



Universidade Federal do

Triângulo Mineiro

Karina Cristina da Cruz Freitas

Modulação da resposta de células epiteliais alveolar humanas tipo II infectadas com
Cryptococcus neoformans com a presença do receptor *FPR2/ALX*

Uberaba-MG

2022

Karina Cristina da Cruz Freitas

A modulação da resposta de células epiteliais alveolar humanas tipo II infectadas com *Cryptococcus neoformans* com a presença do receptor FPR2/ALX

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre

Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogerio

Co-orientadora: Dra. Aline Beatriz Mahler Pereira

Uberaba-MG

2022

Catálogo na fonte:

Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

F936m Freitas, Karina Cristina da Cruz
Modulação da resposta de células epiteliais alveolar humanas tipo II infectadas com *Cryptococcus neoformans* com a presença do receptor FPR2/ALX / Karina Cristina da Cruz Freitas. -- 2022.
37 p.: il., fig., graf.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022

Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogério

Coorientadora: Profa. Dra. Aline Beatriz Mahler Pereira

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Linhagem celular tumoral. 3. Células epiteliais alveolares. I. Rogério, Alexandre de Paula. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 582.28

Karina Cristina da Cruz Freitas

A modulação da resposta de células epiteliais alveolar humanas tipo II infectadas com *Cryptococcus neoformans* com a presença do receptor FPR2/ALX

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

_____ de _____ de _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogério - Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof.Dr. Paulo Roberto da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof.Dr. Gabriel Antonio Nogueira Nascentes
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Alexandre de Paula Rogério por ter me recebido tão bem em seu laboratório. Por me guiar, orientar e me ensinar a ser uma estudante melhor. Por entender meus erros e me auxiliar a corrigi-los. Por me ajudar a me tornar uma profissional melhor. Meus sinceros agradecimentos.

À minha co-orientadora Ms. Aline Beatriz Mahler Pereira por ter tido paciência com meus erros, por ter me ajudado com meu aprendizado. Por ter me ajudado tantas vezes que precisei. Agradeço por ter feito parte do meu crescimento.

Aos meus colegas de laboratório Henrique, Bruno, Gustavo, Roberta, Jhony e demais, mestrandos, doutorandos e alunos de IC, que me ajudaram seja com suas anotações, seja com parte de seu tempo para me ensinar.

Aos técnicos do LIFE-LIPAC por serem sempre muito receptivos e solícitos.

Ao professor Dr. Paulo Roberto da Silva por ter me apresentado ao professor Alexandre e por ter me aberto várias oportunidades.

Aos meus pais Juvenal e Marcilene e demais familiares que sempre viram potencial em mim.

À minha psicóloga Jacqueline por cuidar da minha saúde mental.

Aos colegas que ingressaram na graduação junto a mim, pela ajuda que muitos me deram em diversos momentos e pelas risadas também.

Ao meu amigo Ms. Roberto Augusto pelas diversas dicas e pelo companheirismo desde a graduação até agora na pós-graduação.

Aos professores da pós-graduação que contribuíram para a minha formação profissional. Muito obrigada pela dedicação de todos vocês.

Aos órgãos de fomento, CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo auxílio financeiro para realização desse trabalho.

A UFTM pela oportunidade por me permitir fazer parte de sua comunidade acadêmica.

RESUMO

O epitélio brônquico possui mecanismos de defesa baseados na imunidade inata contra vários microrganismos transportados pelo ar, incluindo *Cryptococcus neoformans*. O receptor 2 do peptídeo formil (FPR2/ALX), um receptor acoplado à proteína G (GPCR), desempenha um papel importante nos processos de inflamação e resolução, inclusive nas vias aéreas. Aqui, avaliamos os efeitos inflamatórios de *C. neoformans* usando células epiteliais A549, que não expressam FPR2/ALX, e A549 transfectadas com cDNA humano recombinante completo de FPR2/ALX (rhFPR2/ALX). Células A549 com e sem expressão de FPR2/ALX foram expostas a *C. neoformans* (MOI 100) e as análises foram realizadas 24 horas após a estimulação. *C. neoformans* aumentou a produção de IL-6 e IL-10 (mas não IL-8 e TGF- β 1) e ativou a fosforilação de ERK1/2 e NF- κ B em ambas as células com e sem FPR2/ALX em comparação aos controles. A adesão e internalização de *C. neoformans* não foi alterada pela expressão de FPR2/ALX. Concluimos que a presença do receptor FPR2/ALX não foi capaz de proporcionar alterações nos parâmetros inflamatórios em células A549 infectadas com *C. neoformans*.

Palavras-chave: células A549, *Cryptococcus neoformans*, receptor FPR2/ALX, IL-6, IL-8, IL-10.

ABSTRACT

The bronchial epithelium has defense mechanisms based on innate immunity against several airborne microorganisms including *Cryptococcus neoformans*. Formyl peptide receptor 2 (FPR2/ALX), a G protein-coupled receptor (GPCR), plays an important role in the inflammation and resolution processes, including in the airways. Here, we evaluated the inflammatory effects of *C. neoformans* using A549 epithelial cells, which do not express FPR2/ALX, and A549 transfected with full-length recombinant human FPR2/ALX (rhFPR2/ALX) cDNA. A549 cells with and without FPR2/ALX expression were exposed to *C. neoformans* (MOI 100) and analyzes were performed 24 hours after stimulation. *C. neoformans* increased IL-6 and IL-10 production (but not IL-8 and TGF- β 1) and activated ERK1/2 and NF- κ B phosphorylation in both cells with and without FPR2/ALX compared to controls. The adhesion and internalization of *C. neoformans* was not altered by the expression of FPR2/ALX. We concluded that the presence of the receptor FPR2/ALX was not capable of providing changes in inflammatory parameters in A549 cells infected with *C. neoformans*.

