS et al., 2008; GALANIS et al., 2009).

A utilização de técnicas histoquímicas básicas como hematoxilina-eosina (HE) e coloração pela prata (GMS), bem como as especiais de mucicarmim de Mayer (MM) e Fontana-Masson (FM), são métodos úteis para diferenciar *C. neoformans* de outros fungos. O primeiro mancha a cápsula de vermelho, mostrando uma célula encapsulada considerável, entre 3-8 microns com brotamento unilateral ou multipolar, enquanto o segundo pode ser utilizado para evidenciar a parede celular do fungo por reagir com pigmentos de melanina, pois cora a parede celular de preto sobre um fundo verde-claro. A técnica de FM cora os fungos de marrom-avermelhado (GAZZONI, PEGAS e SEVERO, 2008; GAZZONI et al., 2009; ARTAL, 2004; SEVERO, GAZZONI e SEVERO, 2009).

A maioria das espécies do gênero *Cryptococcus* não é fermentadora de carboidratos, mas por metabolismo de oxidação assimila glicose, maltose, sacarose e galactose e sendo negativo para lactose. Ao contrário de *C. neoformans*, as outras espécies do gênero não assimilam nitrato de potássio como única fonte de nitrogênio inorgânico e não sofre redução a nitrito. O teste de produção de urease também é empregado na diferenciação do *Cryptococcus*, pois o mesmo possui a capacidade de hidrólise da uréia, através da produção da enzima urease, formando amônia e gás carbônico (SILVA e GAGLIANI, 2014; MITCHEL; PERFECT, 1995; IKEDA et al., 2012).

1.6 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica do *Cryptococcus* e sua arquitetura são tópicos muito estudados atualmente. Possuindo extensões apicais ou rearranjos, essa cápsula é constituída por 90% de glucuronoxilomanana (GXM), 7% galactoxilomanana (GalXM) e 3% de manoproteínas (MP), podendo ser secretados no meio em que o fungo se encontra (MITCHELL; PERFECT, 1995). Com o auxílio de anticorpos monoclonais, Jesus et al., (2010) demonstraram claramente a localização celular simultânea desses três componentes, que ocupam espacialmente regiões separadas e distintas. Esses resultados podem fornecer um forte apoio para a concepção de que GalXM e as MP são, provavelmente materiais

transportados para o espaço extracelular, enquanto apenas GXM é parte integrante do componente capsular, sendo desta forma o componente mais abundante e extensivamente estudado.

Há pesquisas demonstrando que a cápsula é sintetizada intracelularmente, mais especificamente no aparato do complexo de Golgi, envolvendo vesículas secretórias. O tratamento do *C. neoformans* com brefeldina A, um inibidor do transporte de moléculas derivado do complexo Golgi resulta em uma inibição significativa da formação da cápsula, fornecendo evidências de que o polissacarídeo capsular é sintetizado nestas mesmas vesículas (HU et al., 2007).

As variações do tamanho capsular são notáveis, e fatores ambientais ou provenientes do hospedeiro influenciam de forma seletiva para a presença, ausência e dimensão da cápsula (ZARAGOZA et al., 2009). A formação de fibras extracelulares, ligadas à cápsula intacta é outra característica importante para conferir maior patogenicidade ao *Cryptococcus*. Em um modelo de criptococose murina utilizado por Springer e colaboradores (2010), cepas de *C. gattii* que possuíam a formação externa das mesmas, foram mais virulentas e apresentaram maior resistência a morte por células polimorfonucleares.

O maior fator de virulência do *C. neoformans* é a cápsula, composta principalmente do polissacarídeo GXM. Este componente de superfície mais externo é um polissacarídeo de grande potencial imunomodulador que parece ser fundamental na proteção desses fungos contra as defesas do hospedeiro. Além de ter um papel estrutural importante quando associada à superfície celular, a GXM também é secretada para o meio extracelular em grandes quantidades durante a criptococose, sendo facilmente encontrada no sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) e tecidos infectados (VOELZ e MAY, 2010). Este antígeno capsular possui numerosas propriedades imunomodulatórias, incluindo inibição da fagocitose, inibição da migração leucocitária, alteração na produção de citocinas, inibição da atividade anticriptocócica de neutrófilos, indução da apoptose em macrófagos, dentre outros (CHIAPELLO et al., 2008).

O tamanho e diâmetro da cápsula são alguns dos fatores que podem potencialmente influenciar a resposta inflamatória contra o *Cryptococcus*, e extensões maiores, contribuem para as diferenças na inflamação granulomatosa entre diversas espécies (FONSECA et al., 2010).

Na tentativa de conter a infecção, células da imunidade inata como monócitos, macrófagos e neutrófilos, são importantes na defesa durante a criptococose, e a GXM por sua vez, é processada de formas diferentes por estas células. Os monócitos fornecem um

reservatório de longa duração para a GXM, acúmulo intracelular que pode ser observado no período de até sete dias após a fagocitose. Antagonicamente, os neutrófilos após a ingestão limitaram as quantidades de GXM, e o processo de degradação e expulsão ocorreu rapidamente, a partir de uma hora de incubação (MONARI et al., 2003).

C. neoformans é um fungo que possui mecanismos próprios responsáveis por burlar as defesas do hospedeiro e conferir ao fungo um aumento na sua virulência. Dentro deste contexto, principalmente estão à capacidade de modificar o tamanho e estrutura capsular, fatores que o tornam altamente versátil. A princípio, acredita-se que a cápsula é a primeira parte dos fungos que interage com células hospedeiras (ZARAGOZA et al., 2009).

1.7 Resposta imune ao *Cryptococcus*

A linha principal na contenção da criptococose é a imunidade inata, representada primeiramente por barreiras físicas na forma de pele, membranas e mucosas do trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário, que são complementadas por anticorpos, estes últimos ainda em análise sobre sua eficácia (BLANCO e GARCIA, 2008).

Logo após a exposição ao microrganismo, os mecanismos naturais de defesa celular são o principal meio pelo qual o patógeno é eliminado a partir do hospedeiro. Em modelos de criptococose que utilizam ratos, na infecção instalada após 1 a 2 semanas, criptococos são eliminados a partir de tecidos compostos predominantemente por imunidade mediada por células (IMC) (WOZNIAK, YOUNG e WORMLEY, 2011).

C. neoformans é conhecido por ser um patógeno intracelular do hospedeiro. Essa localização promove um escape dos mecanismos imunes, por exemplo, sistema complemento e anticorpos, e também é capaz de reduzir a exposição a agentes antifúngicos, dificultando o tratamento. Dado o papel crucial da cápsula na virulência, consideráveis esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de anticorpos e vacinas que têm como alvo esta estrutura (VOELZ e MAY, 2010; MORA et al., 2015; TUCKER; CASADEVALL, 2002).

Duas abordagens gerais têm sido adotadas. Em primeiro lugar, muitos anticorpos monoclonais foram desenvolvidos com o objetivo de atingir componentes capsulares, como uma imunização passiva. Estudos com estas moléculas têm demonstrado que a função de anticorpos contra *C. neoformans* é extremamente complexa, na medida em que algumas imunoglobulinas conferem proteção, resultando na melhora da doença, enquanto outras são

altamente ineficazes. Numa segunda abordagem, tem sido proposta a utilização de polissacarídeos capsulares, ou estruturas miméticas à vacina, conferindo proteção prévia (ZARAGOZA et al., 2009; ZHANG; ZHONG; PIROFSKI, 1997; VECCHIARELLI, 2005).

Acredita-se que a inalação é a via principal de propagação do *C. neoformans*, causando inicialmente uma infecção pulmonar. Outro dado que pode elucidar o contato inicial do fungo com o hospedeiro, é o fato do *C. neoformans* crescer de forma mais eficiente na temperatura de 25°C a 30°C, mostrando que temperaturas mais baixas, como na passagem nasal, podem ser vantajosas para o crescimento fúngico (SCHOP, 2007).

Um dos locais de predileção para a criptococose é a infecção pulmonar, e através deste dado, Barbosa e colaboradores (2007) realizaram um estudo com uma linhagem de células alveolares humanas (A549), demonstrando a ligação do *C. neoformans* a estas por meio do receptor CD14, o que resultou na produção de CXCL8. Já a ligação de GXM a macrófagos murinos parece envolver diferentes ligantes, como, por exemplo: CD14, CD18, e Fc γ RII além de TLR2 e TLR4. O acúmulo da GXM no interior de macrófagos foi criticamente dependente da função do citoesqueleto, onde inibidores de tirosina-quinase, proteína-quinase C e fosfolipase C foram capazes de bloquear a mesma, porém os inibidores de fosfatidil-inositol 3-quinase não executaram o mesmo efeito, sugerindo que a interação entre esses fatores de virulência são essenciais e a ligação aos sítios celulares é primordial para a resistência do hospedeiro (CHANG et al., 2006).

O *Cryptococcus* possui a habilidade de sobreviver e se replicar intra e extracelularmente, desta maneira ativando de formas divergentes o sistema imune. Em pacientes com comprometimento imunológico, o fungo cresce intracelularmente, realizando a lise do macrófago (reativação de disseminação) liberando o microrganismo e infectando outras células fagocitárias, aumentando conseqüentemente sua carga. Extracelularmente o *Cryptococcus* também se prolifera, pois produz fatores específicos que bloqueiam sua adesão e internalização pelas células, incapacitando o reconhecimento e desenvolvimento da resposta protetora (DEL POETA, 2004; FELDMESSER et al., 2000; ALVAREZ et al., 2009; CALVERLEY; HARMSEN, 2013).

Leucócitos polimorfonucleares (PMN) são considerados como um dos componentes naturais do hospedeiro nas defesas celulares, e pode auxiliar na remoção precoce de *C. neoformans*. Essas células são as primeiras que se infiltram na reação de IMC anticriptococócica, e migram para o local da infecção, independentemente do fato de sua ação ser direta ou indireta (DONG; MURPHY, 1995; ELLERBROEK, 2004).

A natureza da resposta imune na criptococose é altamente influenciada pela secreção de citocinas e quimiocinas produzidas, influenciando o desenvolvimento da doença ou a eliminação do microrganismo. O modelo Th1/Th2 de diferenciação de linfócitos T helper CD4+ é importante para o conhecimento da resposta imune na patogênese ou proteção do hospedeiro diante de um fungo, e sua divisão em grupos varia conforme a função e padrões diferenciais de produção de moléculas. Em modelos de criptococose animal, a secreção de citocinas Th1, tais como TNF- α , IFN- γ e IL-2, é clinicamente associada ao aumento da expulsão de *Cryptococcus*. Camundongos com criptococose ativa, nocautes para a produção de IFN- γ mostram aumento da carga fúngica, perda da fungistasia pulmonar, eosinofilia, ativação alternativa de macrófagos com número maior de fungos intracelularmente, demonstrando que a falta de IFN- γ leva a uma infecção crônica para uma infecção criptocócica pulmonar progressiva (JAIN et al., 2009; ARORA et al., 2005).

Por outro lado, o perfil de citocinas Th2, com secreção de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 13 (IL-13) é responsável por inibir a eliminação fúngica e favorece sua disseminação para o SNC dentro de macrófagos parasitados. Assim, a supressão de expulsão criptocócica por um perfil de citocinas Th2 dominante pode beneficiar o patógeno e reduzir a probabilidade do hospedeiro de sobreviver a esta mesma infecção. Desta maneira a sinalização de citocinas de perfil Th1 opera em pelo menos dois modos, em primeiro lugar, afetando a proliferação intracelular do fungo e, em segundo lugar, aumentando a probabilidade de expulsão do patógeno (VOELZ, LAMMAS e MAY, 2009; MOSMANN et al., 1986).

A infecção pulmonar de ratos com uma cepa de *C. neoformans* produtora de IFN- γ (H99- γ), resultou na depuração do criptococo e resolução da inflamação de forma rápida após uma segunda inoculação, enquanto ratos selvagens infectados com *C. neoformans* mostraram doença exacerbada e inflamação. Em um modelo experimental de infecção criptocócica, a resistência estava associada com a indução de respostas tipo Th1, aumento da infiltração de linfócitos e ativação clássica de macrófagos. Em contraste, respostas não protetoras são acompanhadas por citocinas tipo Th2 e ativação alternativa de macrófagos, resultando em crescimento fúngico descontrolado, disseminação e exacerbação da doença (HARDISON et al., 2010).

Em resumo, a infecção criptocócica pode alterar as funções pulmonares quando há uma tendência de resposta imune Th2, no entanto, as funções pulmonares permanecem em grande parte afetadas pela resposta imune Th1. Parâmetros imunológicos Th2, como citocinas e eosinofilia pulmonar, não parecem desempenhar um papel direto na alteração de funções

pulmonares. A infecção pulmonar com a cepa de *C. neoformans* produtora de IFN- γ em ratos induz respostas do tipo Th1 e de citocinas IL-17. Os macrófagos ativados classicamente são fungistáticos contra o criptococo e promoveram a resolução da infecção, tornando-se células eficientemente importantes para o controle da infecção durante a criptococose pulmonar (HARDISON et al., 2012).

O estabelecimento de uma resposta imune composta de defesas inatas e imunidade adquirida é necessário para a cura de pacientes com criptococose. O sistema imune inato identifica agentes infecciosos por meio de proteínas de reconhecimento padrão. O hospedeiro, então, tenta eliminar o fungo, ativando assim seus mecanismos de defesa efetora. Neutrófilos, monócitos e macrófagos são as células centrais para este processo. Considerando que a eliminação é realizada através da fagocitose e geração e/ou liberação de substâncias antimicrobianas, a ativação é realizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α . Ambos os processos utilizam uma série de eventos iniciados pela ligação do fungo a superfície da célula e mediada pela sinalização intracelular (SHOHAM et al., 2001).

A infecção de ratos do tipo selvagem com uma cepa de *C. neoformans* altamente virulenta (H99) resultou numa forte resposta Th2. Todas as características de uma resposta deste perfil com todas as consequências moleculares e patológicas foram encontradas, tais como: I- indução forte de IL-4 e IL-13 nos pulmões e nódulos pulmonares, II- ausência ou indução mínima de IL-12p35, III- acumulação de imunoglobulina E no soro, IV- eosinofilia pulmonar e V- ativação alternativa de macrófagos nos pulmões. Estes atributos da resposta Th2 foram acompanhados por expansão logarítmica e descontrolada de *C. neoformans* nos pulmões, com disseminação rápida da cepa H99 para o SNC, patologia cerebral e pulmonar grave. Juntos, esses dados indicam que a expressão de alta virulência é associada com o desenvolvimento de uma resposta Th2 intensa (ZHANG et al., 2009; JAIN et al., 2009; BIONDO et al., 2008).

Além de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo de eliminação do *Cryptococcus*, outros mediadores são produzidos com a mesma finalidade. Dois exemplos bastante abordados incluem o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ERO) por leucócitos humanos, altamente importantes na defesa contra infecções. Macrófagos e neutrófilos após a fagocitose produzem grandes quantidades de ERO e NO, moléculas diretamente dependentes dos níveis de NADPH, e este processo é capaz de provocar a expulsão do *Cryptococcus* e controlar o processo inflamatório. Através de armadilhas extracelulares, os neutrófilos são altamente eficientes para o extermínio do fungo, utilizando métodos associados à síntese de proteínas citosólicas e granulares, como produção de ERO.

Entretanto, *C. gattii* muitas vezes é capaz de burlar estes mecanismos complexos, e através da própria ação de ERO dentro de macrófagos, que facilita o crescimento rápido de células criptocócicas vizinhas e permite o estabelecimento efetivo do patógeno após ser fagocitado (ROCHA et al., 2015; VOELZ et al., 2014).

Um estudo apontou que antifúngicos como anfotericina B, realizam uma forte explosão oxidativa em *C. neoformans*, e isto se deve ao fato desta droga quando oxidada, produzir grandes quantidades de ERO (FERREIRA et al., 2013). Em relação a outros fungos, *C. neoformans* se mostra sensível ao estresse oxidativo, entretanto para sobreviver no hospedeiro e resistir ao ataque pelo sistema imune, ele deve ser eficiente em inibir possíveis danos que possam diminuir sua sobrevivência em macrófagos e atenuar sua virulência (BROWN; CAMPBELL; LODGE, 2007; FANG, 2004; ZARAGOZA et al., 2006).

O IFN- γ é uma citocina que inicia um papel importante na comunicação intercelular durante a resposta inata e adquirida perante as infecções. É o único membro do grupo IFN tipo II, possuindo em seu receptor duas subunidades, IFN- γ R1 e IFN- γ R2. A via de sinalização do IFN- γ é bastante complexa, envolvendo IFN- γ R1, IFN- γ R2, Janus kinase 1 (JAK 1), Janus kinase 2 (JAK 2) e ativadora de transcrição e transdução de sinal 1 (STAT1), como proteínas principais. A partir do N-terminal, cada proteína tem uma região extracelular, uma região transmembranar e uma região intracelular (QU, FISHER-HOCH e McCORMICK, 2011).

A via JAK/STAT tem um papel importante no controle das respostas imunes frente a infecções e neoplasias. Sua regulação está associada à produção de citocinas, fatores de crescimento na hematopoiese, regulação imune, fertilidade, lactação, crescimento e embriogênese. A força de sinalização, cinética e especificidade da via JAK/STAT são modulados em muitos níveis de proteínas reguladoras distintas. (CRITCHLEY-THORNE et al., 2007; FURQAN et al., 2013). A família JAK possui quatro membros: JAK1, JAK2, JAK3 e tirosina-quinase 2, onde cada membro contém um domínio quinase conservado, porém cataliticamente inativo. Por outro lado, são sete as STATs encontradas em mamíferos: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B e STAT6, que são altamente homólogos em várias regiões (CASANOVA; HOLLAND; NOTARANGELO, 2012; NAJJAR; FAGARD, 2012).

A ligação do IFN- γ aos dímeros no domínio extracelular da subunidade do receptor conduz o IFN- γ R1 ao acoplamento da subunidade IFN- γ R2, o que faz com que JAK1 e JAK2 se fosforilem e cruzem-se as subunidades do receptor. Os homodímeros paralelos STAT1 são então recrutados para os receptores, e a sua fosforilação converte os homodímeros numa

configuração antiparalela. Os homodímeros STAT1 reorientados translocam-se para o núcleo, onde se ligam as sequências ativadas gama (GAS), locais nos genes de resposta primária incluindo fator 1 regulador de IFN- γ , que posteriormente ativa um grande número de genes de resposta secundária, e realizam uma série de funções imunomoduladoras. As proteínas SOCS servem como os principais reguladores negativos da via IFN- γ inibindo a fosforilação da JAKs e STAT1. A fosforilação leva a translocação de STAT1 para o núcleo, onde se liga aos sítios de sequência gama ativada sobre os promotores de genes (ZAIDI e MERLINO, 2011).

A deficiência do IFN- γ R1 é desencadeada por mutações no gene IFN- γ R1, sendo caracterizada por uma susceptibilidade a doenças micobacterianas causadas por micobactérias pouco virulentas. Mutações de padrão recessivo ou dominante resultam respectivamente em deficiência parcial ou completa do receptor de IFN- γ (KARACA et al., 2012).

O IFN- γ possui um importante papel no desenvolvimento de células Th1 e na infecção pelo *C. neoformans*, por sua vez, ratos nocaute para produção de IFN- γ com infecção pulmonar experimental apresentaram respostas polarizadas de perfil Th2, diferenciação alternativa de macrófagos e atividade fungistática reduzida, levando à infecção criptocócica progressiva. Além disto, ratos com esta resposta deficiente apresentaram aumento de unidades formadoras de colônia (UFC) e eosinofilia pulmonar (ARORA et al., 2005).

1.8 CXCL10 / IP10

CXCL10 é um polipeptídeo, pertencente à família de quimiocinas CXC, conhecida também como proteína de 10kDa induzida por IFN- γ (IP10), codificada por um gene induzido após tratamento com IFN- γ (KORNIEJEWSKA, WATSON, WARD, 2010; LIU et al., 2011; VARGAS-INCHAUSTEGUI et al., 2010; HARDISON et al., 2012).

É produzida por células dendríticas, natural killer, linfócitos T CD4, linfócitos T CD8, neutrófilos, células β pancreáticas, eosinófilos, células mononucleares, células mesangiais humanas, adipócitos, queratinócitos, células adrenocorticais e fibroblastos de pulmão humano (FUKUI et al., 2013; SING et al., 2008; KLICH et al., 2011; CHRISTENSEN et al., 2006; WONG et al., 2012; WILEY et al., 2001; ROMAGNANI et al., 1999; FABER et al., 2013; BRATLAND, HELLESEN e HUSEBYE, 2013; DONG et al., 2013).

A participação de CXCL10 é descrita em doenças virais (rinovírus, HIV, HCB, vírus sincicial respiratório, vírus influenza), bacterianas (*Helicobacter pylori*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella pneumophila*), fúngicas (*Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *C. neoformans*), ou causadas por protozoários (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparim*, *Plasmodium vivax*, *Leishmania donovani* (LIU et al., 2011; GUPTA et al., 2011; SHIRAKI et al., 2008; CHUNG et al., 2011; ALCAIDE et al., 2008; JAFARZADEH et al., 2013; NOROSE et al., 2011; SUZUKI et al., 2011; LUO et al., 2012).

CXCL10 é uma quimiocina com propriedades biológicas mediadas através da interação com uma proteína G transmembrânica acoplada ao receptor CXCR3 ou de forma independente do receptor CXCR3, por um mecanismo de afinidade de ligação a glicosaminoglicanos (CAMPANELLA, COLVIN e LUSTER, 2010).

As funções biológicas desta molécula indicam que ela é capaz de induzir efeitos biológicos potentes, incluindo a estimulação de monócitos, células NK, linfócitos T, regulação da migração de células T, maturação de células progenitoras de medula óssea, modelação da expressão de moléculas de adesão, inibição da angiogênese, atividade antitumoral, desenvolvimento celular, quimiotaxia entre outros. O papel da CXCL10 foi descoberto em diversas doenças, bacterianas, virais ou fúngicas e alterações no mRNA têm sido associadas com a patogênese das mesmas, incluindo as inflamatórias crônicas e autoimunes, bem como câncer. Sua indução ocorre por um potente ciclo de feedback positivo, onde o aumento de IFN- γ resulta no aumento da produção de CXCL10 (NEVILLE et al., 1997; LUCCHI et al., 2011; ANTONELLI, et al., 2014; SUZUKI et al., 2011).

Atualmente existem poucos relatos sobre o efeito da CXCL10 no controle de infecções fúngicas, especialmente por *Cryptococcus*, entretanto, estudos com protozoários já estão mais elucidados, e podem fornecer informações importantes sobre as funções de CXCL10 em doenças causadas por patógenos intracelulares, similar a criptococose. No caso de *Leishmania amazonensis*, o tratamento com CXCL10 aumenta diretamente a produção de IL-12p40, através do aumento da expressão do receptor IL-12 β 2, IFN- γ e na função de células dendríticas especialistas na apresentação de antígenos, resultando na melhora da infecção. Ainda se tratando do mesmo modelo de infecção, o pré-tratamento de macrófagos murinos com CXCL10 reduziu a carga parasitária nos mesmos, e, além disso, a administração local de IP-10 resultou na produção de citocinas e quimiocinas de perfil Th1 e reduziu o tamanho das lesões, fatores que em conjunto contribuem para o controle parcial da infecção *in vivo*. Além deste fato, a cura de lesões por cepas mais patogênicas de *Leishmania braziliensis* coincide com aumento da produção de IFN- γ e expressão de CXCL10, o que sugere a

participação destas proteínas no controle da infecção (VASQUEZ, XIN e SOONG, 2008; VASQUEZ e SOONG, 2006; TEIXEIRA et al., 2005).

Não somente em patógenos intracelulares atua a CXCL10. Suas ações em neoplasias também vêm sendo descritas, uma vez que as interações entre quimiocinas e receptores são mecanismos dependentes na iniciação e progressão do câncer (BROWNELL; POLYAK, 2013; LUNARDI et al., 2014).

A atividade antitumoral *in vivo* já foi demonstrada no trabalho de Yang et al., (2006), que utilizaram um modelo de tumor experimental de ratos, demonstrando que o crescimento *in vivo* de células de carcinoma mamário que albergavam o gene de CXCL10 foi inibido. Além disso, a cultura de células cancerígenas na presença de CXCL10 não só foi capaz de atrair células T no tecido que continha células malignas, mas também melhorou a proliferação, sobrevivência, atividade citolítica e ativação de linfócitos antitumorais, auxiliando na regressão do tumor.

Diante do exposto, objetivamos investigar em nosso trabalho os efeitos dos antígenos polissacarídeos capsulares (GXM) do *C. neoformans* sobre a resposta e sinalização de células polimorfonucleares e mononucleares humanas frente à estimulação com IFN- γ recombinante.

2 JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma micose cosmopolita que assume papel relevante dentre as infecções fúngicas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. O IFN- γ é um ativador clássico de fagócitos associado à morte de patógenos intracelulares e o estudo dos efeitos da GXM (principal fator de virulência presente na cápsula do *Cryptococcus neoformans*) sobre a regulação da via de sinalização do IFN- γ poderá trazer conhecimentos extremamente úteis sobre os mecanismos de escape do *Cryptococcus*. Logo, a carência desses dados bem como os meios de escape provocados pelo fungo justificou o interesse pela busca das atividades imunoregulatórias da GXM.

3 HIPÓTESE

O antígeno polissacarídico capsular (GXM) de *C. neoformans* é capaz de modular a resposta de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (PBMC) humanas ao IFN- γ recombinante.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do antígeno polissacarídico capsular (GXM) do *C. neoformans* sobre a resposta e sinalização de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (PBMC) humanas estimuladas com IFN- γ recombinante.

4.2 Objetivos específicos

1- Avaliar os efeitos da GXM do *Cryptococcus neoformans* sobre a produção da quimiocina CXCL10 por células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (PBMC) humanas em resposta ao IFN- γ recombinante.

2- Avaliar os efeitos imunoregulatórios da GXM sobre a produção intracelular de CXCL10 em PMNs e PBMCs estimulados com IFN- γ recombinante por citometria de fluxo.

3- Avaliar os efeitos imunoregulatórios da GXM sobre a expressão da cadeia alfa do receptor de IFN- γ (CD119/IFN- γ R1) em PMNs e PBMCs por citometria de fluxo.

4- Avaliar os efeitos da GXM sobre a fosforilação de STAT1 em PBMCs estimulados com IFN- γ recombinante.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Casuística

5.1.1 Voluntários saudáveis

No presente estudo, foram obtidas células mononucleares (PBMC) e polimorfonucleares (PMN) do sangue periférico de dez doadores voluntários saudáveis maiores de 18 anos, com idades variando de 22 a 28 anos (tabela I). As amostras de sangue obtidas foram provenientes de alunos de graduação, pós-graduação e servidores públicos da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Foram coletados 20 mL de sangue venoso periférico de cada indivíduo. Posteriormente foi realizada a dosagem de níveis séricos de proteína C reativa (PCR), no intuito de excluir amostras alteradas possivelmente por processos inflamatórios ou infecciosos. Resultados maiores que 5,0 mg/L foram excluídos das amostras dos doadores.

5.2 Obtenção de células mononucleares (PBMC) e polimorfonucleares (PMN) de sangue periférico

Sangue venoso periférico de doadores voluntários saudáveis foi coletado em tubo contendo heparina (BD Vacutainer[®]) e colocado cuidadosamente sobre uma solução de gradiente descontínuo de densidade. Em cada tubo cônico de 15 mL (BD- Falcon[™], USA), foram adicionados 3,5 mL de Histopaque 1,119 (d=1,119 SIGMA - USA) e sobre ele foi adicionado cuidadosamente 3,5 mL de Ficoll 1,077 (Ficoll-Paque[®] PLUS Medium), juntamente com 7 mL do sangue previamente coletado e o tubo foi centrifugado a 400 g por 35 minutos a 22°C. Após a centrifugação obtiveram-se dois anéis de células visíveis. O primeiro encontrava-se entre o plasma e o Ficoll 1,077 e o outro entre o Ficoll 1,077 e o Histopaque 1,119. O plasma foi retirado cuidadosamente com distância aproximada de 0,5 cm do anel de células mononucleares. Os anéis de células foram coletados com o auxílio de uma

pipeta Pasteur, e foram transferidos separadamente para tubos cônicos de 50 mL (BD-Falcon™, USA). As células foram submetidas a três lavagens consecutivas com solução salina a 0,89%, contendo 1% de soro fetal bovino (SFB) e centrifugadas a 216 g por 10 minutos a 22°C, para retirar o excesso de ficoll. As células foram ressuspensas em 3 mL de RPMI contendo 4,75 g/L de Hepes, 10% de SFB inativado (LGC), 1% de L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina. A quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A pureza da separação realizada de todos os doadores foi superior a 90%. Posteriormente, o teste do azul de tripan determinou a viabilidade celular que também foi superior a 90% em todas as amostras. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar, com exceção da contagem de células.

5.3 Cepas de *Cryptococcus neoformans*

No decorrer deste trabalho foram utilizadas duas cepas encapsuladas de *C. neoformans* sorotipo A. A primeira cepa, *C. neoformans* CBS 132 (denominada GXM-A em nosso estudo), foi gentilmente cedida pela Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, e pelo Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart. A segunda cepa, *C. neoformans* H99 (denominada GXM H99 neste trabalho), foi preparada no Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5.4 Extração e caracterização do antígeno polissacarídico capsular (GXM)

Células leveduriformes encapsuladas de *C. neoformans* (250 gramas) foram suspensas em 250 mL de tampão citrato (40 M pH 7.0). Esta suspensão foi autoclavada por 90 minutos a 121°C. Após autoclavação, a suspensão atingiu a temperatura ambiente (25°C) e o sobrenadante foi coletado após centrifugação (6.000 × g por 15 minutos a 4°C). O *pellet*

resultante foi ressuspendido em tampão citrato (20 mM) e um novo ciclo de extração foi realizado. Os antígenos polissacarídicos da cápsula foram então isolados a partir da precipitação de sobrenadantes (concentrados a vácuo) com três volumes de etanol a 4°C. O *pellet* foi dissolvido em água e centrifugado a $6.000 \times g$ por 15 minutos e os sobrenadantes foram liofilizados. A suspensão polissacarídica de *Cryptococcus* foi dissolvida em solução balanceada de Hank's, irradiada (10.000 Rad), filtrada em membrana de 0,45 μm e estocada a -20°C (ALMEIDA et al., 2001).

A presença de GXM em todas as amostras foi confirmada por ensaio positivo de aglutinação em látex com anticorpos anti-GXM (prova do criptolátex) cuja sensibilidade é de 99% para amostras de LCR e 87% para amostras de soro (Latex-Crypto Antigen Detection System, Immuno-Mycologics, Inc., USA) e por ELISA com anticorpo monoclonal específico para GXM (Mab18b7) cedidos pelos pesquisadores Dr^o Arturo Casadeval (Albert Einstein College of Medicine, New York, USA) e Prof^o. Dr^o Márcio L. Rodrigues (UFRJ).

5.5. Prova do Criptolátex

O teste foi realizado utilizando um kit para detecção de antígenos do *Cryptococcus* (*Cryptococcus* Antigen Test Kit – REMEL). Foram pipetados 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da GXM de *C. neoformans* sorotipo A – no total de duas cepas - denominadas neste trabalho de GXM-A e GXM-H99 em círculos separados, já contendo látex. Após homogeneização, a placa foi colocada em um agitador a 100 rpm por 5 minutos. Logo em seguida, observou-se a formação de aglutinação em comparação com os controles negativos e positivos do kit.

5.6 ELISA com anticorpo monoclonal anti-GXM (Mab18b7) para identificação da GXM obtida de *Cryptococcus neoformans*

Amostras de GXM (A e H99) foram aderidas em placa de ELISA de 96 poços de fundo chato (NUNC - Maxisoarp), pipetando-se um volume de 100 μL /poço de tampão carbonato pH = 9,4 contendo na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da GXM. Como controle positivo utilizou-se 100 μL de tampão carbonato contendo 20 μL da solução de antígeno

polissacarídico capsular purificado (KIT-IMMY), e como controle negativo, 100 µL de tampão carbonato contendo 20 µL da solução de PBS-BSA 1%, todos aderidos da mesma forma que a GXM. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C e posteriormente lavada com solução de PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T), por quatro vezes. Depois se realizou o bloqueio com PBS-BSA 3,0% por quatro horas, e em seguida a lavagem com solução de PBS-T, por quatro vezes. Logo em seguida, foram adicionados 100µL do anticorpo monoclonal 18B7 (anti-GXM) na concentração de 1,0 µg/mL em todos os poços. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de PBS-BSA 1,5% e as placas ficaram incubadas por uma hora a temperatura ambiente. Após esse procedimento, a placa foi lavada com solução de PBS-T, por quatro vezes, e foi adicionado, em cada poço, 100 µL de anticorpo anti-IgG total de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1:4000, e incubada novamente por uma hora a temperatura ambiente. Depois dessa etapa, a placa foi lavada com solução PBS-T, por quatro vezes. Em seguida, foi pipetado 50 µL de substrato (TMB + H₂O₂) em todos os poços da placa, incubando por mais 10 minutos. A reação foi bloqueada com 50 µL de solução “STOP” (ácido sulfúrico 2N) e a densidade óptica (D.O.) do teste foi medida em um leitor automático de ELISA (TURNER BIOSYSTEMS – MODULUS MICROPLATE). O resultado do teste foi expresso em densidade óptica (D.O.) e obtido pela diferença entre as absorbâncias medidas a 450 nm e 600 nm (Abs450 – Abs600). O ensaio foi realizado em duplicata para amostras e controles.

5.7 Cultura celular, coleta e armazenamento de sobrenadante

As células isoladas por gradiente de densidade (ficoll-histopaque) foram pré-incubadas em placas de 24 poços (1x10⁶ células/poço) na presença ou ausência da GXM de *C. neoformans* (10, 50 e 100µg/mL) em meio de cultivo RPMI contendo 4,75 g/L de Hepes, 10% de soro fetal bovino inativado (LGC), 1% de L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina, por um período de 4 horas (presença de GXM) em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as culturas celulares foram estimuladas com IFN-γ (0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 5,0 e 10 ng/mL), exceto o controle negativo, e novamente incubadas em quatro períodos de tempo (1, 2, 4 e 18 horas) em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Ao término destas horas o sobrenadante das culturas foi transferido para tubos de polipropileno e centrifugados por 6 minutos a 1.200 rpm. Após esta centrifugação o sobrenadante da cultura era novamente transferido para um tubo de

polipropileno definitivo, identificado e estocado em freezer a -80°C para posterior dosagem de quimiocinas.

5.8 Testes de viabilidade celular

5.8.1 Metabolização do sal tetrazólico MTT por PMNs e PBMCs

As células polimorfonucleares e mononucleares separadas por gradiente de densidade (2×10^5 células) foram cultivadas em placa estéreis de 96 poços durante 4 horas a 37°C e 5% de CO_2 na presença de GXM A e GXM H99 nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O volume final de cada poço foi ajustado para 180 μL com meio de cultura RPMI contendo 4,75 g/L de HEPES, 10% de soro fetal bovino inativado (LGC), 1% de L-glutamina e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina. Em seguida foi adicionado em cada poço das culturas celulares, 20 μL de MTT, e novamente as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por 4 horas. O sal resultante dessa metabolização (formazan) foi solubilizado com a adição de 100 μL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em meio ácido (29,9 mL de SDS para 0,1 mL de HCl concentrado) para solubilização dos cristais de formazan obtidos. A cultura foi incubada em estufa por 18 horas, e após esse período a produção de cor foi avaliada por leitor de placa (Modulus Microplate Reader) a 570 nm. Os resultados foram expressos em valores de absorvância (D.O.).

5.8.2 Método do azul de tripan

A determinação da viabilidade celular de PMN e PBMC pelo método do azul de tripan (0,4%) foi realizada após separação de células e incubação com diferentes concentrações de GXM. Para tanto, suspensões celulares (1×10^6 células/poço) foram plaqueadas em 24 poços e incubadas à 37°C por 4 horas em estufa atmosférica com 5% de CO_2 na ausência ou presença de concentrações variadas de GXM de *C. neoformans* (10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente, alíquotas de 50 μL foram retiradas de cada tratamento

experimental e misturadas com 50 μL do corante azul de tripan (0,4%). Após 10 minutos, o número de células viáveis foi quantificado em câmara de Neubauer, através de microscopia óptica em objetiva de 40x, fazendo-se a contagem de células mortas (coradas) e células íntegras (não coradas).

5.9 Quantificação de quimiocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A dosagem da quimiocina CXCL10 foi realizada no sobrenadante de cultura de PBMC e PMN por ELISA utilizando anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis (BD Biosciences). Para o ensaio foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (NUNC-Maxisorp), recobertas com anticorpos monoclonais específicos (concentração final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão *coating* (solução 0,1 M de NaHCO_3 e Na_2CO_3 ; pH 9,6) e mantidas a 4°C por 18 horas para a captura da quimiocina a ser quantificada. Posteriormente a placa foi lavada cinco vezes com uma solução PBS-T, e posteriormente, bloqueada com 200 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de tampão PBS contendo 2% de albumina bovina (SIGMA - USA), durante 4 horas a temperatura ambiente. Após esta incubação, as placas foram lavadas mais cinco vezes com solução de PBS-T. Da coluna 1 a coluna 10, foram adicionados 25 μL de PBS contendo 1% de albumina bovina (SIGMA - USA), juntamente com 25 μL do sobrenadante de cultura por poço, nas colunas 11 e 12, adicionou-se 50 μL desse mesmo diluente, os quais correspondiam à curva padrão, e 50 μL de quimiocina padrão recombinante, seguindo diluições seriadas de 1:2 em PBS, contendo 1% de albumina bovina (SIGMA - USA), deixando os dois últimos poços das colunas 11 e 12 como branco, procedimento realizado conforme as instruções do fabricante do kit. As placas foram incubadas a 4° C por 18 horas, e posteriormente lavadas cinco vezes com solução PBS-T. Os anticorpos anti-quimiocina com estreptavidina conjugada a peroxidase foram diluídos em PBS-BSA 1% (SIGMA - USA), e 35 $\mu\text{L}/\text{poço}$ da solução foram colocados nos poços da placa. As placas foram mantidas durante duas horas em temperatura ambiente e lavadas cinco vezes com (PBS-T). Após esta etapa, foram adicionados 50 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de solução mista de TMB (3,3', 5,5' tetrametilbenzidina) com H_2O_2 (Peróxido de Hidrogênio), (BD OptEIA) na diluição 1:1. As placas foram incubadas em câmara escura por trinta minutos para desenvolvimento da cor resultante do ataque da peroxidase ao substrato. A reação foi paralisada pela adição de 50 μL de solução de ácido sulfúrico H_2SO_4 2N aos 96 poços da placa. A leitura foi feita em leitor automático de ELISA

(Modulus Microplate Reader) e os resultados expressos em densidade óptica (D.O.), obtidos pela diferença entre as absorbâncias medidas a 450 nm e 600 nm. A concentração da quimiocina presente nos sobrenadantes foi expressa em pg/mL e determinada pela comparação entre as absorbâncias obtida em uma curva padrão realizada simultaneamente com a respectiva quimiocina recombinante.

5.10 Citometria de fluxo para avaliação de receptores de membrana

Após coleta de sangue em tubo com heparina e separação de PBMC e PMN dos doadores voluntários, 5×10^5 células foram incubadas em tubos de citometria (BD Falcon - USA) em 500 μ L de meio RPMI 1640 (LGC) contendo 10% de SFB (HyClone, Thermo Scientific) na presença ou ausência de GXM (100 μ g) a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas. Os tubos foram lavados com 2,5 mL de solução de PBS acrescida de SFB 1% (PBS-SFB 1%) (HyClone, Thermo Scientific) em centrífuga a 4°C a 256 g por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspensionado em 50 μ L de tampão de marcação (*Staining Buffer* - IMGENEX). Cada grupo a ser analisado apresentava três tubos sendo: tubo controle (sem marcação), tubo contendo anticorpos isotipo controle (IgG1 κ -FITC - BD Pharmigen™) e tubo com as marcações específicas. Os marcadores extracelulares analisados foram: CD14-FITC e CD119-PE (BD Pharmigen™). Foram pipetados 0,5 μ g de anticorpo isotipo controle e 0,5 μ g de anticorpo específico. A marcação foi feita em câmara escura a temperatura ambiente por 45 minutos. Em seguida, os tubos foram novamente lavados por três vezes com 2,5 mL de PBS-SFB1% em centrífuga a 4°C e 256 g por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 100 μ L de PBS-SFB1% mais 100 μ L de solução de fixação (PBS com 2% de paraformaldeído, IMGENEX) para ser fixado e lido posteriormente.

5.10.1 Estratégia de análise para receptores de membrana

A leitura foi feita em citômetro de fluxo (FACS Calibur – Becton Dickinson, E.U.A.). Os resultados foram analisados pelo programa FlowJo versão 7.6. Para aquisição dos resultados foi utilizado o software do equipamento denominado Cell Quest. Foram adquiridos

100.000 eventos. Para identificação da população de interesse, PMNs e PBMCs, foram selecionados por janelas – “gates”, em gráficos de tamanho celular (Forward Scatter –FSC) versus granulosidade (Side Scatter – SSC). Posteriormente, a população PMN foi analisada em gráficos de SSC x FL2 (CD119-PE) e a população PBMC em gráficos de FL1 (CD14-FITC) versus FL2 (CD119-PE).