Keywords: A549 cells, *Cryptococcus neoformans*, FPR2/ALX receptor, IL-6, IL-8, IL-10.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	9
1.1. <i>Cryptococcus</i> e a Criptococose.....	9
1.2 Resposta Imunológica ao <i>Cryptococcus</i>	13
1.3. Epitélios Respiratórios: A porta de entrada ao <i>Cryptococcus</i>	17
1.4 FPR2: Um Receptor envolvido em Processos Inflamatórios.....	19
2.JUSTIFICATIVA	20
3.HIPÓTESE	20
4.OBJETIVOS	21
4.1.Objetivo geral.....	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
5.MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1. Células.....	22
5.2. <i>C. neoformans</i>	22
5.3 Estimulação	22
5.4. Produção de IL-6, IL-8, IL-10 e TGF- β 1.....	22
5.5 Expressões de fosfo-NF- κ B e fosfo-ERK1 / 2.....	23
5.6.Fagocitose in vitro.....	23
5.7. Análise estatística.....	24
6. RESULTADOS	24
6.1 A produção de IL-6 e IL-10 foi aumentada em células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX infectadas com <i>C. neoformans</i>	24
6.2 O <i>C. neoformans</i> aumentou a ativação do fosfo-ERK1/2 e do fosfo-NF- κ B em células A549 and A549/rhFPR2/ALX.....	25
6.3 Não houve alteração na adesão e internalização de células <i>C. neoformans</i> A549 e A549 / rhFPR2 / ALX.....	26
7.DISSCUSSÃO	27
8. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Cryptococcus* e a Criptococose

A criptococose é uma doença infecciosa com distribuição mundial e existem mais de 70 espécies de *Cryptococcus* distribuídas de forma ubíqua no meio ambiente com um extenso habitat na natureza, especialmente nos excrementos e ninhos de aves, e cascas de árvores (BLANCO; GARCIA, 2008; KWON et al., 2011; NEGRONI, 2012; GULLO et al., 2013; DANESI et. al, 2021), mas apenas duas espécies de *Cryptococcus* são consideradas patogênicas em humanos: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, sendo o foco deste trabalho em *C. neoformans*. *Cryptococcus* são leveduras basidiomicetos, diferente da maioria dos fungos humanos que são ascomiscetos (ZARAGOZA, 2019). Seu metabolismo é principalmente respiratório, ou seja, depende da presença de oxigênio. A infecção é adquirida pela inalação de esporos ou conídios dessecados do ambiente, o que permite aos fungos invadirem os pulmões com facilidade. A infecção pode ocorrer também, com menor frequência, entrando por meio de penetração traumática direta pelo tecido da pele e também pela ingestão. (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006; NEGRONI, 2012, STRICKLAND; SHI, 2021).

C. neoformans tem duas variedades, var. *grubii* e var. *neoformans*, com sorotipos A, D e uma forma híbrida AD. O sorotipo A é responsável pela maioria dos casos de criptococose disseminada associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) na América do Sul, enquanto o sorotipo D prevalece em algumas partes da Europa. Nas infecções causadas em seres humanos e outras espécies de animais o *Cryptococcus* é encontrado na forma unicelular esférica com uma parede celular dupla com um ou mais brotamentos ou blastoconídios. Pode ou não estar rodeado por uma cápsula com diferentes espessuras e pode atingir um diâmetro maior que o da própria levedura. Esta cápsula é a sua característica mais peculiar e pode ser observada por preparações frescas em tinta da China diluída ou por observação em microscópio de contraste de fase (ARECHAVALA et al., 1993;

CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006; NEGRONI, 2012; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

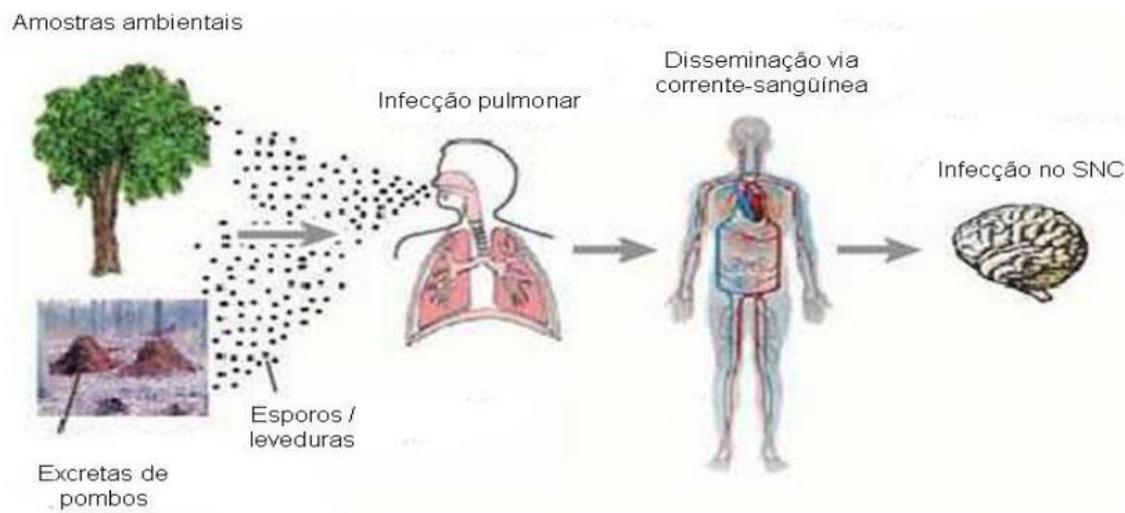
É um patógeno oportunista que causa infecções em imunossuprimidos, gerando cerca de um milhão de infecções por ano, e continua sendo a doença mais fatal em pacientes com AIDS no mundo, afetando também indivíduos imunocompetentes. Estas espécies causam doenças em cerca de um milhão de pessoas por ano, com mais de 625.000 mortalidades, e destas, cerca de 1/3 estão associadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), causando 220.000 casos de meningoencefalite criptocócica e 180.000 mortes a cada ano (BYRNES et al., 2011; MURDOCK et al., 2014; PARK et al., 2009, ZARAGOZA, 2019, GUSHIKEN et al., 2021).

As leveduras desenvolvem-se em meios de cultura de rotina, como ágar Sabouraud dextrose. Depois de 3 ou 4 dias de incubação, tanto a 28°C quanto a 37°C, o desenvolvimento de colônias lisas é observado com uma aparência mucóide que é inicialmente branca e, em seguida, torna-se castanho claro. O exame microscópico destas colônias revela a presença de leveduras em brotamento, semelhantes às observadas nos tecidos, mas com uma cápsula mais fina. As leveduras de *C. gattii* tendem a ser ovais e maiores (NEGRONI, 2012).

Cryptococcus produz vários fatores de virulência que permitem o organismo a sobreviver a mudanças ambientais devido a diversos mecanismos relacionados ao seu crescimento e sobrevivência. Alguns destes mecanismos de virulência do fungo está relacionado a cápsula polissacarídea criptocócica, composta quase em sua totalidade de glucuronoxilomanano (GXM), galactoxilomanano (GalXM) e manoproteínas. GXM interfere diretamente nas funções das células T e migração de neutrófilos, já GalXM pode induzir a desregulação de citocinas e apoptose de linfócitos T. GXM e GalXM são capazes de estimular a fagocitose de macrófagos e podem alterar a produção de citocinas que afetam a maturação das células dendríticas e a apresentação do antígeno. A cápsula aumenta drasticamente de tamanho e espessura durante a infecção ou quando cultivada em condições de indução ao hospedeiro. A cápsula também pode mascarar os PAMPs que podem ser reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) das células do hospedeiro, impedindo que ocorra a fagocitose dentro das vesículas e fornecendo proteção contra espécies reativas de oxigênio e peptídios antimicrobianos. Além

deste, existem outros mecanismos como a melanina, que desempenha um enorme papel na patogênese de uma enorme variedade de fungos, incluindo *Cryptococcus*. A melanina acumula na parede celular do fungo e auxilia o organismo a sobreviver a mudança de temperatura, metais pesados e principalmente a estresse oxidativo provocado pelo fagolisossomo dos fagócitos com a secreção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) (FANG, 2004; SAMARASINGHE et al., 2018, LIU et al., 2021). A proteína antifagocitária criptocócica 1 (App1), que inibe a adesão e ingestão da levedura bloqueia a fagocitose mediada por iC3b, é razoável supor que inibe a internalização de *C. neoformans* bloqueando a interação das células fúngicas com o receptor do complemento (LUBERTO et al., 2003). Além disso, o *Cryptococcus* pode secretar ureases e fosfolipases, duas enzimas que também fazem parte dos fatores de virulência, sendo a urease atuando no processo de internalização do fungo e a fosfolipase auxiliando na manutenção da cápsula fúngica (FU et al., 2018; SIAFAKAS et. al, 2007). Todos esses fatores permitem ao fungo desenvolver técnicas para sobreviver à fagocitose, se esquivar da resposta imunológica e se disseminar pelo organismo.

Figura 1: Ciclo do *Cryptococcus*. Os esporos/leveduras dessecados presentes em excreta e ninhos de aves e em cascas de arvores em algum momento são inalados pelo hospedeiro, que em certas condições desenvolve infecção pulmonar que agravada se dissemina pela corrente sanguínea, alcançando o cérebro e desenvolvendo complicações no sistema nervoso central.



Adaptado de: LIN & HEITMAN, 2006.