5.11 Citometria de fluxo para avaliação intracelular de CXCL10 e STAT1

Após coleta de sangue em tubo de heparina e separação de PMN e PBMC de doadores voluntários, 5×10^5 células foram incubadas em tubos de citometria (BD Falcon - USA) em 500 μ L de meio RPMI 1640 (LGC) na presença ou ausência de GXM (100 μ g) a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas. Nos grupos GXM e IFN- γ , e somente IFN- γ , foram adicionados 100 ng de IFN- γ recombinante, e a cultura foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 18 horas. Decorrido o tempo da cultura, os tubos foram centrifugados a 400 g por cinco minutos e o sobrenadante foi desprezado. Posteriormente foi adicionado ao pellet de células, 1 mL de PBS, e os tubos foram centrifugados a 400 g, durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente foram adicionados 200 μ L de solução de bloqueio (PBS-SFB 10%) e os tubos foram incubados a 4°C por 20 minutos. Cada grupo a ser analisado apresentava três tubos sendo: tubo meio (sem marcação), tubo contendo anticorpos isotipo controle (IgG1 κ -FITC - BD Pharmigen™) e tubo com as marcações específicas. Após a marcação do anticorpo de superfície (CD14-FITC) (BD Pharmigen™), os tubos foram lavados novamente por três vezes com PBS, sendo centrifugados a 400 g, durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuspensionado em 200 μ L de solução Fixation/Permeabilization (BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit) e procedeu-se a fixação e permeabilização celular conforme recomendações do fabricante, e as células foram incubadas a 4°C durante 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com 1 mL de Perm Wash (BD Perm/Wash™ Buffer), sendo centrifugadas a 400 g, durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente foram adicionados 200 μ L de solução de bloqueio (PBS-SFB 10%) e os tubos foram incubados a 4°C por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 400 g, durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuspensionado em 100 μ L de solução Perm Wash juntamente com o anticorpo intracelular: anti- CXCL10-PE ou anti- STAT1-PE (BD Pharmigen™). Foram pipetados 0,5

μg de anticorpo isotipo controle e 0,5 μg de anticorpo específico. A marcação foi feita em câmara escura a temperatura ambiente por 40 minutos. Em seguida, os tubos foram lavados novamente por três vezes com solução Perm Wash, sendo centrifugados a 400 g, durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuscitado em 100 μL de PBS-SFB1% mais 100 μL de solução de fixação (PBS com 2% de paraformaldeído, IMGEX) para ser fixado e lido posteriormente.

5.11.1 Estratégia de análise para a citometria de fluxo intracelular

Para a análise das populações de PBMC e PMN foram utilizados inicialmente, gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (Side Scatter – SSC) e posteriormente a população de monócitos foi analisada em gráficos de FL1 (CD14) versus FL2 (CXCL10 ou STAT1) e a população de PMN foi analisada em gráficos de SSC versus FL2 (CXCL10 ou STAT1) tanto nas culturas controle quanto nas culturas pré-tratadas com GXM de *C. neoformans*.

5.12 Análise Estatística

Os dados obtidos neste projeto foram analisados pelo aplicativo Statview. Para os dados que apresentam dispersão Gaussiana, foram utilizados testes e análise de variância (ANOVA) com repetição (amostra em triplicata). Testes Bonferroni para comparação do valor obtido de p com o valor esperado, e de Tuckey e Dunnet para dados não pareados com significância estabelecida em 5%. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados onde a distribuição não foi Gaussiana. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar diferentes grupos, e o teste de Mann-Whitney para comparar diferenças entre dois grupos ($p < 0,05$).

5.13 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEP-UFTM) com o número de protocolo CEP-UFTM: 677. Os voluntários quando de acordo em participar da pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

6 RESULTADOS

6.1 Casuística

O presente trabalho foi realizado com doadores voluntários saudáveis, que aceitaram de forma espontânea ser incluídos no projeto de pesquisa, totalizando 10 participantes. Após esclarecimentos aos indivíduos sobre a metodologia utilizada, finalidade e objetivos do trabalho, foi solicitado aos voluntários a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram coletadas amostras de sangue periférico (20 mL) de 10 doadores, 7 do gênero feminino (70%) e 3 do gênero masculino (30%), com idades variando entre 22 a 28 anos. A dosagem de proteína C reativa (PCR) foi realizada para exclusão de amostras alteradas por traumas, infecção ou inflamação proveniente dos doadores, já que a mesma é uma proteína de fase aguda, que se eleva nas situações acima citadas. Amostras de PCR com resultados superiores a 5,0 mg/dL foram excluídas do trabalho, e as dosagens variaram de 0,4 a 1,0 mg/dL. A tabela I exhibe as características dos doadores incluídos no estudo, quanto ao gênero, idade e níveis séricos de PCR.

Tabela I: Número e porcentagem de indivíduos incluídos na casuística segundo gênero, idade e níveis séricos de proteína C reativa

Nº DE DOADORES (n=10)	GÊNERO	IDADE (média ± d.p em anos)	PCR (média ± d.p. em mg/dL)
7 (70%)	Feminino	24,7 ± 2,4	0,60 ± 0,14
3 (30%)	Masculino	26,7 ± 3,1	0,71 ± 0,12

6.2 Reatividade ao criptolátex

Para verificação da eficácia no isolamento da GXM, foi realizado o teste de partículas de látex recobertas com anticorpo anti-GXM (*Cryptococcus* Antigen Test Kit –

REMEL) que apresenta alta sensibilidade (100%) e especificidade (96%), apresentando reação positiva para a GXM em estudo. Foi utilizado 10 µg/mL da solução de GXM de *C. neoformans*, provocando forte reação no teste, com presença nítida de aglutinação, identificando a presença da GXM nas amostras extraídas e purificadas utilizadas nos ensaios.

6.3 Reatividade ao anticorpo monoclonal (18b7) anti-GXM por ELISA

A figura abaixo mostra as densidades ópticas (D.O) das amostras da GXM obtida de *C. neoformans*. O valor médio de absorvância para o GXM obtido da cepa CBS 132 (GXM-A) foi igual a 2,1993, enquanto as amostras de GXM obtidas da cepa H99 apresentaram o valor de 2,4599. Em relação ao controle negativo (0,2583), as cepas de GXM demonstraram diferenças estatisticamente significativas (** $p < 0,01$), indicando a presença desses antígenos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal 18B7.

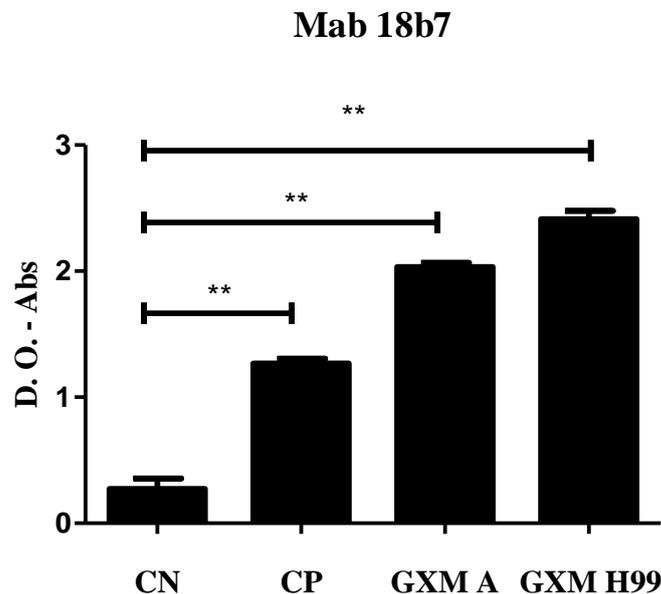


Figura 1: ELISA com anticorpo monoclonal anti-GXM (Mab 18B7) para identificação da GXM obtida de *C. neoformans* da cepa CBS 132 (GXM A) e GXM da cepa H99 (GXM H99). CN = controle negativo (PBS-BSA 1%); CP = controle positivo (antígeno polissacarídico capsular purificado presente no kit IMMY). Os resultados estão expressos em média +/- desvio padrão de 4 experimentos em duplicata. ** $p < 0,01$.

6.4 Quantificação do número de células viáveis, pelo azul de tripan, após cultivo de PMNs e PBMCs com a GXM de *C. neoformans*

A viabilidade celular foi realizada através do método de exclusão do corante vital azul de tripan após o cultivo de PMNs e PBMCs com a GXM de *C. neoformans*. Esta metodologia avalia a integridade dos mecanismos de transporte ativo de corante na membrana celular, permitindo diferenciar células viáveis de células não viáveis.

Por meio do teste do azul de tripan, observou-se que as PMNs e PBMCs apresentaram viabilidade celular adequada (superior a 90%) após cultivo com a GXM de *C. neoformans* nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, resultados satisfatórios para a continuação dos experimentos (tabela II e III).

Tabela II: Média dos valores individuais das porcentagens de viabilidade das culturas de PMNs em diferentes concentrações do GXM de *C. neoformans* submetidas ao teste de exclusão do azul de tripan

PMNs viáveis (%)					
Cepa da GXM	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
CBS 132 (GXM-A)	98	97	97	96	96
H-99 (GXM-H99)	97	98	99	97	97

Tabela III: Média dos valores individuais das porcentagens de viabilidade das culturas de PBMCs em diferentes concentrações do GXM de *C. neoformans* submetidas ao teste de exclusão do azul de tripan

PBMCs viáveis (%)					
Cepa da GXM	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
CBS 132 (GXM-A)	97	98	98	96	97
H-99 (GXM-H99)	96	97	99	98	97

6.5 Avaliação da citotoxicidade da GXM pelo método do MTT por PMNs e PBMCs

Os efeitos da GXM de *C. neoformans* (cepas A e H99) sobre PMNs e PBMCs humanas foram avaliados pelo método de metabolização do MTT após o período de 4 horas. As figuras 2 e 3 demonstram que a incubação de PMNs e PBMCs com concentrações crescentes da GXM (10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) de *C. neoformans* das cepas CBS 132 e H99 em presença de MTT, resulta em quantidades equivalentes de cristais de formazan (produto final da metabolização do MTT). Os resultados obtidos através da comparação entre as densidades óticas (D.O.) do controle com o teste (curva crescente de GXM) demonstram que, independente da cepa, nenhuma das concentrações utilizadas da GXM foi tóxica para as células humanas.

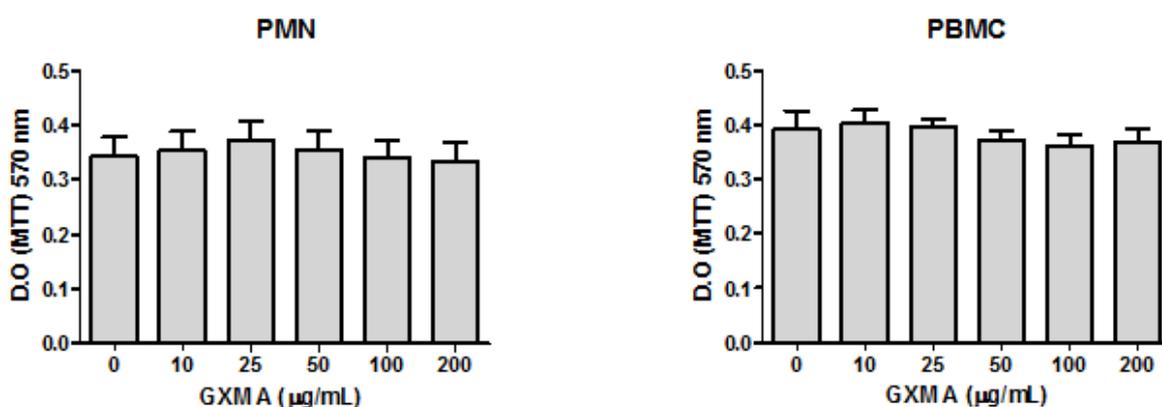


Figura 2: Efeito da GXM obtida de *C. neoformans*, cepa CBS 132 (GXMA) sobre a metabolização de MTT por PMNs e PBMCs (5×10^5 células/poço) pré-incubada a 37°C em estufa a 5% de CO_2 durante 18 horas na presença ou ausência de doses crescentes de GXM (0, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados mostram as densidades óticas obtidas pela redução do MTT a formazan por PMNs e PBMCs cultivadas ou não com GXM obtido da cepa CBS 132 (GXMA). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de 3 experimentos em triplicata. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

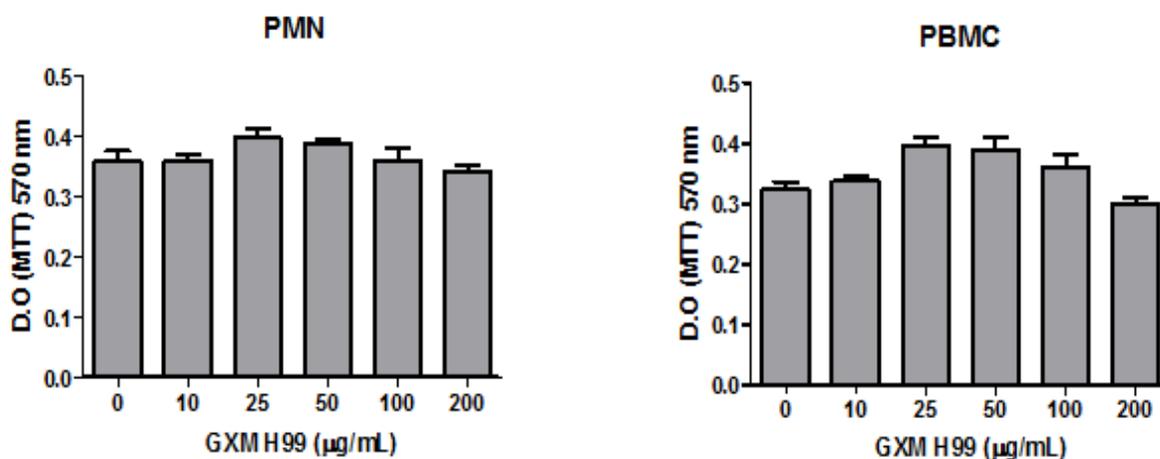


Figura 3: Efeito da GXM obtida de *C. neoformans*, cepa H99 (GXM-H99) sobre a metabolização de MTT por PMNs e PBMCs (5×10^5 células/poço) pré-incubada a 37°C em estufa a 5% de CO₂ durante 18 horas na presença ou ausência de doses crescentes de GXM (0, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL). Os resultados mostram as densidades ópticas obtidas pela redução do MTT a formazan por PMNs e PBMCs cultivadas ou não com GXM obtido da cepa H99 (GXM-H99). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de 3 experimentos em triplicata. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

6.6 Avaliação da resposta de PBMCs e PMNs ao IFN- γ recombinante em diferentes períodos de cultura celular *in vitro*.

O modelo inicial utilizado para avaliar a resposta de PBMCs e PMNs humanas ao IFN- γ recombinante foi feito através da realização de uma cultura de células mononucleares e polimorfonucleares humanas contendo $1,0 \times 10^6$ células/poço cultivadas em placa estéril e estimuladas com 10,0 ng/mL de IFN- γ recombinante. A avaliação ocorreu em diferentes períodos de incubação (1, 2, 4 e 18 horas), o que determinou a concentração de quimiocina produzida.

A quimiocina IP-10/CXCL10 que, em geral, é utilizada para medir a atividade biológica do IFN- γ recombinante humano foi mensurada para avaliar o ensaio.

Os resultados obtidos nas figuras 4 e 5 mostram que no tempo de 18 horas ocorreu a maior produção de CXCL10 por PBMCs e PMNs estimuladas por IFN- γ , sem acarretar dano ou degeneração celular, tempo que foi selecionado para os experimentos posteriores deste trabalho.

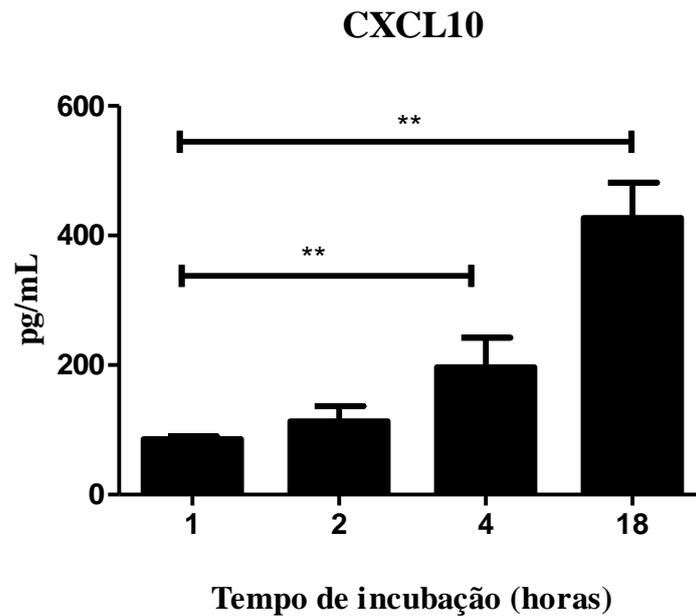


Figura 4: Curva da produção da quimiocina CXCL10 por células polimorfonucleares humanas (PMNs - $1,0 \times 10^6$ células/poço) após estímulo com 10,0 ng/mL de IFN- γ recombinante em diferentes períodos de incubação (1, 2, 4 e 18 horas). A produção de CXCL10 foi avaliada em sobrenadante de cultura por ELISA. Os resultados estão expressos em média +/- desvio padrão de 10 experimentos em duplicata. ** $p < 0,01$.

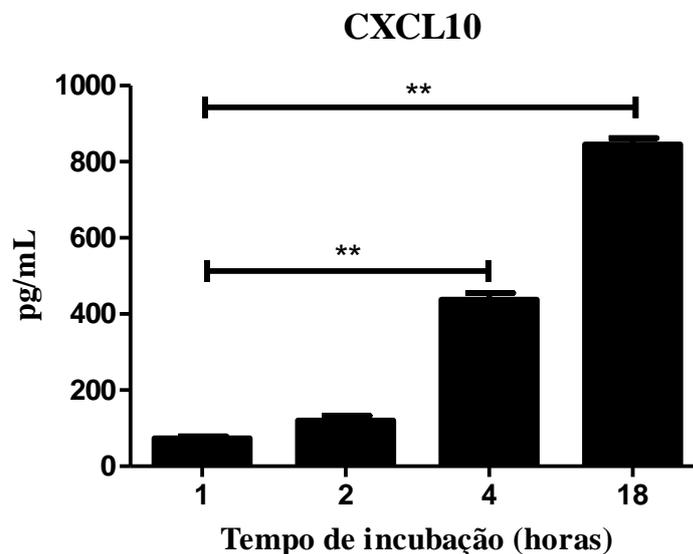


Figura 5: Curva da produção da quimiocina CXCL10 por células mononucleares humanas (PBMCs - $1,0 \times 10^6$ células/poço) após estímulo com 10,0 ng/mL de IFN- γ recombinante em diferentes períodos de incubação (1, 2, 4 e 18 horas). A produção de CXCL10 foi avaliada em sobrenadante de cultura por ELISA. Os resultados estão expressos em média +/- desvio padrão de 10 experimentos em duplicata. ** $p < 0,01$.

6.7 Avaliação da produção de CXCL10 por PBMCs e PMNs estimuladas com diferentes concentrações de IFN- γ recombinante

A capacidade de resposta celular foi avaliada de acordo com a produção da quimiocina CXCL10 após a estimulação com IFN- γ . A curva dose-resposta (em ng/ml) que utilizou quatro concentrações de IFN- γ para estimulação da produção de CXCL10 por PMNs e PBMCs é apresentada nas figuras 6 e 7, respectivamente. Para os experimentos com PMNs e PBMCs, os dados obtidos mostram que a concentração de 10 ng/mL de IFN- γ recombinante humano foi a que apresentou a maior produção de CXCL10 (**, $p < 0,01$) em relação às células não estimuladas, com produção média de CXCL10 de 386,5 em PMN e 783,03 pg/mL em PBMC.