Existem evidências que mostram que a maioria dos hospedeiros humanos entram em contato com o organismo na primeira infância (perfil de anticorpos criptocócicos aumentando com a idade), sugerindo infecção latente ou infecção repetida (GOLDMAN et al., 2001), o que leva a crer que a grande parte dos casos clínicos da doença se dá pela reativação de uma infecção assintomática de longa data. (COELHO, BOCCA, CASADEVALL; 2014) Depois que *C. neoformans* invade os pulmões ele pode se disseminar basicamente para qualquer órgão do corpo. *C. neoformans* demonstra tropismo pelo SNC, e tem a capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica e causar meningoencefalite. Vários métodos de tratamento vem sendo investigados, mas combater o fungo é difícil, pois o estágio da doença no sistema nervoso central (SNC) acaba causando a mortalidade do indivíduo de forma rápida (ARMSTRONG-JAMES et. al, 2014)

As infecções pulmonares são na maioria dos casos assintomáticas ou muito leves. No entanto, podem envolver tosse, dor torácica pleurítica, febre, dispnéia, perda de peso e mal-estar. Pneumonia e síndrome da angústia respiratória aguda foram relatadas principalmente em pacientes imunocomprometidos (CAMPBELL, 1966; NADROUS et al., 2003; VOELZ; MAY, 2010).

1.2 Resposta Imunológica ao *Cryptococcus*

É sabido que o principal mecanismo de defesa que o hospedeiro tem para impedir a evolução da criptococose é a imunidade mediada por células, que vai atuar suprimindo o crescimento de leveduras, e por consequência, impedindo sua disseminação para o pulmão (VECCHIARELLI et al., 2013).

Para que ocorra a contenção de *Cryptococcus*, as respostas das células T CD4⁺ auxiliares, seguido pelo recrutamento pulmonar e ativação de leucócitos são essenciais para o controle da infecção criptocócica (MOMIN; WEBB, 2021). A resposta dos leucócitos à infecção criptocócica é composta por uma combinação de células mielóides e linfóides, as quais são capazes de inibir o crescimento ou matar o organismo *in vitro* (BLANCO; GARCIA, 2008; ROMANI, 2004; TRAYNOR; HUFFNAGLE, 2001). Os neutrófilos e macrófagos são células chave na resposta inata contra o *Cryptococcus* dos tecidos. Entretanto, ocorre pouca resposta inflamatória, ou seja, baixo influxo de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, em tecidos do hospedeiro infectado (BLANCO; GARCIA, 2008; CLEMONS et al., 2000). A infiltração de leucócitos limitada pode ser devido ao GXM circulante de *C. neoformans* que provoca a redução de L-selectinas a partir da superfície dos neutrófilos, evitando assim o primeiro passo no extravasamento. As L-selectinas são moléculas de adesão encontradas nos leucócitos que são necessárias para a migração dessas células para os locais de infecção por meio de adesão ao endotélio vascular. Assim, a perda de L-selectina resulta em números limitados de leucócitos nos locais de infecção, o que explica, em parte, a reduzida resposta inflamatória do hospedeiro contra este fungo (BLANCO; GARCIA, 2008; CLEMONS et al., 2000).

A defesa inata começa na submucosa através da opsonização alternativa do *Cryptococcus* pelo complemento, o que permite uma fagocitose eficiente por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (CDs) (KOZEL et al., 1989; SALLUSTO et al., 1995; VAN ASBECK et al., 2008; WIESNER; BOULWARE, 2011). As CDs são as sentinelas do pulmão além de poderosas células apresentadoras de antígenos (APCs), que atuam para localizar o patógeno no endolisossoma após a fagocitose, e o organismo é eficientemente degradado e processado, com os peptídeos antigênicos apresentados em moléculas de superfície do complexo principal de

histocompatibilidade classe 2 (MHC-II) (SALLUSTO et al., 1995; WIESNER; BOULWARE, 2011; WOZNIAK; LEVITZ, 2008).

Enquanto no tecido linfático secundário, as células T naïve ou virgens se diferenciam em células T efetoras. Uma vez ativadas por uma subpopulação de células T efetoras, os macrófagos também têm a sua função no combate a infecção fúngica. Os macrófagos atuam na parte da cascata de sinalização pró-inflamatória através de IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que atuam para promover o recrutamento secundário de linfócitos. Os macrófagos ativados pela via clássica (M1) por citocinas Th1, como IFN- γ , são conhecidos por sua alta capacidade de matar organismos fagocitados, através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (VECCHIARELLI, 2000a; WIESNER; BOULWARE, 2011). Entretanto, os macrófagos ativados pela via alternativa (M2) por citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, citocinas anti-inflamatórias que estão associados com a cicatrização de feridas e não são eficientes contra *Cryptococcus*. Portanto, a polarização de macrófagos para um fenótipo M2, que ocorre naturalmente durante a infecção com o *C. neoformans*, em uma linhagem H99, resulta em crescimento fúngico descontrolado, disseminação e exacerbação da doença (ARORA et al., 2005; ARORA et al., 2011; GORDON, 2003; LEOPOLD et al., 2014; MOSSER; EDWARDS; 2008; MÜLLER et al., 2007).

O Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) é uma citocina expressa por uma variedade de células pulmonares, incluindo células T ativadas, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. O GM-CSF ativa macrófagos aumentando sua atividade fungicida e desempenha um papel complexo no desenvolvimento da imunidade anticriptocócica nos pulmões, sendo necessário para o recrutamento inicial de leucócitos para o pulmão, movimento dos leucócitos recrutados no espaço alveolar e a formação de focos inflamatórios no pulmão. (BLANCO; GARCIA, 2008; CHEN et al., 2007; TRAYNOR; HUFFNAGLE, 2001).

A eficácia da resposta imune adaptativa resultante na remoção de *Cryptococcus* está totalmente relacionada às respostas Th1 e Th2 que atuam sobre o resultado da infecção, pois a resposta predominante de citocinas Th1 sobre Th2 fornece uma proteção aos camundongos contra infecção, enquanto que a infecção é exacerbada sob uma condição Th2 dominante, fazendo com que o fungo se dissemine no organismo (KAWAKAMI, 2004; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; MURDOCK et al. 2014). Goldman et al., trouxeram a ideia de que doenças

respiratórias como asma e síndromes respiratórias alérgicas onde o perfil TH2 acaba sendo predominante poderiam ter maior probabilidade de exposição prévia a um agente patogênico fúngico (GOLDMAN.; DAVIS; BOMMARITO; SHAO; CASADEVALL, 2006). *Cryptococcus* já demonstrou uma capacidade de polarizar o sistema imune, trocando a proteção pela supressão da resposta imune e indução da imunidade humoral em um ambiente propício, que tem como característica presença de IgE dependente de IL-4, produção de muco dependente de IL-13 por células caliciformes, eosinofilia dependente de IL-5 e comprometimento pulmonar funcional, que também são características tipicamente descritas na asma (GOLDMAN et al., 2001; GOLDMAN et al., 2006; MULLER et al., 2007; GULL et al., 2013).

A imunidade adaptativa também desempenha um papel importante na promoção da eliminação fúngica pulmonar (VECCHIARELLI et al., 2013; ZHANG et al., 2009). As respostas Th1/Th17 mostraram ser menos prejudiciais para o hospedeiro devido a consequente redução da carga fúngica, ausência de eosinofilia ou danos das vias aéreas e ausência de taxas de Imunoglobulina E (IgE) sistêmica (GIBSON; JOHNSTON, 2015; ZHANG et al., 2009). No entanto, o papel de Th17 na defesa contra o *Cryptococcus* não está completamente elucidado, pois tem-se observado que quando uma resposta do tipo Th17 é bloqueada, não há nenhum efeito sobre a sobrevivência de camundongos com infecção pulmonar experimental

A expressão das citocinas Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ , aumenta a resistência contra o fungo, com a contenção do *Cryptococcus* em granulomas (CHEN et al., 2005; DECKEN et al., 1998; HOAG et al., 1995; HOAG et al., 1997; KAWAKAMI et al., 1999a; MURDOCK et al., 2014), enquanto que uma resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13, prejudica a eliminação e promove danos imunomediados nos pulmões em modelos de criptococose experimental em camundongos. (ARORA et al., 2005; BLACKSTOCK; MURPHY, 2004; KAWAKAMI et al., 1999b; KOGUCHI; KAWAKAMI, 2002; 18-23; MÜLLER et al., 2007; MURDOCK et al., 2014). Embora uma resposta predominantemente do tipo Th1 resulte na sobrevivência dos camundongos, uma polarização Th1 muito forte não pode evitar a disseminação para o cérebro e a elevada mortalidade, sendo insuficiente para uma proteção significativa contra linhagens altamente virulentas. Portanto, a presença simultânea de citocinas Th2 pode ser favorável nesse caso, reduzindo os danos aos tecidos devido à intensa resposta inflamatória causada pela forte polarização Th1. Essa disseminação para o cérebro provavelmente ocorre devido aos mecanismos de

virulência do *Cryptococcus* que são responsáveis pelo forte tropismo pelo SNC (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; ZHANG et al., 2009).

Pesquisas realizadas por Guillot et al., utilizando a linhagem de célula epitelial brônquica humanas (BEAS-2B), para simular in vitro o epitélio do trato respiratório superiores, observaram aumento da produção da IL-8 em resposta ao *C. neoformans*, no entanto, apenas no mutante acapsular (GUILLOT; CARROLL; BADAWY; QURESHI, 2008). Esta secreção de IL-8 foi dependente dos fatores de transcrição proteína ativadora 1 (AP-1) e fator nuclear kappa B (NFκB). Verificaram ainda que as células brônquicas aumentaram a produção de CXCL1. Curiosamente, o grupo também foi capaz de estudar as respostas das células epiteliais brônquicas humanas primárias (NHBE). Estas células como as BEAS-2B aumentaram a produção de IL-8, no entanto o aumento ocorreu tanto no *C. neoformans* encapsulado quanto acapsular. Os autores sugeriram que a ausência de resposta das células BEAS-2B às cepas encapsuladas é provavelmente por causa da cápsula e também pela falta de contato físico e aderência. Isto é apoiado por um trabalho anterior que demonstra que as cepas acapsulares se ligam muito mais prontamente às células epiteliais (BARBOSA et al. 2006, TEIXEIRA; PENHA; MENDONÇA-PREVIATO, 2014). É possível que o epitélio respiratório entre em contato tanto com as formas encapsulada e acapsular de *Cryptococcus*.

A cápsula polissacarídica torna a imunidade humoral menos eficaz, mas essa resposta permanece fundamental para a defesa criptocócica (WIESNER; BOULWARE, 2011). A maioria dos estudos que avaliaram a resposta humoral contra *Cryptococcus* basearam-se no polissacarídeo capsular e antígenos da parede celular e demonstraram alguns anticorpos monoclonais potencialmente protetores contra a criptococose murina (VECCHIARELLI, 2005; ZHANG et al., 1997).