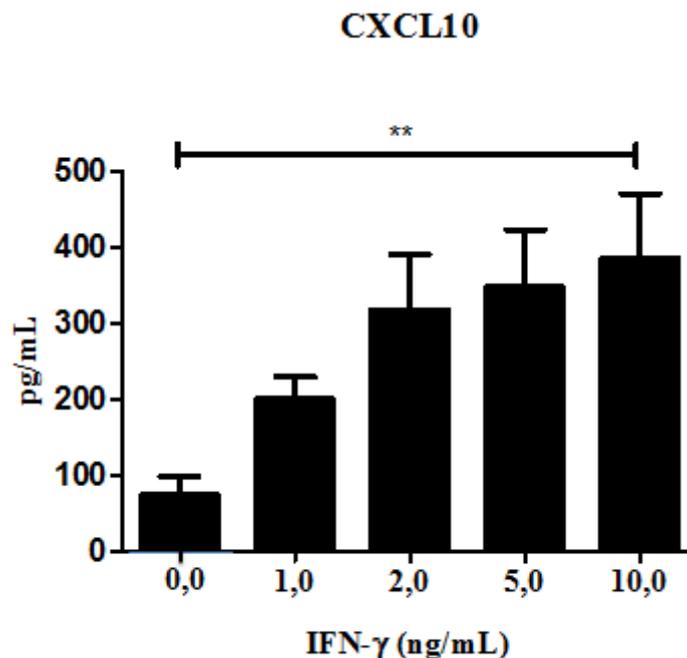


Figura 6: Curva da produção da quimiocina CXCL10 por células polimorfonucleares humanas (PMNs - $1,0 \times 10^6$ células/poço) após estímulo com diferentes concentrações de IFN- γ recombinante (1,0; 2,0; 5,0 e 10 ng/mL). A produção de CXCL10 foi avaliada em sobrenadante de cultura de 18 horas por ELISA. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de 10 experimentos em duplicata. CN = Controle negativo (ausência de IFN- γ)
** $p < 0,01$.

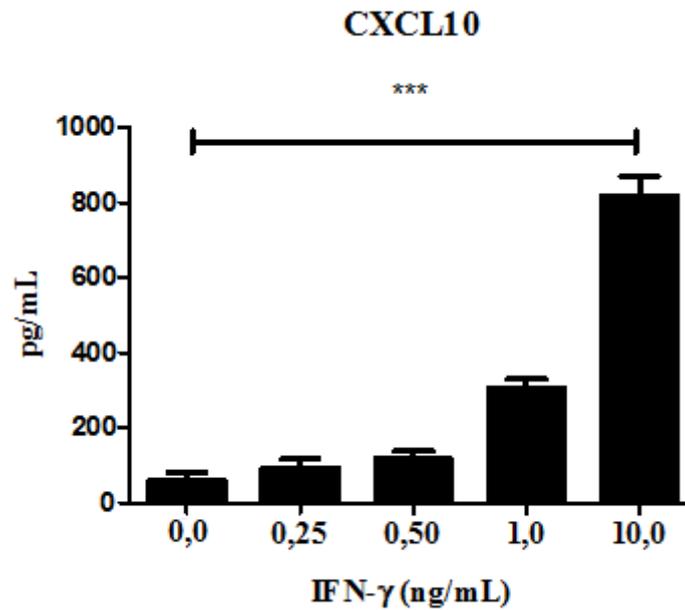


Figura 7: Curva da produção da quimiocina CXCL10 por células mononucleares humanas (PBMCs - $1,0 \times 10^6$ células/poço) após estímulo com diferentes concentrações de IFN- γ recombinante (0,25; 0,50; 1 e 10 ng/mL). A produção de CXCL10 foi avaliada em sobrenadante de cultura de 18 horas por ELISA. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de 10 experimentos em duplicata. CN = Controle negativo (ausência de IFN- γ) *** $p < 0,001$.

6.8 Efeito do pré-tratamento com GXM de *C. neoformans* sobre a produção de CXCL10 por PMNs e PBMCs estimulados com IFN- γ *in vitro*

A partir deste ponto de nosso trabalho, apresentaremos somente os resultados obtidos com a GXM-A (cepa CBS 132), uma vez que a GXM-H99 (obtida da cepa H99) apresentou resultados similares aos obtidos com a GXM-A em todos os experimentos realizados (dados não mostrados).

Foi realizada a cultura de PMNs e PBMCs pré-tratadas com concentrações crescentes (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) da GXM-A de *C. neoformans* por 4 horas e a seguir adicionados 10 ng/mL de IFN- γ recombinante. A concentração de CXCL10 nos sobrenadantes após 18 horas de cultura com IFN- γ recombinante foi determinada pelo método de ELISA e os resultados expressos em pg/mL. De acordo com os resultados houve um efeito inibitório do GXM de *C. neoformans* com perfil dose-dependente sobre a produção de CXCL10 por PMNs e PBMCs após estímulo com IFN- γ recombinante (figura 8).

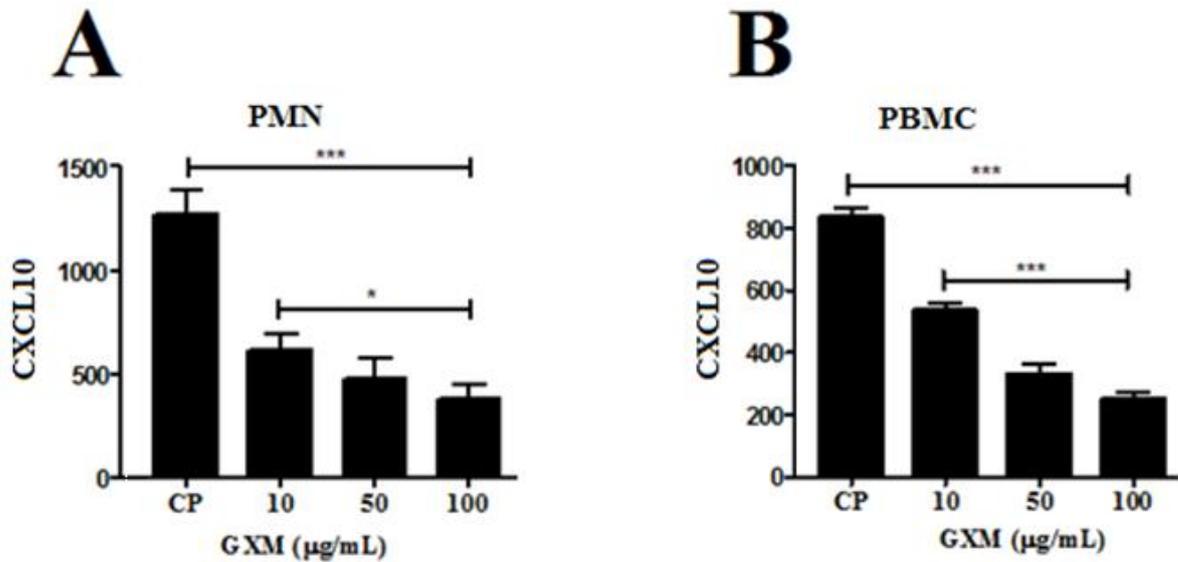


Figura 8: Produção de CXCL10 por PMNs e PBMCs ($1,0 \times 10^6$) pré-tratadas com doses crescentes de GXM de *C. neoformans* (10, 50, 100 µg/mL) por 18 horas, na presença de IFN- γ recombinante (10 ng/mL). A produção de CXCL10 foi avaliada por ELISA nos sobrenadantes após 18 horas de cultura. (A) PMNs e (B) PBMCs foram isolados de doadores saudáveis ($n=10$) e pré-tratados com GXM da cepa CBS 132 (GXM-A) por 18 h. CP = Controle positivo (presença de IFN- γ e ausência de GXM). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

6.9 Citometria de fluxo

6.9.1 Análise da produção de CXCL10 intracelular em PMNs e PBMCs pré-tratados com GXM de *C. neoformans*.

Após detectarmos a redução nos níveis de CXCL10 no sobrenadante de cultura de PMNs e PBMCs pré-tratadas com GXM, o próximo objetivo foi investigar a síntese intracelular de CXCL10 após pré-tratamento com GXM (100 µg/mL) e posterior estimulação com IFN- γ (10 ng/mL). A produção intracelular de CXCL10 foi investigada em PMNs e em monócitos CD14⁺, com “gates” correspondentes a mais de 95% das células de interesse. Os resultados da citometria mostram uma redução significativa na síntese de CXCL10 intracelular em PMNs e monócitos CD14⁺ pré-tratados com a GXM e posteriormente estimulados IFN- γ quando comparados às células cultivadas na ausência da GXM e

estimuladas com IFN- γ recombinante (figura 9). Os dados obtidos reforçam os resultados de ELISA (figura 8) que mostram a redução na concentração de CXCL10 no sobrenadante de culturas celulares pré-tratadas com GXM.

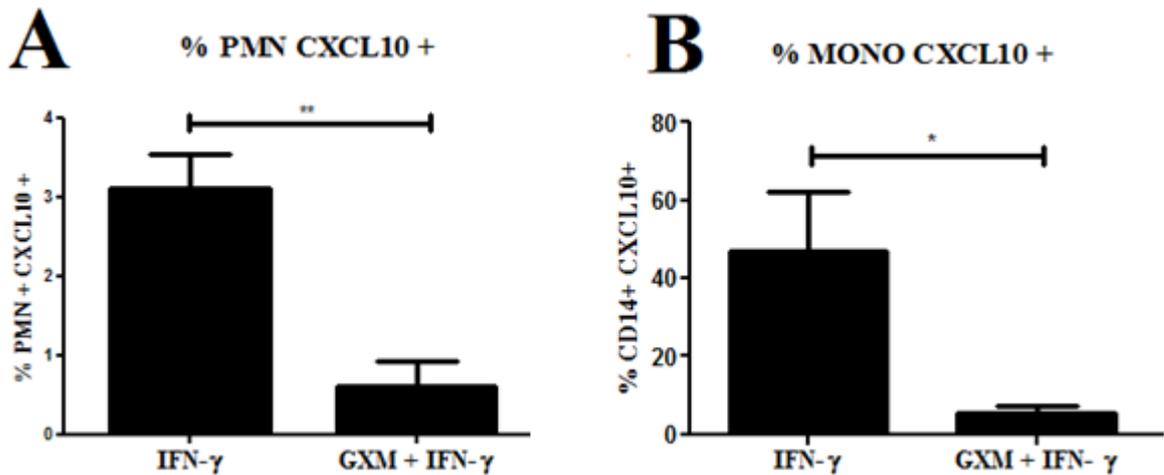


Figura 9: Produção de CXCL10 intracelular por PMNs e PBMCs pré-tratados com GXM de *C. neoformans*. PMNs e PBMCs foram isolados de doadores saudáveis (n=10) e pré-tratados com GXM de *C. neoformans* (100 μ g). (A) Mostra a porcentagem (%) de eventos duplo-positivos para PMN/CXCL10⁺ dentro da região (“gate”) de células polimorfonucleares, pré-estabelecida conforme tamanho celular (FCS) versus granulosidade (SSC), após incubação com GXM. (B) Mostra a porcentagem (%) de eventos duplo-positivos para CD14⁺/CXCL10⁺ dentro da região (“gate”) de células mononucleares, pré-estabelecida conforme tamanho celular (FCS) versus granulosidade (SSC), após incubação com GXM. Nos painéis (A e B) são exibidas as médias dos 6 experimentos realizados com células pré-tratadas com GXM + IFN- γ e tratadas somente com IFN- γ (controle positivo). A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur (BECTON DICKINSON). Todos os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software FlowJo, em plataforma Windows. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

6.9.2 Análise da expressão da cadeia alfa do receptor do IFN- γ (CD119/ IFN- γ R1) em PMNs e PBMCs pré-tratados com a GXM de *C. neoformans*.

Resultados anteriores indicam que a inibição da produção de CXCL-10 em PMNs e monócitos CD14⁺ pré-tratados com a GXM de *C. neoformans* parece ser específica para o perfil de resposta diretamente ativado pela presença de IFN- γ . De acordo com os dados anteriores mostrando a inibição na produção de CXCL10, foi levantada a hipótese de uma

possível modulação na expressão da cadeia alfa do receptor do IFN- γ (CD 119/IFN- γ R1) para explicar os efeitos inibitórios da GXM. Realizamos então ensaios de citometria de fluxo, para avaliar a expressão da cadeia alfa do receptor do IFN- γ (CD119/IFN- γ R1) na membrana de PMNs e de monócitos CD14⁺, e deste modo investigar a existência de alguma alteração que possa comprometer a expressão e sinalização através deste receptor.

A expressão de CD119 foi avaliada e detectamos diferenças nos percentuais de PMNs e monócitos CD14⁺ marcados para CD119 nas células tratadas com GXM-A (figuras 10 e 11), mostrando que a GXM de *C. neoformans* foi capaz de modular negativamente a expressão do receptor do IFN- γ em PMNs e células CD14⁺, visto que a intensidade média de fluorescência de ambos sofreu redução significativa.

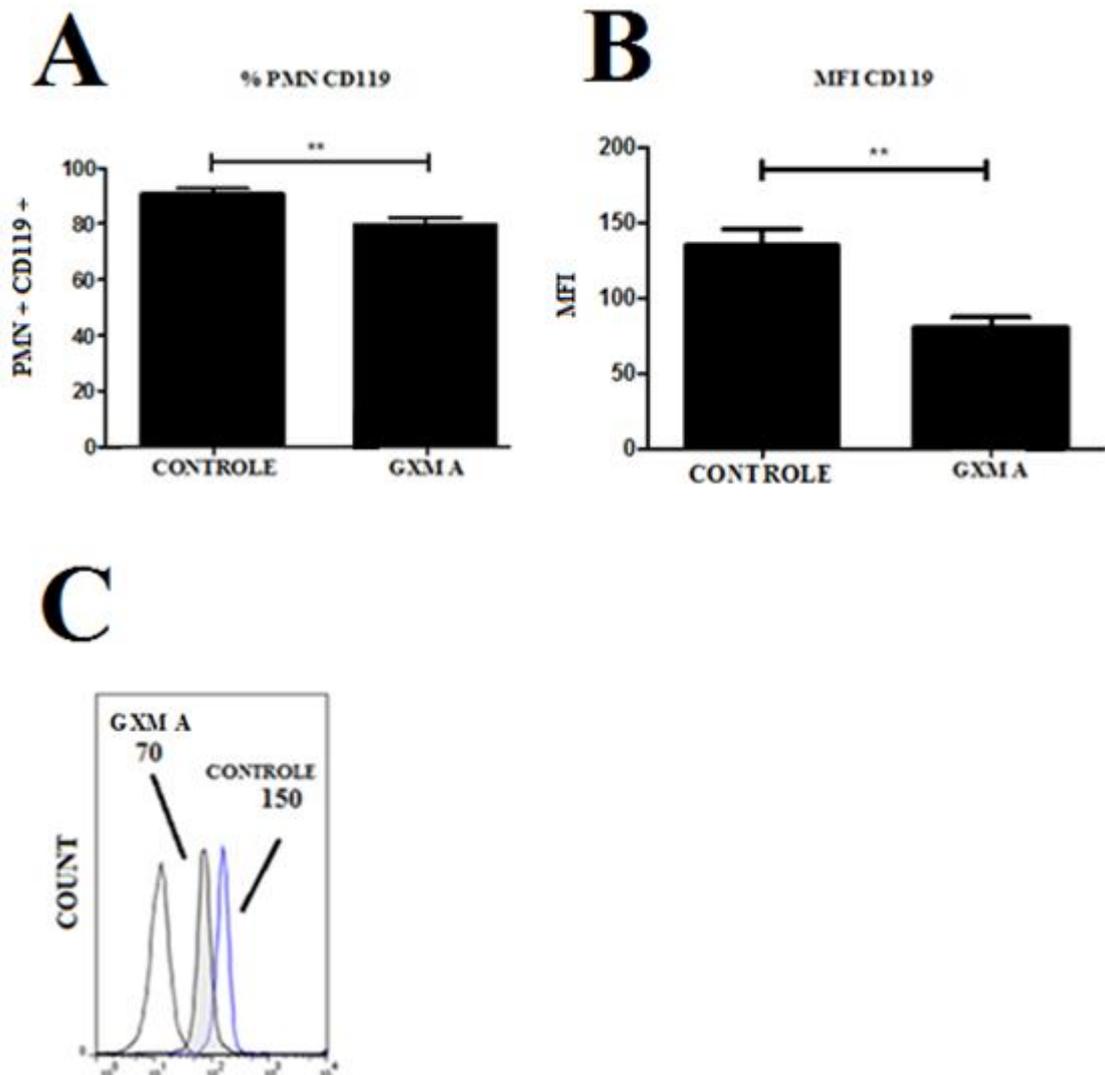


Figura 10: Expressão da cadeia alfa do receptor 1 do IFN- γ (CD119/ IFN- γ R1) em células polimorfonucleares humanas (PMNs) pré-tratadas com a GXM obtida do *C. neoformans* (4

horas) avaliada por citometria de fluxo. As células foram marcadas com 0,25 μ g de anti-CD119/PE (BD Pharmigen™). (A) e (B) mostram respectivamente o percentual e a intensidade média de fluorescência (MFI) de PMN/CD119+ dentro da região (“gate”) de células polimorfonucleares pré-estabelecida conforme tamanho celular (FCS) versus granulosidade (SSC), após tratamento com GXM. (C) Mostra o gráfico em sobreposição de histogramas obtidos da MFI nos grupos I.C., Controle e GXM-A. Os resultados exibidos no painel C são dados de 1 experimento representativo de um total de 6 experimentos similares. A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur (BECTON DICKINSON). Todos os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software FlowJo, em plataforma Windows. **, $p < 0.01$.

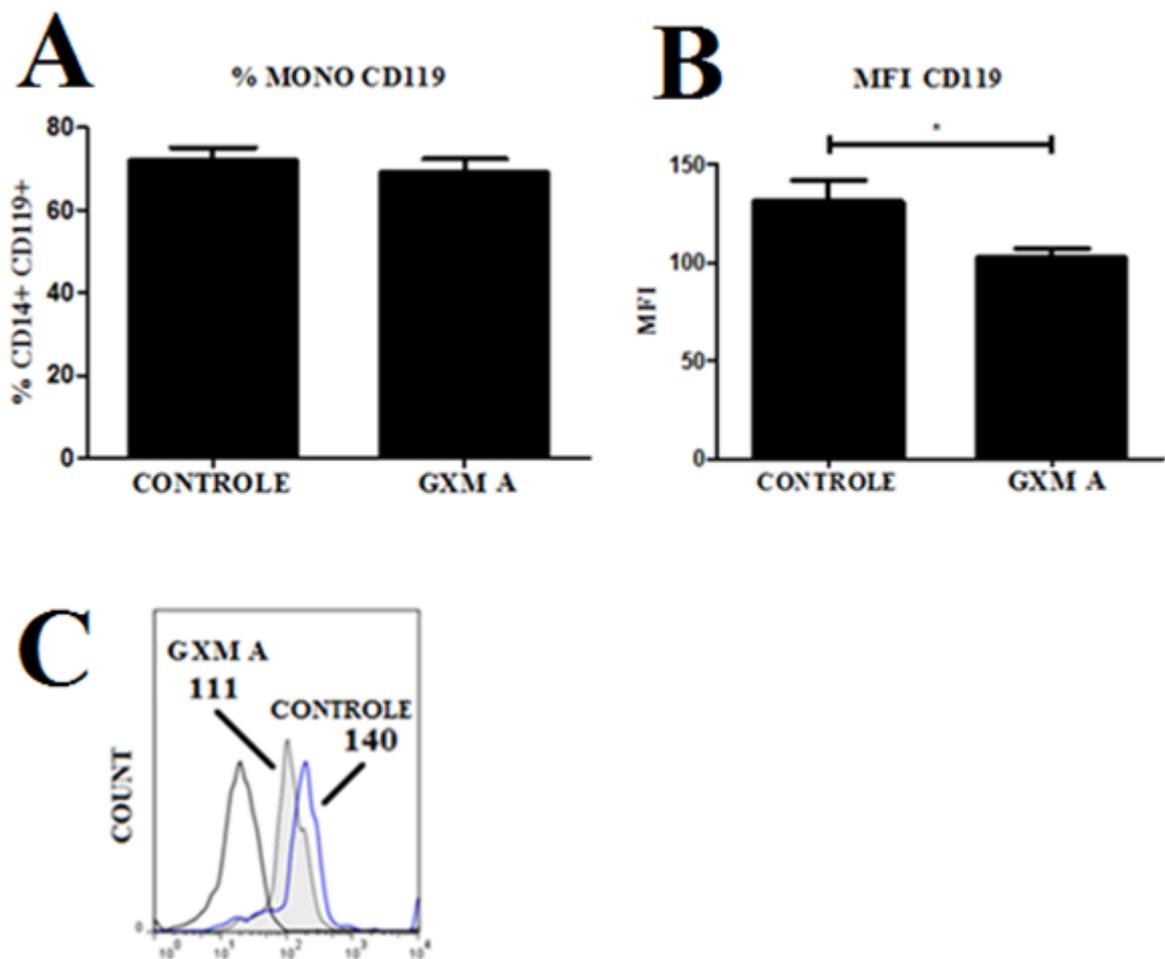


Figura 11: Expressão da cadeia alfa do receptor 1 do IFN- γ (CD119/ IFN- γ R1) em células mononucleares humanas (PBMCs) pré-tratadas com a GXM obtida do *C. neoformans* (4 horas) avaliada por citometria de fluxo. As células foram marcadas com 0,25 μ g de anti-CD14/FITC e anti-CD119/PE (BD Pharmigen™). (A) e (B) mostram respectivamente o percentual e a intensidade média de fluorescência (MFI) de CD14+/CD119+ dentro da região (“gate”) de células mononucleares pré-estabelecida conforme tamanho celular (FCS) versus granulosidade (SSC), após tratamento com GXM. (C) Mostra o gráfico em sobreposição de histogramas obtidos da MFI nos grupos I.C., Controle e GXM-A. Os resultados exibidos no painel C são dados de 1 experimento representativo de um total de 6 experimentos similares. A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur (BECTON DICKINSON). Todos os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software FlowJo, em plataforma Windows. *, $p < 0.05$.