A cápsula permite que o fungo consiga escapar da imunidade inata, especialmente dos neutrófilos, que são os primeiros a chegar ao local da infecção. Ela também deprime a atividade de células T auxiliares CD4⁺, aumentando a função das células T citotóxicas CD8⁺, e causando ativação policlonal de linfócitos B com a formação de complexos imunes que ativam o complemento pela via alternativa. Um excesso de produção de antígeno capsular previne fagocitose efetiva e a formação de granulomas epitelióides compactos que focalizam a infecção e se associado à SIDA,

originam uma resposta imune desordenada que aumenta a destruição descontrolada da imunidade mediada por células causada por HIV (NEGRONI, 2012).

1.3 Epitélios Respiratórios: A porta de entrada ao *Cryptococcus*

As vias aéreas estão ligadas ao meio ambiente externo e sempre expostas a agentes infecciosos, tais como bactérias, fungos e vírus. Para se proteger desses agentes prejudiciais, os órgãos respiratórios dos hospedeiros desenvolveram um sistema de defesa bastante sofisticado (KAWAKAMI, 2004). Um componente bastante negligenciado da imunidade inata são as células epiteliais do trato respiratório. As células epiteliais brônquicas das vias aéreas superiores e as células epiteliais alveolares do Tipo I e do Tipo II formam uma barreira física entre o ambiente externo e os tecidos abaixo deles. Esta não é apenas uma barreira física, mas também uma barreira de detecção que tem a capacidade de disparar o alarme imunológico muito cedo na infecção com a liberação de uma série de citocinas e quimiocinas (BALS; HIEMSTRA, 2004; CHOO et. al, 2015) Devido ao *Cryptococcus* entrar no corpo através do trato respiratório, os epitélios das vias aéreas são provavelmente as primeiras células hospedeiras com as quais os criptococos têm contato próximo (TAYLOR-SMITH, 2017).

O epitélio das vias aéreas detecta a entrada de microorganismos e responde de acordo com o aumento de suas defesas. Essa resposta consiste em um aumento na liberação de, por exemplo, peptídeos antimicrobianos no lúmen das vias aéreas e na liberação de quimiocinas e citocinas na submucosa que iniciam uma reação inflamatória. Essa reação inflamatória inclui o recrutamento de fagócitos, que servem para remover microorganismos que não são eliminados pelo próprio epitélio, e células dendríticas e linfócitos que podem auxiliar na montagem de uma resposta imune adaptativa.

O papel das células epiteliais na resposta inflamatória a *Cryptococcus* e a capacidade desta levedura para alterar essas reações epiteliais, têm sido pouco observado. Acredita-se que células epiteliais respiratórias possam ter um papel no processamento e apresentação de antígenos, já que foi demonstrado que elas expressam proteínas de MHC-II, moléculas co-estimulatórias, e podem ativar as células T (MERKEL; SCOFIELD, 2000; SALIK et al., 1999).

Um grande número de artigos usando a linha de células A549 foi publicado a partir de meados da década de 1990. Essa linhagem de células epiteliais humanas do tipo II pavimentou o caminho para inúmeros projetos de pesquisa que investigam as interações de micróbios e o epitélio humano. As descobertas iniciais de Merkel e Scofield (1997), demonstraram que *C. neoformans* encapsulado e acapsular podem aderir às células epiteliais A549 em uma série de ensaios radiométricos. No entanto, um aumento da aderência foi visto com o mutante acapsular cap67, um achado também corroborado com um artigo mais recente (CHOO et. al, 2015). Além disso, um elemento sensível à temperatura para a aderência foi registrado. As células criptocócicas cultivadas a 37 ° C aderiram a células epiteliais mais do que aquelas cultivadas a 25 ° C, apesar de criptococos crescidos a 25 ° C produzirem uma cápsula menor. A idade da cultura também afetou a aderência, com culturas mais antigas aderindo mais às células A549. A aderência alterada também foi observada quando *C. neoformans* foi cultivado com diferentes fontes de carbono, mas com variabilidade entre diferentes cepas. Os resultados gerais indicam um ligante criptocócico que não é apenas desmascarado com tamanho de cápsula reduzido, mas também está presente apenas de uma maneira dependente do tempo e da temperatura.

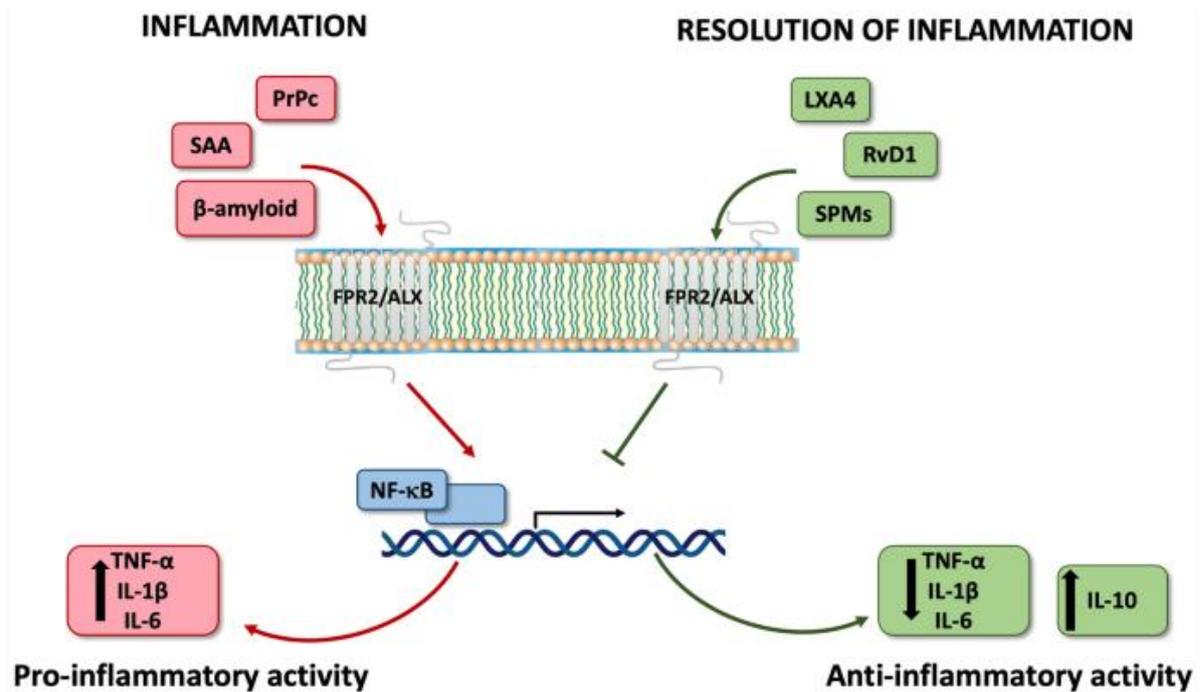
Quase 10 anos depois, Barbosa et al., Usaram a linha celular A549 mais uma vez para investigar a adesão criptocócica às células epiteliais. Os autores demonstraram que a adesão do *Cryptococcus* às células A549 poderia ser bloqueada com o uso de um anticorpo IgG1 18B7 de camundongo criado contra GXM criptocócico (CASADEVALL et. al, 1998). O pré-tratamento das leveduras criptocócicas ou das células epiteliais antes da co-incubação resultou na redução da adesão entre as duas, indicando GXM como um ligante crucial. O grupo também mostra que GXM é capaz de ligar às células epiteliais diretamente, apoiando ainda mais a conclusão de que as células epiteliais podem reconhecer GXM. Esses resultados, entretanto, parecem se opor aos de Merkel e Scofield (1997), que mostraram que a falta de cápsula (principalmente feita de GXM) resultou no aumento da adesão de *Cryptococcus*.

1.4. FPR2: Um Receptor envolvido em Processos Inflamatórios

Receptores de peptídeos de formil (FPR) são uma família de sete receptores de domínios transmembranares acoplados à proteína G que atuam na defesa do hospedeiro e na inflamação, sendo o receptor 2 do peptídeo N formil (FPR2/ALX) o mais marcante desta família, pois é o único membro da família de receptores formil que interage com todos os tipos de ligantes, ou seja, lipídios, peptídeos e proteínas e por ter efeito pró ou anti-inflamatório dependendo de seus agonistas (SCHIMTZ NUNES et al., 2020). FPR2 tem uma distribuição ampla e se expressa em uma variedade de células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, a maioria, senão todas as células imunes, bem como células neuronais. (HE;YE, 2017). Inicialmente reconhecido somente como um receptor de reconhecimento de padrões, o FPR2 induz respostas pró-inflamatórias como por exemplo, após a ativação pelo soro amiloide A (SAA) (YE, et. al, 2009).

Porém, uma função distinta para o FPR2 também é sua capacidade de resolver a inflamação por meio de mediadores lipídicos anti-inflamatórios como a lipoxina A4 (LXA4), resolvina D1 (RvD1) ou a proteína modulada por glicocorticóides anexina A1 (ANXA1), permitindo a resolução da inflamação e o retorno à homeostase. É importante compreender como a ativação do FPR2 elicia diferentes respostas celulares que levam à inflamação e sua resolução (CATTANEO, 2010). Por exemplo, a ligação do soro amiloide A (SAA) aumentou a expressão do NF- κ B, enquanto o LXA4 suprimiu a atividade do NF- κ B, sendo mediada pela ativação do GPCR que permite a diversidade de cascatas de sinalização intracelular induzindo a alteração do efeito pró-inflamatório para pró-resolução (SERHAN, SAVILL, 2005). Colby et. al (2016) realizou um trabalho no qual achados demonstraram uma das primeiras evidências de que alterações na imunidade celular contra *C.neoformans* estão associadas a diferenças na produção de LXA4 e na expressão de receptores, o que pode mostrar uma possível importância do receptor ALX/FPR2 na regulação da inflamação e na defesa antifúngica do hospedeiro pulmonar.

Figura 2: O receptor FPR2/ALX e alguns de seus agonistas. A figura demonstra o receptor FPR2/ALX que com um agonista específico a resposta pode ser direcionada para um perfil pró ou anti-inflamatório.



Adaptado de TYLEK et. al, 2021.