6.9.3 Avaliação da fosforilação de STAT1 em PBMCs

A resolução da infecção por *C. neoformans* depende estritamente do perfil de resposta Th1, que ativa citocinas, quimiocinas e a própria IMC. Após análises anteriores apontarem para um decréscimo na resposta celular estimulada por IFN- γ e modulação da expressão da cadeia alfa do receptor desta citocina, avaliamos a fosforilação de STAT1 em monócitos CD14⁺ cultivados com GXM, célula esta que participa ativamente na eliminação do fungo. Na figura 12 verificamos que houve uma redução significativa na fosforilação de STAT1 em monócitos CD14⁺ quando comparado com o controle positivo (estimulação com 10 ng de IFN- γ e sem pré-tratamento com GXM), mostrando a inibição da via de transdução de sinais pela GXM após a interação do IFN- γ com o seu receptor.

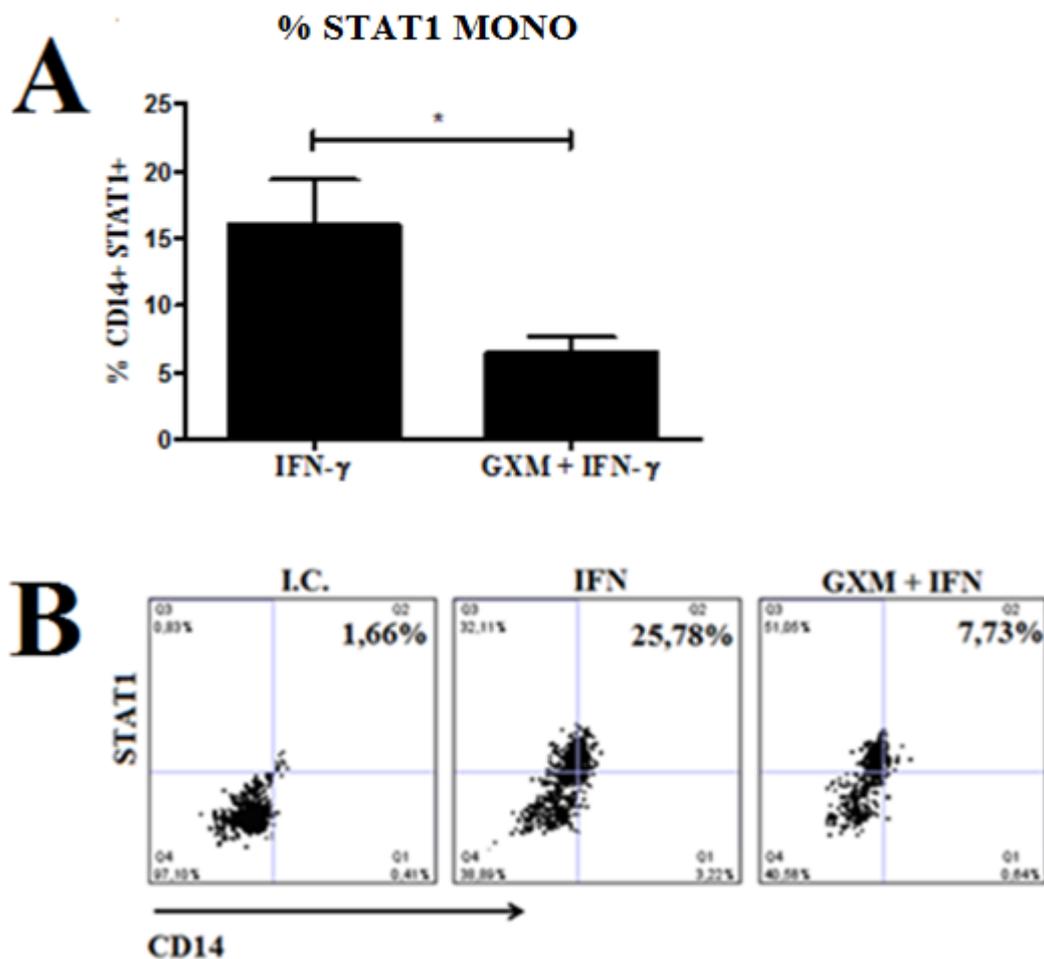


Figura 12: Fosforilação de STAT1 por células CD14⁺ pré-tratadas com GXM. PBMCs foram pré-tratados com GXM, como descrito em materiais e métodos. (A) Mostra a porcentagem de eventos duplo-positivos para CD14⁺/STAT1⁺ dentro da região (“gate”) de células mononucleares pré-estabelecido conforme CD14⁺ (FL1-FITC) versus STAT1 (FL2-PE), após

pré-tratamento com GXM + IFN- γ ou somente IFN- γ (controle positivo). (B) Mostra o gráfico em dotplot, exibindo a população duplo positiva para CD14 e STAT1 no quadrante Q2 nos grupos Isotipo Controle (I.C.), IFN- γ e GXM + IFN- γ . Os resultados exibidos no painel B são dados de 1 experimento representativo de um total de 6 experimentos similares. A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur (BECTON DICKINSON). Todos os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software FlowJo, em plataforma Windows. *, $p < 0.05$.

7 DISCUSSÃO

A criptococose, micose causada por leveduras do *Cryptococcus* é uma importante infecção sistêmica, principalmente em pacientes com imunodepressão celular (contagem de linfócitos T CD4 inferior a 100 células/ μ L), onde na maioria dos casos fatais, ocorre o acometimento do SNC (PINTO-ALMEIDA et al., 2012).

Neste trabalho avaliamos a resposta imunológica *in vitro* de células polimorfonucleares e mononucleares humanas pré-tratadas com GXM, componente capsular de *C. neoformans*, e posteriormente estimuladas com IFN- γ recombinante. Para tal, foi quantificada a produção da quimiocina CXCL10 induzida após a interação do IFN- γ com seu receptor. Um dos processos iniciais empregados neste estudo foi avaliar a reatividade da GXM obtida das cepas utilizadas em nosso trabalho. Para tanto, foi utilizado o teste de aglutinação com partículas de látex (Criptolátex) em conjunto com a metodologia de ELISA, utilizando o anticorpo monoclonal 18b7 que reconhece uma estrutura geral e conservada da GXM. Este anticorpo é uma IgG1 com alta afinidade ao GXM de diferentes sorotipos de *Cryptococcus* e foi caracterizado em estudos anteriores (CASADEVALL et al., 1998) e utilizado em terapia clínica contra criptococose (LARSEN et al., 2005). A escolha na utilização do teste de aglutinação do látex foi devido a sua sensibilidade (100%) e especificidade (96%) na detecção da criptococose e por ser um método comumente empregado nos laboratórios (BINNICKER et al., 2012; SAHA et al., 2009; DOMINIC et al., 2009; CAPOOR et al., 2007). A GXM isolada em nosso estudo mostrou-se reativa ao teste, com presença de aglutinação evidente em relação ao controle, e valores superiores ao controle positivo foram detectados nos ensaios de ELISA com anticorpo 18b7.

Posteriormente, a GXM foi testada no intuito de avaliar sua citotoxicidade para PMN e PBMC *in vitro*, e para isso foram realizados testes de viabilidade celular. A técnica de redução do MTT foi utilizada para avaliar o metabolismo de PMN e PBMC, e consequentemente a citotoxicidade e atividade das mesmas. As figuras 2 e 3 mostram que a GXM isolada de *C. neoformans* não exerceu efeito tóxico sobre as células, não sendo detectada nenhuma alteração significativa na metabolização do MTT em PMN e PBMC incubados com a GXM quando comparado ao controle (ausência da GXM). O teste de incorporação de azul de tripan mostrou que as células apresentaram viabilidade celular superior a 96%. Após resultados satisfatórios que excluam o potencial citotóxico da GXM

sobre os leucócitos humanos, iniciamos ensaios *in vitro* com cultura de PMN e PBMC pré-tratados com GXM e posteriormente estimulados com IFN- γ recombinante.

Para uma infinidade de respostas imunológicas os estudos *in vitro* são uma das alternativas utilizadas para avaliar desde o bloqueio até uma superexpressão de citocinas e quimiocinas dentre outros. Através disto, estudos cada vez mais detalhados, que possam fornecer informações seguras sobre concentrações de substâncias aliadas ao tempo de exposição de células a produtos químicos, podem fornecer informações valiosas sobre mecanismos de ação e toxicidade provocados nos ensaios.

Como fonte de pesquisa e estudos futuros, a utilização destes ensaios vem aumentando com o passar dos anos (SPIELMANN et al., 2008). O cultivo celular envolve diversos parâmetros, uma vez que sua função é o alvo principal de pesquisas clínicas e pré-clínicas. Com o passar dos anos, torna-se necessário o conhecimento sobre os processos de envelhecimento e perda da função de células em cultura, e este processo pode ser devido entre outros fatores, proveniente de cultivo prolongado. Propriedades biológicas de células envelhecidas sofrem em termos de proliferação, diferenciação e habilidades migratórias, processo que pode ocorrer em culturas muito longas (FREITAS et al., 2012). Nossos resultados demonstram que o melhor tempo para a produção da quimiocina CXCL10 foi após o período de 18 horas de cultura, o que não acarretou dano celular.

Os interferons (IFN) são uma família de pequenas glicoproteínas reguladoras, capazes de desempenhar um papel central na defesa contra diversas infecções. Embora a descoberta inicial sobre os IFNs demonstrasse uma atividade antiviral, hoje eles são conhecidos como uma parte integrante da rede de citocinas e quimiocinas que afetam uma grande variedade de processos biológicos. Exercem seus efeitos pleiotrópicos através da superfície celular e subunidades múltiplas de receptores, onde se acredita que seu controle seja realizado preferencialmente no receptor e níveis pós-receptor (VAREDI, 2005). É uma citocina do perfil Th1, produzida por diferentes tipos de células, que regula o sistema imunológico induzindo a síntese de citocinas e quimiocinas, como por exemplo, CXCL10, capaz de atrair e recrutar outras células para o local da infecção (WORMLEY et al., 2007; LIU et al., 2011).

CXCL10 ou proteína de 10 kDa induzível por interferon (IP-10) é uma quimiocina com atividade quimiotática potente em células T ativadas, neutrófilos, células endoteliais de veia umbilical, fibroblastos, dentre outros. As propriedades biológicas de CXCL10 são mediadas através da interação com uma proteína G transmembrânica acoplada ao receptor

CXCR3 ou de forma independente do receptor CXCR3, por um mecanismo de afinidade de ligação a glicosaminoglicanos (CAMPANELLA; COLVIN; LUSTER, 2010).

Além de suas inúmeras funções, a CXCL10 é reconhecida como um biomarcador que indica a gravidade e severidade de várias doenças como: malária cerebral fatal, tripanossomíase africana humana tardia, tuberculose, hanseníase virchowiana tipo 1, degeneração macular, atividade antitumoral *in vivo*, dentre outros (LUCCHI et al., 2011; AMIN et al., 2009; YASSIN et al., 2011; MO et al., 2010; STEFANI et al., 2009; YANG et al., 2006). Essa característica de biomarcador é conferida a esta quimiocina devido a: I – fácil realização, ausência de métodos invasivos, onde amostras biológicas como sangue, urina e LCR podem ser utilizadas para sua mensuração; II – rapidez nos ensaios, técnica exequível e padronizada; III – sensibilidade elevada para sua detecção; IV – especificidade.

No trabalho de Yang et al., (2006), que utilizou um modelo de tumor experimental em ratos, foi demonstrado que o crescimento *in vivo* de células de carcinoma mamário foi inibido nas células que albergavam o gene de CXCL10. Além disso, a cultura de células cancerígenas na presença de CXCL10 não só foi capaz de atrair células T no tecido que continha células malignas, mas também melhorou a proliferação, sobrevivência, atividade citolítica e ativação de linfócitos antitumorais, auxiliando na regressão do tumor.

Atualmente existem alguns relatos sobre o efeito de CXCL10 no controle de infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares. Durante ao curso da infecção por *Leishmania amazonensis*, o tratamento com CXCL10 aumenta diretamente a produção de IL-12p40, através do aumento da expressão do receptor IL-12 β 2, aumento da produção de IFN- γ e da função de células dendríticas, especialistas na apresentação de antígenos, reduzindo os efeitos deletérios provocados pelo protozoário (VASQUEZ, XIN e SOONG, 2008). Durante a leishmaniose ativa, células de lesões de pacientes produzem CXCL10, o que resulta na destruição do parasita. Além disto, amostras de soro de pacientes com leishmaniose tegumentar americana apresentam grandes quantidades de CXCL10, quimiocina que contribui para o recrutamento celular e para a cura do paciente (VARGAS-INCHAUSTEGUI et al., 2010).

O objetivo central do nosso trabalho foi analisar as possíveis alterações na resposta de PMN e PBMC humanas ao IFN- γ frente o tratamento com GXM, que são os antígenos polissacarídicos liberados pelo fungo durante as infecções *in vivo*. No nosso trabalho os resultados mostraram claramente que a GXM de *C. neoformans* é capaz de inibir a produção de CXCL10 de forma dose-dependente por PMN e PBMC humanas após estímulo com IFN- γ recombinante humano.

Diversos trabalhos têm mostrando alguns efeitos da GXM frente ao sistema imune, como ligação e internalização da mesma por macrófagos peritoneais, produção de CXCL8 por células alveolares humanas, indução da apoptose em macrófagos, interação com CD14 e TLR4, redução da fagocitose, inibição da apresentação de antígenos, indução de TNF- α , IL-1 β e IL-8 por PMN e ligação ao receptor CD18 em neutrófilos, o que conseqüentemente poderia resultar em inibição do seu influxo para os tecidos, produção de óxido nítrico e inibição da fosforilação de NF-kB (CHANG et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CHIAPELLO et al., 2008; SHOHAM et al., 2001; ZARAGOZA et al., 2009; RETINI et al., 1996; FONSECA et al., 2010; DONG; MURPHY, 1997; MONARI et al., 2005). Entretanto, não existem trabalhos, que sejam do nosso conhecimento, que abordem concomitantemente os efeitos da GXM de *C. neoformans* sobre a produção de CXCL10, resposta celular e sinalização ao IFN- γ , alterações no receptor CD119 e fosforilação de STAT1.

Visto que o *Cryptococcus* possui inúmeros mecanismos de escape do sistema imune, seria de extrema importância conhecer as formas de evasão utilizadas pelo fungo para causar patogenicidade. O papel da CXCL10 foi descoberto em inúmeras doenças infecciosas, e suas características a tornaram um alvo promissor para tratamentos futuros. No entanto, seu mecanismo de atuação ainda permanece incerto. A implicação da CXCL10 em doenças virais engloba desde proteção ao sistema imune contra hepatite B e C, vírus ebola e dengue até mesmo sua correlação com sinais de demência associada ao HIV, através de efeitos derivados de sua neurotoxicidade em astrócitos. Em pacientes com encefalite e dengue, também foi descrita a elevação de CXCL10 no LCR dos mesmos (ZAJKOWSKA et al., 2011; WILLIAMS et al., 2009).

A CXCL10 desempenha papel importante nas infecções bacterianas causadas por *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella pneumophila*, ou nos modelos causadores de pneumonia e tuberculose. Na tuberculose, a produção de CXCL10 foi detectada em altas concentrações em crianças que apresentavam a infecção (YASSIN et al., 2011). Poucos estudos sobre CXCL10 em infecções fúngicas foram descritos. Na candidíase, a presença de CXCL10 é capaz de inibir o crescimento do fungo, reduzindo assim a inflamação *in vivo*, e diminuindo os efeitos deletérios causados por *Candida albicans* (LIU et al., 2014). Em ratos infectados com *C. neoformans* que receberam tratamento com CXCL10, a quimiocina conferiu caráter protetor (LIU et al., 2011).

Uma série de experimentos clínicos tem demonstrado a importância do IFN- γ no controle de doenças. Estudos apontam que a utilização da terapia gênica no intuito de liberar IFN- γ no SNC, superando as barreiras hematoencefálicas pode ser útil no combate de

meningites fúngicas, como criptococose. A presença deste vetor no SNC poderia resultar em produção prolongada de IFN- γ por células hospedeiras (STEVENS; BRUMMER; CLEMONS, 2006). Flynn et al., (1993) demonstraram que ratos privados de genes produtores de IFN- γ desenvolveram infecção rápida e fulminante por *M. tuberculosis*, ao contrário dos ratos controle. Bava et al., (1995) desenvolveram um estudo *in vivo* em ratos mostrando que o tratamento com IFN- γ prolongou a sobrevivência dos mesmos frente à criptococose. Ainda no mesmo modelo, Zhou et al., (2007) revelaram que o IFN- γ foi capaz de ativar células da micróglia e induzir a expressão de MHC II nestas células, o que resultou na sobrevivência dos animais, o que em ratos nocaute para IFN- γ e IFN- γ R não ocorreu, elevando a taxa de letalidade.

Uma série de estudos que envolvem a imunoterapia adjuvante com IFN- γ recombinante indica que indivíduos com infecções invasivas são capazes de restaurar parcialmente as funções do sistema imunológico, principalmente em respostas derivadas de células efectoras. Os efeitos benéficos do IFN- γ em combinação com a terapia antifúngica são demonstrados em estudos clínicos e relatos de caso, e os resultados indicam que esta molécula é capaz de ativar fagócitos, controlar o processo infeccioso e promover a cura da doença (SAULSBURY, 2001; RIDDELL et al., 2001; JARVIS et al., 2012; DIGNANI et al., 2005; ELLIS et al., 2002; KELLEHER et al., 2006; NETEA et al., 2004; DELSING et al., 2014; STEVENS; BRUMMER; CLEMONS, 2006).

A imunização de ratos com cepa H99- γ (produtora de IFN- γ) direciona a resposta imunológica para a produção de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-12) com consequente redução das citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), além de reduzir o número de UFC no pulmão e aumentar a fungistasia com maior produção de NO (HARDISON et al., 2012). Em modelos de criptococose com imunização por IFN- γ , houve diminuição de UFCs, aumento da produção de citocinas e quimiocinas tipo Th1, redução da produção de citocinas Th2 no pulmão de ratos imunizados com a cepa H99 produtora de IFN- γ , além do que ratos nocaute para IFN- γ foram incapazes de sobreviver à infecção pulmonar pelo *C. neoformans* (WOZNIAK et al., 2009). Em um modelo de criptococose *in vivo* em ratos, o uso de IFN- γ juntamente com anfotericina B potencializou o efeito da droga no SNC, o sítio de infecção mais importante de acometimento pelo *C. neoformans* (LUTZ, CLEMONS e STEVENS, 2000).

Em nosso estudo, a GXM de *C. neoformans* foi capaz de afetar a resposta de PMN e PBMC ao IFN- γ , e esta inibição poderia ser responsável por desencadear alguns eventos, tais como: I - ativação alternativa de macrófagos, que estimularia a produção de moléculas anti-

inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13, níveis elevados de arginase I, expressão do receptor de manose e níveis baixos de NO e de ERO; II – diminuir a quimiotaxia de células T para locais da inflamação, inibir a função de células dendríticas em apresentar antígenos, limitar a produção de citocinas inflamatórias, além de exercer um ciclo negativo sobre a própria produção de IFN- γ (VASQUEZ; XIN; SOONG, 2008; LABUZEK et al., 2013).

Similarmente ao *Cryptococcus*, *Leishmania* é um patógeno intracelular, e seu controle requer indução de macrófagos ativados. O IFN- γ é a citocina mais potente para indução da atividade leishmanicida, e sua escassez é capaz de impedir ou mesmo bloquear a função de macrófagos, auxiliando a sobrevivência e replicação do parasita nestas células (CARRERA et al., 1996). Os relatos anteriores demonstram o quão importante se torna conhecer os mecanismos associados às alterações da resposta ao IFN- γ e consequente produção de CXCL10 em células humanas, pois estas implicações podem constituir-se em um mecanismo de escape desenvolvido pelo *C. neoformans*.

A regulação da produção de CXCL10 pode estar vinculada a vários mecanismos. O equilíbrio na produção de citocinas e mediadores inflamatórios são essenciais para a produção de uma resposta imunitária adequada, sendo que a expressão de CXCL10 pode ser crucial para o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica eficaz. Alterações no RNAm de CXCL10 juntamente com a expressão de proteínas têm sido associadas com a patogênese de várias doenças infecciosas, inflamatórias, crônicas e autoimunes, inclusive o câncer.

Os resultados obtidos nos experimentos iniciais de nosso trabalho nos levaram a formular a hipótese de que o efeito inibitório da GXM sobre a produção de CXCL10 poderia estar ocorrendo através da modulação da expressão da cadeia alfa do receptor de IFN- γ (IFN- γ R1/CD119). Essa modulação causada pela GXM poderia estar envolvida em vários processos. A via de sinalização que o IFN- γ atua envolve, além do próprio IFN- γ , os receptores IFN- γ R1 (alfa) e IFN- γ R2 (beta), JAK1, JAK2, a fosforilação dos domínios dos receptores, STAT1 e outras moléculas, que de alguma forma poderiam ser modulados por este componente capsular do fungo, desde o citoplasma até o núcleo. Esta sinalização demonstra que o ciclo IFN- γ /IFN- γ R, JAK-STAT e CXCL10 funciona em efeito cascata, onde o primeiro ativa o segundo, que por sua vez induz a síntese do último.

Em um modelo de criptococose murina ficou evidente que ratos com deleções no gene do receptor de IFN- γ foram mais susceptíveis a infecção por *C. neoformans*, e que na ausência da sinalização o número de UFCs aumentou durante curso da infecção que se disseminou para o SNC. A ausência do receptor de IFN- γ promoveu, após 5 semanas, um

extenso infiltrado pulmonar, com recrutamento de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos (CHEN et al., 2005).

As deficiências de IFN- γ R descritas em humanos, causadas por mutações gênicas revelam que o fenótipo principal desse defeito é a susceptibilidade anormal à infecções causadas por micobactérias não patogênicas. Infelizmente esses pacientes exibem infecções sistêmicas e frequentemente morrem em consequência destas. Pacientes com comprometimento total de IFN- γ R1 e IFN- γ R2 apresentam infecção grave e rápida, muitas vezes fatal. No relato de caso de Jouanguy et al., (1996), uma criança que foi vacinada com um mês de idade e apresentava mutação no gene de IFN- γ R1, morreu oito meses após, apresentando falha múltipla de órgãos, hepatoesplenomegalia, caquexia, aumento de linfonodos, dermatite granulomatosa, pneumonite crônica e febre. Entretanto, a deficiência parcial de IFN- γ R1 ou IFN- γ R2 pode ter uma apresentação clínica mais branda e diminuição de micobactérias (RUGELES et al., 2004).

Em nosso trabalho, investigamos, através de citometria de fluxo, a cadeia alfa do receptor do IFN- γ (IFN- γ R1) para avaliar o efeito da GXM na expressão desta molécula. Neste experimentos, ficou demonstrado que a GXM é capazes de inibir a produção de CXCL10 intracelular, provavelmente pela limitação da expressão do IFN- γ R1. Um elo importante entre o receptores de IFN e CXCL10 foi demonstrado por Biondo et al., (2008), onde camundongos nocaute para receptores de IFN α/β (IFN α/β R) podem evoluir para morte por pneumonia ou encefalite, quando infectados por *C. neoformans*, além de apresentarem concomitante redução dos níveis de CXCL10, do próprio IFN- γ e TNF α , com posterior aumento do infiltrado pulmonar eosinofílico e de citocinas tipo Th2 (IL-13, IL-4, IL-5 e IL-10) em relação aos camundongos selvagens.

Uma das diversas justificativas para a modulação na expressão de CD119 através da pré-incubação com GXM de *C. neoformans*, poderia ser a interferência na via de sinalização JAK/STAT, acarretando bloqueio, inibição ou diminuição na transcrição de genes induzidos por IFN- γ , fato diretamente correlacionado a diminuição evidente na produção de CXCL10. Sendo a GXM constantemente liberada em grandes quantidades na corrente sanguínea dos indivíduos infectados, poderia ocorrer a diminuição da produção de CXCL10 *in vivo*, assim como nos ensaios *in vitro*, se tornando um mecanismo de escape para este fungo.

Os nossos resultados que demonstraram a redução na produção de CXCL10 em sobrenadantes de cultura, foram reforçados pelos experimentos utilizando citometria de fluxo intracelular, para analisar se o efeito modulador após tratamento com GXM era devido à inibição da síntese ou alterações nos mecanismos posteriores de secreção desta quimiocina

por PMN e PBMC. Verificamos que após a incubação com GXM de *C. neoformans*, houve diminuição na síntese intracelular de CXCL10 tanto em PMN como em PBMC.

Trabalhos anteriores enfatizam que a resposta anticriptocócica efetiva é do perfil Th1. (QIU et al., 2012; JAIN et al., 2009; HARDISON et al., 2010; ARORA et al., 2011; PIEHLER et al., 2011). O balanço entre citocinas e quimiocinas produzidas na criptococose é que vai indicar a resolução ou progressão da infecção. Cepas altamente virulentas, como H99 são capazes de induzir uma resposta imune polarizada com perfil Th2 nos pulmões e burlar as defesas do hospedeiro no cérebro, independente de uma resposta Th1 previamente estabelecida. Esta polarização é um dos mecanismos de defesa do fungo para evadir-se das respostas do hospedeiro, com maiores acometimentos pulmonares e tropismo pelo SNC (ZHANG et al., 2009).

Os mecanismos de escape do *C. neoformans* envolvem diversos fatores, como, ph, anoxia, privação de nutrientes, produção de melanina e manitol, superóxido dismutase, proteases, fosfolipases e inibição da produção de NO e ERO (BROWN; CAMPBELL; LODGE, 2007; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014). Outros mecanismos exploram a interação de *Cryptococcus* com células hospedeiras, modificando as funções efetoras do sistema imune, como por exemplo, bloqueio de vias de sinalização intracelular. A modulação da resposta celular ao IFN- γ encontrada em nossos resultados pode ser um dos caminhos que o fungo se utiliza para burlar as defesas do hospedeiro e proliferar. Durante a criptococose, a GXM é secretada no sangue e LCR em grandes quantidades, e o aumento das concentrações deste antígeno polissacarídico desencadeia efeitos deletérios por induzir hiporresponsividade, tolerância imunológica e inibição da migração leucocitária (LEVITZ, 2002; YAUCH, MANSOUR e LEVITZ, 2005).

A via JAK/STAT tem um papel importante no controle das respostas imunes frente a diversas infecções. Sua regulação está associada a produção de citocinas, fatores de crescimento na hematopoiese, regulação imune, fertilidade, lactação, crescimento e embriogênese. A ligação do IFN- γ aos dímeros no domínio extracelular da subunidade do receptor conduz o IFN γ R1 ao acoplamento da subunidade IFN- γ R2, o que faz com que JAK1 e JAK2 fosforilem e cruzem as subunidades do receptor. Os homodímeros paralelos de STAT1 são então recrutados para os receptores, e a sua fosforilação converte os homodímeros numa configuração antiparalela. Os homodímeros STAT1 reorientados translocam-se para o núcleo, onde se ligam às sequências ativadas gama (GAS), incluindo fator 1 regulador de IFN- γ , que posteriormente ativa um grande número de genes que realizam uma série de funções imunomoduladoras.

A regulação negativa da via JAK-STAT é realizada por três mecanismos principais, que incluem fosfatases (SHP1 e 2, CD45), proteínas inibidoras de ativação de STAT (PIAS) e proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS). As proteínas SOCS servem como as principais reguladoras negativas da via IFN- γ inibindo a fosforilação da JAKs e STAT1 (ZAIDI e MERLINO, 2011; FURQAN et al., 2013). Na criptococose, em ratos imunizados com uma cepa produtora de IFN- γ (H99 γ), a proteção dos mesmos se dá quando macrófagos são ativados de forma clássica, com aumento da atividade da NO sintase e da fungistasia do *C. neoformans* e quando há indução de citocinas Th1, e isto só ocorre com a ativação da via de sinalização mediada por STAT1 (HARDISON et al., 2012). A carência de STAT1 constitui uma imunodeficiência rara, que afeta a resposta imune inata durante a resposta contra patógenos intracelulares, como é o caso do *Cryptococcus*, que em muitos casos pode levar o paciente a infecções muito severas (VAIRO et al., 2011).

Dentre os vários modelos de infecção para mimetizar a criptococose e seus efeitos, encontramos a interação de *C. neoformans* com linhagens celulares de seres humanos, camundongos e ratos, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos, que desempenham funções relacionadas à remoção do fungo e estabelecimento das respostas imunológicas (SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014). Uma vez que os efeitos em monócitos são consequência desta sinalização, a fosforilação de STAT1 foi avaliada em PBMC cultivados com GXM. Comparados com o controle positivo (IFN- γ 100ng), o pré-tratamento de PBMC com GXM provocou redução significativa na fosforilação de STAT1 em monócitos CD14⁺.

Avaliamos também a fosforilação de STAT1 em PMN, mas não fomos capazes de detectar aumento de fosforilação no controle positivo estimulado com IFN- γ em relação às células não estimuladas o que inviabilizou a análise do efeito da GXM sobre a de fosforilação de STAT1 em PMN (dados não mostrados). O fato dos PMN serem células de vida mais curta e mais lábeis em cultura pode ter contribuído para a não detecção de fosforilação de STAT1 em nossos experimentos. Para uma infinidade de respostas biológicas a sinalização derivada da via IFN- γ e CD119 são cruciais, pois é através desta que ocorre a quimiotaxia, liberação de NO e ROS, aumento de CXCL10 e IFN- γ .

Um exemplo bem correlacionado a esta cascata de ativações, foi demonstrado no estudo de Bussmeyer et al., (2010) com a bactéria intracelular *Anaplasma phagocytophilum* em cultura com PMN, onde ratos deficientes em IFN- γ apresentaram aumento na carga bacteriana, demonstrando o papel protetor do IFN- γ no controle desta infecção. Além disto houve a diminuição de CXCL9, CXCL10, diminuição na expressão do receptor de IFN- γ e na

fosforilação de STAT1, com aumento de SOCS1 e SOCS3. Ficou provado desta forma que a resposta celular ao IFN- γ ativa mecanismos antibacterianos e um comprometimento nesta via de sinalização contribui para a sobrevivência da bactéria em PMN e desenvolvimento da doença. Outro estudo que avaliava o comportamento do gene codificador do receptor de IFN- γ mostrou que camundongos nocautes para este gene foram mais susceptíveis à infecção por *C. neoformans*. Além disso, na ausência da sinalização via IFN- γ , a carga fúngica no pulmão continuava crescendo durante todo curso da infecção, disseminando-se para o cérebro (CHEN et al., 2005).

Nossos resultados mostraram uma inibição da resposta celular *in vitro* que pode estar correlacionada ao que acontece *in vivo* nos pacientes infectados pelo *C. neoformans*, onde a ativação do perfil Th2 se sobrepõe ao Th1, limitando o processo de resposta imune responsável pela expulsão do fungo. No estudo de Jarvis et al., (2013), linfócitos T CD4+ de pacientes HIV positivos com meningite criptocócica produziram quantidades variáveis de IFN- γ e TNF- α . No grupo de pacientes sobreviventes ocorreu a maior produção de IFN- γ e TNF- α , ao contrário dos pacientes que foram a óbito e não demonstraram resposta ativa com perfil de ativação Th1. Além disto, os pacientes sobreviventes apresentaram número de UFCs inferior aos pacientes que faleceram no período de duas semanas, onde respostas que apresentavam predomínio de IFN- γ e TNF- α foram associadas com a sobrevivência (JARVIS et al., 2013). Mora et al., (2015) realizaram um estudo envolvendo pacientes com AIDS e meningite criptocócica. Na comparação de pacientes que foram a óbito e sobreviventes, o primeiro grupo apresentou diminuição de IFN- γ , TNF- α , IL-12p40 e aumento de IL-4 e IL-10, corroborando com achados em modelo de criptococose murina.

Em nosso trabalho, após o tratamento com GXM houve diminuição de CXCL10 no sobrenadante de cultura de PMN e PBMC, o que por sua vez pode correlacionar-se com uma resposta pouco eficaz *in vivo* durante a criptococose. De alguma maneira, a GXM interfere na sinalização proveniente da estimulação pelo IFN- γ , pois seu receptor CD119 também é modulado durante a cultura *in vitro*, o que pode comprometer a resposta Th1, derivada da sinalização JAK/STAT. Esta falha na transdução de sinais, seja total ou parcial, pode ser observada indiretamente pelos próprios níveis de CXCL10 que se encontram diminuídos.

O conhecimento dos mecanismos de escape ou manipulação do sistema imune pelo *C. neoformans* são importantes para a compreensão da fisiopatologia da criptococose, e unir estudos que envolvam a ligação IFN- γ /receptor, transdução de sinais na via do IFN- γ e avaliação da fosforilação de STAT são ferramentas essenciais para contribuição ao desenvolvimento de novas estratégias clínicas e terapêuticas para a criptococose humana.

8 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados demonstram diversas alterações em PMNs e PBMCs humanos tratados com GXM de *C. neoformans*. A primeira alteração encontrada foi a capacidade da GXM diminuir, de forma dose-dependente, a produção de CXCL10 após a estimulação com IFN- γ . Detectamos também a modulação negativa da expressão da cadeia alfa do receptor do IFN- γ (IFN- γ R1) em PMN e PBMC pré-tratados com GXM. Posteriormente foi demonstrado que também existe redução na produção de CXCL10 intracelular de PMN e PBMC pré-incubados com GXM. Por fim, monócitos CD14+ cultivados com GXM apresentam menor fosforilação de STAT1 em resposta à estimulação com IFN- γ recombinante.

Em conclusão, os resultados mostram que a GXM de *C. neoformans* interfere na resposta do hospedeiro, através da modulação da resposta ao IFN- γ e de sua via de sinalização, que é essencial para a expulsão do fungo, o que pode representar um mecanismo de escape e sobrevivência desenvolvido por este patógeno no hospedeiro humano.

9 REFERÊNCIAS

ALCAIDE, M. L.; PARMIGIANI, A.; PALLIKKUTH, S.; et al. Immune Activation in HIV-Infected Aging Women on Antiretrovirals-Implications for Age-Associated Comorbidities: A Cross-Sectional Pilot Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–9, 2013.

ALMEIDA, G. M.; ANDRADE, R. M.; BENTO, C. A. The capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* activate normal CD4(+) T cells in a dominant Th2 pattern. **J Immunol**, v. 167, n. 10, p. 5845-51, 2001.

ALVAREZ, M.; BURN, T.; LUO, Y.; PIROFSKI, L.A.; CASADEVALL, A. The outcome of *Cryptococcus neoformans* intracellular pathogenesis in human monocytes. **BMC Microbiology**, v.9, n.51, p.1-9, 2009.

AMIN, D. N.; ROTTENBERG, M. E.; THOMSEN, A. R.; et al. Expression and role of CXCL10 during the encephalitic stage of experimental and clinical African trypanosomiasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, p. 1556–1565, 2009.

ANTONELLI, A.; FERRARI, S. M.; GIUGGIOLI, D.; FERRANNINI, E.; FERRI, C.; FALLAHI, P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, v.13, n.3, p.272-280, 2014.

ARORA, S.; HERNANDEZ, Y.; ERB-DOWNWARD, J. R.; MCDONALD, R.; TOEWS, G.; HUFFNAGLE, G. Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. **J Immunol**, v. 174, p. 6346–6356, 2005.

ARORA, S.; OLSZEWSKI, M. A.; TSANG, T. M.; MCDONALD, R. A.; TOEWS, G.B.; HUFFNAGLE, G. B. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 1915–1926, 2011.

ARTAL, E. M. Diagnóstico histopatológico de las micosis. **Journal of Histotechnology**, v. 21, p. 1–9, 2004.

BARBOSA, F. M.; FONSECA, F. L.; FIGUEIREDO, R. T.; BOZZA, M. T.; CASADEVALL, A.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L. Binding of glucuronoxylomannan to the CD14 receptor in human A549 alveolar cells induces interleukin-8 production. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 1, p. 94–98, 2007.

BARONI, F. A.; PAULA, C. R.; SILVA, E. G.; VIANI, F. C.; RIVERA, I. N.; OLIVEIRA, M. T.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Rev Inst Med Trop**.v.48, p.71-75, 2006.

BATISTA, M. V.; PIERROTTI, L. C.; ABDALA, E.; CLEMENTE, W. T.; GIRA, E. S.; ROSA, D. R. T.; IANHEZ, L. E.; BONAZZI, P. R.; LIMA, A. S.; FERNANDES, P. F. C. B. C.; PADUA-NETO, M. V.; BACCHELLA, T.; OLIVEIRA, A. P. P.; VIANA, C. F. G.; FERREIRA, M. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. **Tropical Medicine and International Health**, v. 16, n. 9, p. 1134–1142, 2011.

BAVA, A. J.; AFELTRA, J.; NEGRONI, R.; DIEZ, R. A. Interferon gamma increases survival in murine experimental cryptococcosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37, n. 5, p. 391-396, 1995.

BIANCHERI, D.; KANITAKIS, J.; BIENVENU, A.-L.; PICOT, S.; MORELON, E.; FAURE, M.; EUVRARD, S. Cutaneous cryptococcosis in solid organ transplant recipients: epidemiological, clinical, diagnostic and therapeutic features. **Eur J Dermatol**, v. 2012, n. October, p. 651–657, 2012.

BINNICKER, M. J.; JESPERSEN, D. J.; BESTROM, J. E.; ROLLINS, L. O. Comparison of four assays for the detection of cryptococcal antigen. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 12, p. 1988–1990, 2012.

BIONDO, C.; MIDIRI, A, GAMBUZZA, M.; GERACE, E.; FALDUTO, M.; GALBO, R.; BELLANTONI, A.; BENINATI, C.; TETI, G.; LEANDERSON, T.; MANCUSO, G. Ifn- α/β signaling is required for polarization of cytokine responses toward a protective type 1 pattern during experimental cryptococcosis. **J Immunol.**, v. 181, p. 566-573, 2008.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune response to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, p. 47–70, 2008.

BLUM, L.E.B., AMARANTE, C.V.T., VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. GUIMARÃES, L.S., DEZANET, A. & HACK NETO, P. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 4, p. 433-436, 2004.

BRATLAND, E.; HELLESEN, A.; HUSEBYE, E. S. Induction of CXCL10 chemokine in adrenocortical cells by stimulation through toll-like receptor 3. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 365, n. 1, p. 75-83, 2013.

BROWN, S. M.; CAMPBELL, L. T.; LODGE, J. K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 320–325, 2007.

BROWNELL, J.; POLYAK, S. J. Molecular pathways: hepatitis C virus, CXCL10, and the inflammatory road to liver cancer. **Clin Cancer Res.**, v.19. n.6, p.1347-1352, 2013.

BUSSE, V. O. Über parasitäre zelleinschlüsse und ihre züchtung. **Zentralbl Bakteriol**, v.16, p.175-180, 1984.

BUSSMEYER, U.; SARKAR, A.; BROSZAT, K.; LÜDEMANN, T.; MÖLLER, S.; VAN ZANDBERGEN, G.; BOGDAN, C.; BEHNEN, M.; DUMLER, JS.; VON LOEWENICH, FD.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Impairment of gamma interferon signaling in human neutrophils infected with *Anaplasma phagocytophilum*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 358–363, 2010.

BYRNES, E. J.; BILDFELL, R. J.; DEARING, P. L.; VALENTINE, B. A; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii* with bimorphic colony types in a dog in western Oregon: additional evidence for expansion of the Vancouver Island outbreak. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 21, n. 1, p. 133–136, 2009.

BYRNES, E. J.; LI, W.; REN, P.; LEWIT, Y.; VOELZ, K.; FRASER, J.; DIETRICH, F. MAY, R. CHATURDEVI, S.; CHATURDEVI, V.; HEITMAN, J. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in Southern Californian HIV/AIDS patients. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, 2011.

CALVERLEY, MATTHEW.; HARMSSEN, A. The facultative intracellular pathogen *Cryptococcus neoformans* is susceptible to in vivo clearance by alveolar macrophages (P4211) . **J Immunol.**, v.130, n.5, 2013.

CAMPANELLA, G. S. V; COLVIN, R. A.; LUSTER, A. D. CXCL10 can inhibit endothelial cell proliferation independently of CXCR3. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–10, 2010.

CANÓNICO-GONZÁLEZ, Y.; ADAME-RODRÍGUEZ, J. M.; MERCADO-HERNÁNDEZ, R.; ARÉCHIGA-CARVAJAL, E. T. *Cryptococcus* spp. isolation from excreta of pigeons (*Columba livia*) in and around Monterrey, Mexico. **SpringerPlus**, v.2, n.10, p.632-637, 2013.

CAPOOR, M.R.; NAIR, D.; DEB, M.; GUPTA, B.; AGGARWAL, P. Clinical and mycological profile of cryptococcosis in a tertiary care hospital. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 401-404, 2007.

CARLOS, W. G.; HAGE, C. A. Advances in the non-culture based laboratory diagnosis of *Cryptococcus* and the endemic molds. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 6, n. 3, p. 215-220, 2012.

CARRERA, L.; GAZZINELLI, R. T.; BADOLATO, R.; HIENY, S.; RALFK, W. M.; SACKS, D. L. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. February, p. 515–526, 1996.

CASADEVALL, A.; CASSONE, A.; BISTONI, F.; CUTLER, J. E.; MAGLIANI, W.; MURPHY, J. W.; POLONELLI, L.; ROMANI, L. Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute? **Med Mycol**, v. 36, n. 1, p. 95-105, 1998.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol.**, v. 3, n. 4, p. 354-358, 2000.

CASANOVA, J. L.; HOLLAND, S. M.; NOTARANGELO, L. D. Inborn errors of human JAKs and STATs. **Immunity**, v.36, n.4, p.515-528, 2012.

CASTELLÁ, G.; ABARCA, M. L.; JAVIER CABAÑES, F. Criptococosis y animales de compañía. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.25, p. S19–S24, 2008.

CHANG, Z. L.; NETSKI, D.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Binding and Internalization of Glucuronoxylomannan, the Major Capsular Polysaccharide of *C. neoformans*, by murine peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 144–151, 2006.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, p. 507–544, 2006.

CHEN, G.; MCDONALD, R. A.; WELLS, J. C.; HUFFNAGLE, G. B.; LUKACS, N. W.; TOEWS, G. B. The Gamma Interferon Receptor Is Required for the Protective Pulmonary Inflammatory Response to *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1788–1796, 2005.

CHENG, M. F.; CHIOU, C. C.; LIU, Y. C.; WANG, H. Z.; HSIEH, K. S. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 1608-1611, 2001.

CHIAPELLO, L. S.; BARONETTI, J. L.; GARRO, A. P.; SPESSO, M. F.; MASIH, D. T. *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric oxide in a caspase-independent pathway. **International Immunology**, v. 20, n. 12, p. 1527–1541, 2008.

CHRISTENSEN, J. E.; LEMOS, C.; MOOS, T.; CHRISTENSEN, J. P.; THOMSEN, A. R. CXCL10 Is the Key Ligand for CXCR3 on CD8 - Effector T cells involved in immune surveillance of the lymphocytic choriomeningitis virus-infected central nervous system. **J Immunol**, v. 176, p. 4235-4243, 2006.

CHUNG, H. L.; SHIN, J. Y.; JU, M.; KIM, W. T.; KIM, S. G. Decreased interleukin-18 response in asthmatic children with severe *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. **Cytokine**, v. 54, n. 2, p. 218-221, 2011.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, v. 2013, p. 1-23, 2013.

CONTIN, J. T.; QUARESMA, G. S.; FERNANDES DA SILVA, E.; LINARDI, V. R. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga , MG – Brasil. **Rev Med Gerais**, v. 21, n. 1, p. 19–24, 2011.

COSTA, C. H. Infecções pulmonares na Aids. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, v.1, n.9, p.54-60, 2010.

CRITCHLEY-THORNE, R. J.; YAN, N.; NACU, S.; WEBER, J.; HOLMES, S. P.; LEE, P.P. Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 5, p. 0897–0911, 2007.

DEAK, E.; PARK, B. J. Cryptococcal Meningitis - Global Public Health Challenges and Opportunities. **Eur Infect Dis**, v. 5, p. 83–7, 2011.

DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-75, 2004.

DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten Challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5, p. 303-310, 2012.

DIGNANI, M. C.; REX, J. H.; CHAN, K. W.; DOW, G.; MAGALHAES-SILVERMAN, M.; MADDOX, A.; WALSH, T.; ANAISSIE, E. Immunomodulation with interferon-gamma and

colony-stimulating factors for refractory fungal infections in patients with leukemia. **Cancer**, v.104, n.1, p.199-204, 2005.

DOMINIC, R. S.; PRASHANTH, H.; SHENOY, S.; BALIGA, S. Diagnostic value of latex agglutination in cryptococcal meningitis. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 1, p. 67, 2009.

DONG, S.; ZHANG, X.; HE, Y.; XU, F.; LI, D.; XU, W.; WANG, H.; YIN, Y.; CAO, J. Synergy of IL-27 and TNF- α in Regulating CXCL10 Expression in Lung Fibroblasts. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 48, n. 4, p. 518–530, 2013.

DONG, Z. M.; MURPHY, J. W. Effects of the varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2544–2632, 1995.

DONG, Z. M.; MURPHY, J. W. Cryptococcal polysaccharides bind to CD18 on human neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 557–563, 1997.

DUNCAN, C.; STEPHEN, C.; CAMPBELL, J. Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 47, p. 993–998, 2006.

ECEVIT, I. Z.; CLANCY, C. J.; SCHMALFUSS, I. M.; NGUYEN, M. H. The poor prognosis of central nervous system cryptococcosis among nonimmunosuppressed patients: a call for better disease recognition and evaluation of adjuncts to antifungal therapy. **Clin Infect Dis.**, v. 42, n. 10, p. 1443-1447, 2006.

ELLERBROEK, P. M.; WALENKAMP, A. M.; HOEPELMAN, A. I.; COENJAERTS, F. E. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. **Curr Med Chem**, v,10, n.11, p.253-66, 2004.

ELLIS, M.; WATSON, R.; MCNABB, A.; LUKIC, M. L.; NORK, M. Massive intracerebral aspergillosis responding to combination high dose liposomal amphotericin B and cytokine therapy without surgery. **J Med Microbiol**, v.51, n.1, p.70-75, 2002.

FABER, D. R.; VAN DER GRAAF, Y.; WESTERINK, J.; KANHAI, D. A.; MONAJEMI, A.; VISSEREN, F. L. J. Hepatocyte growth factor and interferon- γ inducible protein-10 are related to visceral adiposity. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 43, p. 369–378, 2013.

FANG, F.C. Antimicrobial Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Concepts and Controversies. **Nature reviews**, v.2, p.820-832, 2004.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; NOVIKOFF, P.; CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* Is a Facultative Intracellular Pathogen in Murine Pulmonary Infection. **Infection and Immunity**, v.68, n.7, p.4225-4237, 2000.

FERREIRA, G. F.; BALTAZAR, L. D. M.; ALVES SANTOS, J. R.; et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. April, p. 1801–1811, 2013.

FLYNN, J. L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. J.; DALTON, D. K.; STEWART, T. A.; BLOOM B. R. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Exp Med.**, v.178, n.6, p.2249-2254, 1993.

FONSECA, F. L.; NOHARA, L. L.; CORDERO, R. J. B.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ALMEIDA, C.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES M. L. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3861–3870, 2010.

FREITAS, M. L.; PINHEIRO, D. M. L.; GINANI, F.; BARRETO, M. P. V.; BARBOZA, C. A. G. Influence of aging on the in vitro yield of mice bone marrow mesenchymal stem cells. **J Health Sci Inst.**, v. 10, n. 1988, p. 103–106, 2012.

FUKUI, A.; OHTA, K.; NISHI, H.; SHIGEISHI, H.; TOBIUME, K.; TAKECHI, M.; KAMATA, N. Interleukin-8 and CXCL10 expression in oral keratinocytes and fibroblasts via Toll-like receptors. **Microbiology and Immunology**, v. 57, n. 3, p. 198-206, 2013.

FURQAN, M.; MUKHI, N.; LEE, B.; LIU, D. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. **Biomarker research**, v. 1, p. 1–5, 2013.

GALANIS, E.; HOANG, L.; KIBSEY, P.; MORSHED, M.; PHILLIPS, P. Clinical presentation, diagnosis and management of *Cryptococcus gattii* cases: Lessons learned from British Columbia. **The Canadian journal of infectious diseases e medical microbiology**, v. 20, n.1, p.23–28, 2009.

GAZZONI, A. F.; PEGAS, K. L.; SEVERO, L. C. Histopathological techniques for diagnosing cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus*: case report. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 41, n. 1, p. 76-78, 2008.

GAZZONI, A. F.; SEVERO, C. B.; SALLES, E. F.; SEVERO, L. C. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 255–259, 2009.

GEORGI, A.; SCHNEEMANN, M.; TINTELNOT, K.; CALLIGARIS-MAIBACH, R.C.; MEYER, S.; WEBER, R.; BOSSHARD, P.P. *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis in an immunocompetent person 13 months after exposure. **Infection**, v. 37, n. 4, p. 370–373, 2009.

GUO, J.; ZHOU, J.; ZHANG, S.; et al. A case-control study of risk factors for HIV-negative children with cryptococcal meningitis in Shi Jiazhuang, China. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 376, 2012.

GUPTA, G.; MAJUMDAR, S.; ADHIKARI, A.; BHATTACHARYA, P.; MUKHERJEE, A. K.; MAJUMDAR, S. B.; MAJUMDAR, S. Treatment with IP-10 induces host-protective immune response by regulating the T regulatory cell functioning in *Leishmania donovani*-infected mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 200, n. 4, p. 241-253, 2011.

HAGEN, F.; CERESINI, P. C.; POLACHECK, I.; et al. Ancient Dispersal of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

HAJJEH, R. A.; CONN, L. A.; STEPHENS, D. S.; BAUGHMAN, W.; HAMILL, R.; GRAVISS, E.; PAPPAS, P. G.; THOMAS, C.; REINGOLD, A.; ROTHROCK, G.; HUTWAGNER, L. C.; SCHUCHAT, A.; BRANDT, M. E.; PINNER, R. W. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. **J Infect Dis**, v. 179, n. 2, p. 449-54, 1999.

HARDISON, S. E.; HERRERA, G.; YOUNG, M. L.; HOLE, C. R.; WOZNIAK, K. L.; JR, F. L. W. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. **J Immunol**, v. 189, p. 4060–8, 2012.

HARDISON, S. E.; RAVI, S.; WOZNIAK, K. L.; YOUNG, M. L.; OLSZEWSKI, M. A.; WORMLEY JR, F. L. Pulmonary infection with an interferon-gamma-producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection. **The American journal of pathology**, v. 176, n. 2, p. 774–785, 2010.

HU, G.; STEEN, B. R.; LIAN, T.; SHAM, A. P.; TAM, N.; TANGEN, K. L.; KRONSTAD, J. W. Transcriptional regulation by protein kinase A in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathog.**, v.3, n.3, p.1-18, 2007.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E.S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol.**, v.40, n.4, p.1214-1218, 2002.

JAFARZADEH, A.; NEMATI, M.; REZAYATI, M. T.; KHORAMDEL, H.; NABIZADEH, M.; HASSANSHAHI, G.; ABDOLLAHI, H. Lower circulating levels of chemokine CXCL10 in *Helicobacter pylori* infected patients with peptic ulcer: Influence of the bacterial virulence factor CagA. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 28–35, 2013.

JAIN, N.; FRIES, B. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Mycopathologia**, v. 166, n. 4, p. 181-188, 2008.

JAIN, A. V.; ZHANG, Y.; FIELDS, W. B.; MCNAMARA, D. A.; CHOE, M. Y.; CHEN, G.; ERB-DOWNWARD, J.; OSTERHOLZER, J.; TOEWS, G.; HUFFNAGLE, G. B.; OLSZEWSKI, M. A. Th2 but not Th1 immune bias results in altered lung functions in a murine model of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 5389–5399, 2009.

JARVIS, J. N.; CASAZZA, J.P.; STONE, H.H.; MEINTJES, G.; LAWN, S.D.; LEVITZ, S.M.; HARRISON, T.S.; KROUP, R.A. The phenotype of the *Cryptococcus*-specific CD4+ memory T-cell response is associated with disease severity and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 12, p. 1817–1828, 2013.

JARVIS, J. N.; MEINTJES, G.; REBE, K.; WILLIAMS, G. N.; BICANIC, T.; WILLIAMS, A.; SCHUTZ, C.; BEKKER, L. G.; WOOD, R.; HARRISON, T.S. Adjunctive interferon-gamma immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized controlled trial. **Aids**, v.26, n.9, p.1105-1113, 2012.

JESUS, M. DE; NICOLA, A. M.; CHOW, S.-K.; LEE, I. R.; NONG, S.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M.; CASADEVALL, A. Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 500–508, 2010.

JOUANGUY, E.; ALTARE, F.; LAMHAMEDI, S.; REVY, P.; EMILE, J.F; NEWPORT, M.; LEVIN, M.; BLANCHE, S.; SEBOUN, E.; FISCHER, A.; CASANOVA, J.L. Interferon- γ -receptor deficiency in an infant with fatal bacille calmette-guérin infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 26, p. 1956–1961, 1996.

KAOCHAROEN, S.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; FIRACATIVE, C.; et al. Molecular Epidemiology Reveals Genetic Diversity amongst Isolates of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex in Thailand. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. 1-9, 2013.

KARACA, N. E.; Boisson-Dupuis, S.; Aksu, G.; Bustamante, J.; Kandiloglu, G.; Ozsan, N.; Hekimgil, M.; Casanova, J. L.; Kutukculer, N. Granulomatous skin lesions, severe scrotal and lower limb edema due to mycobacterial infections in a child with complete IFN- γ receptor-1 deficiency. **Immunotherapy**, v. 4, n. 11, p. 1121-1127, 2012.

KELLEHER, P.; GOODSALL, A.; MULGIRIGAMA, A.; KUNST, H.; HENDERSON, D. C.; WILSON, R.; NEWMAN-TAYLOR, A.; LEVIN, M. Interferon-gamma therapy in two patients with progressive chronic pulmonary aspergillosis. **Eur Respir J**, v.27, n.6, p.1307-1310, 2006.

KISENGE, P. R.; HAWKINS, A. T.; MARO, V. P.; MCHELE, J. P.; SWAI, N. S.; MUELLER, A.; HOUP, E. R. Low CD4 count plus coma predicts cryptococcal meningitis in Tanzania. **BMC Infect Dis.**, v.7, n.39, p.1-5, 2007.

KLEIN, K.R.; HALL, L.; DEML, S.M.; RYSAVY, J.M.; WOHLFIEL, S.L.; WENGENACK, N.L. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3669-3672, 2009.

KLICH, I.; FENDLER, W.; WYKA, K.; MŁYNARSKI, W. Effect of the IP10 (CXCL10) and HLA genotype on the risk of type 1 diabetes in children. **Pediatric endocrinology, diabetes, and metabolism**, v. 17, p. 10-13, 2011.

KORNIEJEWSKA, A.; WATSON, M.; WARD, S. Analysis of CXCR3 and atypical variant expression and signalling in human T lymphocytes. **Methods Mol Biol.**, v. 616, p. 125-147, 2010.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 574-587, 2006.

LABUZEK, K.; LIBER, S.; MACHNIK, G.; LIBER, J.; OKOPIEN, B. Eplerenone promotes alternative activation in human monocyte-derived macrophages. **Pharmacological Reports**, 2013.

LARSEN, R. A.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J.; ABERG, J. A.; CASADEVALL, A.; CLOUD, G. A.; JAMES, R.; FILLER, S.; DISMUKES, W. E. Phase I Evaluation of the Safety and Pharmacokinetics of Murine-Derived Anticryptococcal Antibody 18B7 in Subjects with Treated Cryptococcal Meningitis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 952-958, 2005.

LEE, Y.A.; KIM, H.J.; LEE, T.W.; KIM, M.J.; LEE, M.H.; LEE, J.H.; IHM, C.G. First report of *Cryptococcus albidus* – Induced disseminated cryptococcosis in a renal transplant recipient. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 19, n. 1, p. 53-57, 2004.

LEITE, JR, D. P.; AMADIO, J. V. R. S.; MARTINS, E.R.; SIMOES, S. A. A.; YAMAMOTO, A. C. A.; LEAL-SANTOS, F. A.; TAKAHARA, D. T.; HAHN, R. C. *Cryptococcus spp* isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **J Occup Med Toxicol.**, v.7, n.11, p.1-7, 2012.

LEVITZ, S. M. Receptor-mediated recognition of *Cryptococcus neoformans*. **Japanese journal of medical mycology**, v. 43, p. 133-136, 2002.

LINDENBERG, A. S. C.; CHANG, M. R.; PANIAGO, A. M. M.; LAZÉRA, M. S.; MONCADA, P. M. F.; BONFIM, G. F.; NOGUEIRA, S. A.; WANKE, B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, n.2, p.75-78, 2008.

LINDSLEY, M. D.; MEKHA, N.; BAGGETT, H. C.; SURINTHONG, Y.; AUTTHATEINCHAI, R.; SAWATWONG, P.; HARRIS, J. R.; PARK, B. J.; CHILLER, T.; BALAJEE, S. A.; POONWAN, N. Evaluation of a newly developed lateral flow immunoassay for the diagnosis of cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, p. 321-325, 2011.

LITVINTSEVA, A. P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol.**, v.43, n.2, p.556-64, 2005.

LIU, M.; GUO, S.; HIBBERT, J. M. .; JAIN, V.; SINGH, N.; WILSON, N. O.; STILES, J. K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 3, p. 121-130, 2011.

LIU, P.Y.; YANG, Y.; SHI, Z.-Y. Cryptococcal liver abscess: a case report of successful treatment with amphotericin-B and literature review. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 62, p. 59-60, 2009.

LIU, T.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, v. 3, p. 173-181, 2012.

LIU, X.; LING, Z.; LI, L.; RUAN, B. Invasive fungal infections in liver transplantation. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. e298-e304, 2011.

LIU, Y.; MA, S.; WANG, X.; XU, W.; TANG, J. *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. **Medical Mycology Case Reports**, v. 3, p. 8-10, 2014.

LUCCHI, N. W.; JAIN, V.; WILSON, N. O.; SINGH, N.; UDHAYAKUMAR, V.; STILES, J. K. Potential serological biomarkers of cerebral malaria. **Dis Markers**, v. 31, n. 6, p. 327-335, 2011.

LUNARDI, S.; JAMIESON, N. B.; LIM, S. Y.; GRIFFITHS, K. L.; CARVALHO-GASPAR, M.; AL-ASSAR, O.; YAMEEN, S.; CARTER, R. C.; MCKAY, C.; SPOLETINI, G.; D'UGO, S.; SILVA, M. A.; SANSOM, O.; JANSSEN, K. P.; MUSCHEL, R. J.; BRUNNER, T. IP-10/CXCL10 induction in human pancreatic cancer stroma influences lymphocytes recruitment and correlates with poor survival. **Oncotarget**, v.5, n.22, p.1064-1080, 2014.

LUO, H.; WANG, D.; CHE, H. L.; ZHAO, Y.; JIN, H. Pathological observations of lung inflammation after administration of IP-10 in influenza virus- and respiratory syncytial virus-infected mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 3, n. 92, p. 76-79, 2012.

LUTZ, J. E.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Enhancement of antifungal chemotherapy by interferon-gamma in experimental systemic cryptococcosis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, p. 437-442, 2000.

MA, H. & MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol.**, v.1, n.67, p.131-190, 2009.

MASCARENHAS-BATISTA, A. V.; SOUZA, N. M.; SACRAMENTO, E. Fatores prognósticos na meningite criptocócica em hospital de referência para doenças infecciosas. **Rev. baiana saúde pública**, v.37, n.1, p.68-89, 2013.

MCDUGALL, L.; FYFE, M.; ROMNEY, M.; STARR, M.; GALANIS, E. Risk Factors for *Cryptococcus gattii* Infection, British Columbia, Canada. **Emerg Infect Dis.**, v. 17, n. 2, p. 193-199, 2011.

MCFADDEN, D.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol**, v.14, n.11, p.497-505, 2006.

MCMULLAN, B. J.; HALLIDAY, C.; SORRELL, T. C.; et al. Clinical Utility of the Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay in a Diagnostic Mycology Laboratory. **PloS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-6, 2012.

MEZZARI, A.; WLIBBELING, A. M. P.; FREITAS, G. S. O.; MAY, G. G.; ALBE, G. C.; FILI, H. P.; PORTICH, J. P.; KISSMANN, N.; BEHAR, P.; VILELA, R. M. M. Criptococose em um Hospital Público de Porto Alegre: dados epidemiológicos. **J Infect Control**, v.2, n.3, p.135-139, 2013.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-48, 1995.

MONARI, C.; BISTONI, F.; CASADEVALL, A.; PERICOLINI, E.; PIETRELLA, D.; KOZEL, T. R.; VECCHIARELLI, A. Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. **The Journal of infectious diseases**, v. 191, p. 127-137, 2005.

MONARI, C.; RETINI, C.; CASADEVALL, A.; NETSKI, D.; BISTONI, F.; KOZEL, T. R.; VECCHIARELLI, A. Differences in outcome of the interaction between *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan and human monocytes and neutrophils. **European J Immunol**, v. 33, p. 1041-1051, 2003.

MORA, D. J.; COLOMBO, E. R. C.; FERREIRA-PAIM, K.; ANDRADE-SILVA, L. E.; NASCENTES, G. A. N.; SILVA-VERGARA, M. L. Clinical, Epidemiological and Outcome Features of Patients with Cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, p. 321-327, 2012.

MORA, D. J.; FORTUNATO, L. R.; ANDRADE-SILVA, L. E.; FERREIRA-PAIM, K.; ROCHA, I. H.; VASCONCELOS, R. R.; SILVA-TEIXEIRA, D. N.; NASCENTES, G. A.; SILVA-VERGARA, M. L. Cytokine profiles at admission can be related to outcome in AIDS patients with cryptococcal meningitis. **PLoS ONE**, v.10, n.3, p.1-17, 2015.

MORANOVA, Z.; KAWAMOTO, S.; RACLAVSKY, V. Hypoxia sensing in *Cryptococcus neoformans*: Biofilm-like adaptation for dormancy? **Biomedical Papers**, v. 153, n. 3, p. 189-193, 2009.

MOREIRA, T. A.; FERREIRA, M. S.; RIBAS, R. M.; BORGES, A. S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.39, n.3, p. 255-258, 2006.

MORETTI, M.; RESENDE, M.; LAZÉRA, M.; COLOMBO, A. L.; SHIKANAI-YASUDA, M. Consenso em Criptococose - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.

MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A. & COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v. 136, p. 2348-2357, 1986.

NAJJAR, I.; FAGARD, R. STAT1 and pathogens, not a friendly relationship. **Biochimie**, v.92, n.5, p.425-444, 2010.

NEVILLE, L. F.; MATHIAK, G.; BAGASRA, O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): A novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 8, p. 207-219, 1997.

NETEA, M. G.; BROUWER, A. E.; HOOGENDOORN, E. H.; VAN DER MEER, J. W.; KOOLEN, M.; VERWEIJ, P. E.; KULLBERG, B. J. Two patients with cryptococcal meningitis and idiopathic CD4 lymphopenia: defective cytokine production and reversal by recombinant interferon- gamma therapy. **Clin Infect Dis**, v.39, n.9, p.83-87, 2004.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG, Y.; SIONOV, E.; KWON-CHUNG, K. The Primary Target Organ of *Cryptococcus gattii* Is Different from That of *Cryptococcus neoformans* in a Murine Model. **mBio**, v. 3, n. 3, p. 1-9, 2012.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO B. R.; MACEDO, R. C.; BEZERRA, C. C.; PÉREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J Clin Microbiol.**, v.41, n.1, p.73-77, 2003.

NOROSE, K.; KIKUMURA, A.; LUSTER, A. D.; HUNTER, C. A.; HARRIS, T. H. CXCL10 is required to maintain T-cell populations and to control parasite replication during chronic ocular toxoplasmosis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 52, n. 1, p. 389-398, 2011.

OLIVEIRA, L.; MARTINS, M. A.; VIDAL, J. E.; SZESZS, M. W.; PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Report of filamentous forms in a mating type VNI clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from an HIV virus-infected patient. **Medical Mycology Case Reports**, v. 7, p. 4-7, 2015.

OSAZUWA, F.; DIRISU, J. O.; OKUONGHAE, P. E.; UGBEBOR, O. Screening for Cryptococcal Antigenemia in Anti-Retroviral Naïve AIDS Patients in Benin City, Nigeria. **Oman Medical Journal**, v.27, n.3, p.228-231, 2012.

PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 61-79, 2013.

PAZ RODRIGUEZ, M. T. Neurocriptococosis crónica en un paciente inmunocompetente. **Rev Ciencias Médicas**, v.18, n.6, p.1133-1139, 2014.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 16, n. 4, p. 837-74, 2002.

PIEHLER, D.; STENZEL, W.; GRAHNERT, A.; HELD, J.; RICHTER, L.; KÖHLER, G.; RICHTER, T.; ESCHKE, M.; ALBER, G.; MÜLLER, U. Eosinophils Contribute to IL-4 Production and Shape the T-Helper Cytokine Profile and Inflammatory Response in Pulmonary Cryptococcosis. **The American journal of pathology**, v. 179, n. 2, p. 733-744, 2011.

PINTO-ALMEIDA, T.; ARISTÓTELES, R.; AMORIM, I.; ALVES, R.; SELORES, M. Lesões cutâneas reveladoras de criptococose sistêmica num doente vih positivo. **Revista SPDV**, v.71, n.1, p.105-109, 2013.

QIU, Y.; DAVIS, M. J.; DAYRIT, J. K.; HADD, Z.; MEISTER, D.; OSTERHOLZER, J. J.; WILLAIMSON, P. R.; OLSZEWSKI, M. A. Immune Modulation Mediated by Cryptococcal Laccase Promotes Pulmonary Growth and Brain Dissemination of Virulent *Cryptococcus neoformans* in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1-14, 2012.

QU, H. Q.; FISHER-HOCH, S. P.; MCCORMICK, J. B. Molecular immunity to mycobacteria: Knowledge from the mutation and phenotype spectrum analysis of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 1-19, 2011.

RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; CHOWDHARY, A.; PREETI SINHA, K.; KHAN, Z. U.; SUN, S.; XU, J. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and

Cryptococcus neoformans and their isolations from surrounding soil in India. **Med Mycol.**, v. 46, n.8, p.823-833, 2008.

RETINI, C.; VECCHIARELLI, A; MONARI, C.; TASCINI, C.; BISTONI, F.; KOZEL, T. R. Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils. **Infection and immunity**, v. 64, n. 7, p. 2897-2903, 1996.

RIBEIRO, L. C.; HAHN, R. C.; FAVALESSA, O. C.; TADANO, T.; FONTES, J. F. Micoses sistêmicas: fatores associados ao óbito em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, Cuiabá, Estado de Mato Grosso, 2005-2008. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.42, n.6, p. 698-705, 2009.

RIBEIRO, M. A.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.50, n.6, p.315-320, 2008.

RIDDELL, L. A.; PINCHING, A. J.; HILL, S. N. G. T.T.; ARBE, E.; LAPHAM, G. P.; ASH, S.; HILLMAN, R.; TCHAMOUROFF, S.; DENNING, D. W.; PARKIN, J. M. A phase III study of recombinant human interferon gamma to prevent opportunistic infections in advanced HIV disease. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.17, n.9, p.789-797, 2001.

ROCHA, J. D. B.; NASCIMENTO, M. T. C.; DECOTE-RICARDO, D.; CÔRTE-REAL, S.; MORROT, A.; HEISE, N.; NUNES, M. P.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; DOSREIS, G. A.; SARAIVA, E. M.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8008, 2015.

ROMAGNANI, P.; BELTRAME, C.; ANNUNZIATO, F.; LASAGNI, L.; LUCONI, M.; GALLI, G.; COSMI, L.; MAGGI, E.; SALVADORI, M.; PUPILLI, C.; SERIO, M. Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. **JASN**, v. 10, p. 2518-2526, 1999.

RUGELES, M. T.; RINCÓN, B.; RUGELES, C.; MONTOYA, C. J.; HERNÁNDEZ, M.; ESTRADA, C.; OLIVARES, M. M.; PATIÑO, P. J. Normal expression of IFN- γ R in four patients with uncommon mycobacterial infection phenotypes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1353-1363, 2004.

SAHA, D. C.; XESS, I.; BISWAS, A.; BHOWMIK, D. M.; PADMA, M. V. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1098-1105, 2009.

SAHA, D. C.; XESS, I.; JAIN, N. Evaluation of conventional & serological methods for rapid diagnosis of cryptococcosis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 127, p. 483-488, 2008.

SALUJA, P.; PRASAD, G. S. *Cryptococcus rajasthanensis* sp. nov., an anamorphic yeast species related to *Cryptococcus laurentii*, isolated from Rajasthan, India. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 414-418, 2007.

SANFELICE, F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. **Ann. Igien.**, v.4, p.463-498, 1984.

SANTOS, W. R. A.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P. S. E.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L. M. MEDEIROS.; RITA, M.; BERNARDINA, P.; BEZERRA, C. C. F.;

MACÊDO, R. C. L.; FERREIRA, S. O.; BARBOSA, G. G.; PEREZ, M. A.; NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S. Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.8, p.813-818, 2008.

SAULSBURY, F.T. Successful treatment of aspergillus brain abscess with itraconazole and interferon-gamma in a patient with chronic granulomatous disease. **Clin Infect Dis**, v.32, n.10, 2001.

SCHOP, J. Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection. **McGill Journal of Medicine**, v. 10, n. 1, p. 35-43, 2007.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Capítulo 3: Criptococose pulmonar. **J bras pneumol**, vol. 35, n. 11, p. 1136-1144, 2009.

SHAH, H. S.; PATEL, D. A; VEGAD, M. M. Evaluation of conventional and serological methods for rapid diagnosis of cryptococcal meningitis in HIV seropositive patients at tertiary care hospital. **National Journal of Community Medicine**, v. 2, n. 3, p. 354-357, 2011.

SHANKAR, E.M.; KUMARASAMY, N.; BELLA, D.; RENUKA, S.; KOWNHAR, H.; SUNITI, S.; RAJAN, R.; RAO, U.A. Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. **Can Respir J.**, v. 13, n. 5, p. 275-278, 2006.

SHIRAKI, Y.; ISHIBASHI, Y.; HIRUMA, M.; NISHIKAWA, A.; IKEDA, S. *Candida albicans* abrogates the expression of interferon-gamma-inducible protein-10 in human keratinocytes. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 54, n. 1, p. 122-128, 2008.

SHOHAM, S.; HUANG, C.; CHEN, J. M.; GOLENBOCK, D. T.; LEVITZ, S. M. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **J Immunol**, v. 166, p. 4620-4626, 2001.

SILVA, D. C.; MARTINS, M. A.; SZESZS, M. W.; BONFIETTI, L. X.; MATOS, D.; MELHEM, M. S. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.72, n.4, p.332-339, 2012.

SILVA, M.; GAGLIANI, L. Diagnóstico e prevalência da meningite criptococócica em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida – Sida. **Revista Unilus Ensino e Pesquisa**, v. 11, n. 22, p. 23-44, 2014.

SING, U. P.; SINGH, R.; SINGH, S.; KARLS, R. K.; QUINN, F. D.; TAUB, D. D.; JR, J. W. L. CXCL10+ T cells and NK cells assist in the recruitment and activation of CXCR3+ and CXCL11+ leukocytes during Mycobacteria-enhanced colitis. **BMC immunology**, v. 9, p. 25, 2008.

SPIELMANN, H.; GRUNE, B.; LIEBSCH, M. SEILER, A.; VOGEL, R. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Experimental and toxicologic pathology**, v. 60, n. 2, p. 225-233, 2008.

SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 14-20, 2010.

SPRINGER, D. J.; REN, P.; RAINA, R.; DONG, Y.; BEHR, M. J.; MCEWEN, B. F.; BOWSER, S. S.; SAMSONOFF, W. A.; CHATURDEVI, S.; CHATURDEVI, V. Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.

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

STEFANI, M. M.; GUERRA, J. G.; SOUSA, A. L. M.; COSTA, M. B.; OLIVEIRA, M. L. W.; MARTELLI, C. T.; SCOLLARD, D. M. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC infectious diseases**, v. 9, p. 75, 2009.

STEVENS, D. A; BRUMMER, E.; CLEMONS, K. V. Interferon- gamma as an antifungal. **The Journal of infectious diseases**, v. 194 Suppl , p. S33-S37, 2006.

SUZUKI, Y.; AS, Q.; GEHMAN, M.; OCHIAI, E. Interferon-gamma- and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain. **Expert Rev Mol Med**, v.4, n.13, p.1-24, 2011.

TEIXEIRA, M. J.; FERNANDES, J. D.; TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B.; POMPEU, M. L.; SANTANA DA SILVA, J.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. Distinct leishmania braziliensis isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1191-1195, 2005.

TEODORO, V. L.; GULLO, F. P.; SARDI, J. C.; TORRES, E. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.46, n.6, p. 759-764, 2013.

THOMPSON, H. J. Not your “typical patient”: cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient. **J Neurosci Nurs.**, v. 37, n. 3, p. 144–148, 2005.

TOLFVENSTAM, T.; LINDBLOM, A.; SCHREIBER, M. J.; LING, L.; CHOW, A.; OOI, E. E.; HIBBERD, M. L. Characterization of early host responses in adults with dengue disease. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 209, 2011.

TSENG, H. K.; LIU, C. P.; HO, M. W.; et al. Microbiological, Epidemiological, and Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Cryptococcosis in Taiwan, 1997-2010. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.5, p.3165-3170, 2002.

VAIRO, D.; TASSONE, L.; TABELLINI, G.; TAMASSIA, N.; GASPERINI, S.; BAZZONI, F.; PLEBANI, A.; PORTA, F.; NOTARANGELO, LD.; PAROLINI, S.; GILIANI, S.;BADOLATO, R. Severe impairment of ifn- γ and ifn- α responses in cells of a patient with a novel stat1 splicing mutation. **Blood**, v. 118, n. 7, p. 1806-1817, 2011.

VAREDI, M. The Jak-Stat Signaling Pathway of Interferons System: Snapshots. **IJI**, v. 2, n. 2, p. 67-77, 2005.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; HOGG, A. E.; TULLIANO, G.; LLANOS-CUENTAS, A.; AREVALO, J.; ENDSLEY, J.; SOONG, L. CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* Infection. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 301-308, 2010.

VASQUEZ, R. E.; SOONG, L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 12, p. 6769-6777, 2006.

VASQUEZ, R. E.; XIN, L.; SOONG, L. Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ T-cell functions during *Leishmania amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 1, p. 161-169, 2008.

VECCHIARELLI, A. The cellular responses induced by the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* differ depending on the presence or absence of specific protective antibodies. **Curr Mol Med**, v.5, n.4, p. 413-20, Jun 2005.

VOELZ, K.; JOHNSTON, S. A.; SMITH, L. M.; HALL, R. A.; IDNURM, A.; MAY, R. C. "Division of labour" in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature Communications**, v. 5, p. 1-12, 2014.

VOELZ, K.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3450-3457, 2009.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 6, p. 835-846, 2010.

WIESNER, D. L.; MOSKALENKO, O.; JENNIFER, M. Cryptococcal Genotype Influences Immunological Response and Human Clinical Outcome after Meningitis. **mBio**, v. 3, n. 5, p. 1-10, 2012.

WILEY, R.; PALMER, K.; GAJEWSKA, B.; STAMPFLI, M. R.; ALVAREZ, D.; COYLE, A. J.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; JORDANA, M. Expression of the Th1 chemokine IFN-gamma-inducible protein 10 in the airway alters mucosal allergic sensitization in mice. **J Immunol**, v. 166, p. 2750-2759, 2001.

WILLIAMS, R.; DHILLON, N. K.; HEGDE, S. T.; YAO, H.; PENG, F.; CALLEN, S.; CHEBLOUNE, Y.; DAIS, R. L.; BUCH, S. J. Proinflammatory cytokines and HIV1 synergistically enhance CXL10 expression in human astrocytes. **Glia**, v. 57, n. 7, p. 734-743, 2009.

WONG, C. K.; LEUNG, K. M. L.; QIU, H. N.; CHOW, J. Y. S.; CHOI, A. O. K.; LAM, C. W. K. Activation of eosinophils interacting with dermal fibroblasts by pruritogenic cytokine IL-31 and alarmin IL-33: Implications in atopic dermatitis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

WORMLEY, F. L.; PERFECT, J. R.; STEELE, C.; COX, G. M. Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing *Cryptococcus neoformans* strain. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 3, p. 1453-1462, 2007.

WOZNIAK, K. L.; RAVI, S.; MACIAS, S.; YOUNG, M. L.; OLSZEWSKI, M. A.; STEELE, C.; JR, F. L. W. Insights into the mechanisms of protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection using a mouse model of pulmonary cryptococcosis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. 34-37, 2009.

WOZNIAK, K. L.; YOUNG, M. L.; WORMLEY JR, F. L. Protective Immunity against Experimental Pulmonary Cryptococcosis in T Cell-Depleted Mice. **Clin Vaccine Immunol.**, v. 18, n. 5, p. 717-723, 2011.

XIE, S.; SAO, R.; BRAUN, A.; BOTTONE, E. J. Difference in *Cryptococcus neoformans* cellular and capsule size in sequential pulmonary and meningeal infection: A postmortem study. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 49-52, 2012.

XU, W.; JOO, H.; CLAYTON, S.; DULLAERS, M.; HERVE, M. C.; BLANKENSHIP, D.; DE LA MORENA, M. T.; BALDERAS, R.; PICARD, C.; CASANOVA, J. L.; PASCUAL, V.; OH, S.; BANCHEREAU, J. Macrophages induce differentiation of plasma cells through CXCL10/IP-10. **J Exp Med.**, v. 209, n. 10, p. 1813-1823, 2012.

YANG, X.; CHU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, R.; XIONG, S. Targeted in vivo expression of IFN-g-inducible protein 10 induces specific antitumor activity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, p. 1434-1444, 2006.

YASSIN, M. A.; PETRUCCI, R.; GARIE, K. T.; HARPER, G.; ARBIDE, I.; ASCHALEW, M.; MERID, Y.; KEBEDE, Z.; BAWAZIR, A.A.; ABUAMER, M. N.; CUEVAS, L.E. Can interferon-gamma or interferon-gamma-induced-protein-10 differentiate tuberculosis infection and disease in children of high endemic areas? **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1-8, 2011.

YAUCH, L. E.; MANSOUR, M. K.; LEVITZ, S. M. Receptor-mediated clearance of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide *in vivo*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8429-8432, 2005.

YAUCH, L. E.; MANSOUR, M. K.; SHOHAM, S.; ROTTMAN, J. B.; LEVITZ, S. M. Involvement of CD14, Toll-Like Receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans in vivo*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5373-5382, 2004.

YU, T.; ZHENG, X. D. Indole-3-acetic acid enhances the biocontrol of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear fruit by *Cryptococcus laurentii*. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 459-464, 2007.

ZAIDI, M. R.; MERLINO, G. The two faces of interferon- γ in cancer. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 19, p. 6118-6124, 2011.

ZAJKOWSKA, J.; MONIUSZKO-MALINOWSKA, A.; PANCEWICZ, S. A.; MUSZYŃSKA-MAZUR, A.; KONDRUSIK, M.; GRYGORCZUK, S.; ŚWIERZBIŃSKA-PIJANOWSKA, R.; DUNAJ, J.; CZUPRYNA, P. Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 chemokines in serum and cerebrospinal fluid in patients with tick borne encephalitis (TBE). **Advances in Medical Sciences**, v. 56, p. 311-317, 2011.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZARAGOZA, O.; TELZAK, A.; BRYAN, R. A.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. **Mol Microbiol**, v.59, n.1, p.67-83, 2006.

ZHANG, H.Y.; FU, C.X.; ZHENG, X.D.; HE, D.; SHAN, L.J.; ZHAN, X. Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner in combination with sodium bicarbonate on biocontrol of postharvest green mold decay of citrus fruit. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 45, p. 159-164, 2004.

ZHANG, H.; ZHONG, Z.; PIROFSKI, L. A. Peptide epitopes recognized by a human anti-cryptococcal glucuronoxylomannan antibody. **Infect Immun**, v. 65, n. 4, p. 1158-1164, 1997.

ZHANG, Y.; WANG, F.; TOMPKINS, K. C.; MCNAMARA, A.; JAIN, A. V.; MOORE, B. B.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B., OLSZEWSKI, M. A. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. **The American journal of pathology**, v. 175, p. 2489-2500, 2009.

ZHOU, Q.; GAULT, R. A; KOZEL, T. R.; MURPHY, W. J. Protection from direct cerebral *Cryptococcus* infection by interferon-gamma-dependent activation of microglial cells. **J Immunol**, v. 178, p. 5753-5761, 2007.