2 JUSTIFICATIVA

A criptococose atualmente é a infecção secundária que mais mata pacientes com HIV e AIDS, e sua capacidade de infectar indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes em alguns casos, torna o estudo deste organismo importante. O pulmão é a principal porta desse patógeno para o corpo, é necessário estudar e observar como atuam os mecanismos de defesa no controle da infecção como ele impede o fungo de se disseminar, da mesma forma como o fungo interage com o tecido pulmonar, como as células epiteliais brônquicas, que é um fator extremamente negligenciado. O receptor 2 do peptídeo N formil (FPR2 / ALX), um receptor acoplado à proteína G (GPCR), pode ter efeito duplo (pró ou anti-inflamatório) dependendo de seus agonistas, por isso esse receptor vem sendo utilizado para investigar alternativas para resolução da inflamação, principalmente de doenças respiratórias.

3 HIPÓTESE

O receptor 2 do peptídeo N formil pode direcionar ativação das células epiteliais alveolar humanas tipo II infectadas com *C. neoformans*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar comparativamente os efeitos de *Cryptococcus neoformans* na modulação da ativação das células epiteliais alveolar humanas tipo II sem o receptor (A549) e nas células com a presença do receptor (A549rh/FPR2/ALX).

4.2 Objetivos específicos

Avaliar por ELISA o efeito dose-resposta de *C. neoformans* na produção de IL-6, IL-8, TGF- β 1 e IL-10 por células epiteliais alveolares humanas tipo II (A549) e (A549rh/FPR2/ALX).

Avaliar por citometria de fluxo os efeitos da adesão de *C. neoformans nas* das células epiteliais alveolares humanas tipo II (A549) e células epiteliais alveolares humanas tipo II transfectadas com o gene do receptor FPR2/ALX (A549rh/FPR2/ALX) na produção dos fatores de transcrição fosfoNF κ B e fosfoERK1/2

Avaliar a adesão e internalização de *C. neoformans* por das células epiteliais alveolares humanas tipo II (A549) e (A549rh/FPR2/ALX) através da citometria de fluxo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Células

Células A549 transfectadas com vetor pcDNA3 sozinhas ou com cDNA do receptor FPR2/ALX (doado pelo Dr. David Bruce Levy de Brigham and Women's Hospital) (Bonnans et al., 2006) foram cultivadas em meio DMEM / F-12 (Gibco - Life Technologies) acrescidas com soro fetal bovino a 10% (SFB) (Gibco - Life Technologies), e antibióticos 1% (penicilina, estreptomicina e gentamicina) (Gibco - Life Technologies) em frascos de cultura (TPP) com área de crescimento de 75 cm² e capacidade de volume de 65 mL mantidos em uma estufa a 37 ° C e 5% de CO₂.

5.2 *C. neoformans*

Todos os experimentos foram realizados com *C. neoformans* var. *grubii* cepa H99 (ATCC MYA-4564). *C. neoformans* foi cultivado e mantido em ágar Sabouraud dextrose (BD Biosciences). Para estimulação celular, uma suspensão de colônia única em caldo Sabouraud dextrose (BD Biosciences) foi preparada após o crescimento até a fase estacionária inicial (48 h) a 37 ° C. Para a realização dos experimentos, as colônias foram coletadas, e após diluição em solução salina, os *Cryptococcus* foram contados em câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração para 1 x 10⁸, que corresponde a 100 fungos por célula (MOI 100). Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis, exceto a contagem do *Cryptococcus*.

5.3 Estimulação

Células A549 e A549rh/FPR2/ALX (1 x 10⁵ cel / mL) foram incubadas em placas de 96 poços e com exceção dos controles, estimuladas com *C. neoformans* (100 MOI) (PEREIRA et. al, 2021) e mantidas em estufa a 37 °C por 24h.

5.4 Produções de IL-6, IL-8, IL-10 e TGF-β1

Os sobrenadantes foram coletados 24h após a estimulação, e as concentrações de IL-6, IL-8, IL-10 e TGF-β1 foram medidas por ensaios de imun absorção enzimática (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (BD Pharmingen, San Diego, CA , EUA).

5.5 Expressões fosfo-NF - kB e fosfo-ERK1 / 2

As vias de sinalização do fosfo-NF-kB e fosfo-ERK1 / 2 foram avaliadas por citometria utilizando o método de Oliveira et. al, 2015. Resumidamente, 24h após estimulação com *C. neoformans* com a presença ou não de receptor rhFPR2 / ALX, as células foram fixadas com tampão Cytotfix BD (4%) por 10 min a 37 ° C. Após a centrifugação, as células foram permeabilizadas em paraformaldeído gelado por 30 minutos e, em seguida, coradas com anticorpos monoclonais anti-fosfoNF-κB ou anti-fosfoERK1 / 2 (BD Biosciences Pharmingen-Phosflow, EUA) ou seu isótipo correspondente por 60 minutos seguido de incubação com o anticorpo secundário marcado com FITC ou PE por mais 45 minutos no escuro. As células foram então lavadas, ressuspensas e submetidas à análise. Uma expressão de moléculas de sinalização intracelular fosforiladas em 50.000 células viáveis por citometria de fluxo (FACSCalibur; BD Biosciences Pharmingen).

5.6 Fagocitose in vitro

Para determinar os níveis de internalização de *C. neoformans* durante a adesão com as células A549, o método de Pereira et. al (2021) foi seguido. Resumidamente, as células de levedura foram marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 0,1 mg / mL no escuro por 30 min seguidp de lavagem em PBS. Células A549 foram estimuladas com *C. neoformans* por 24 h a 37 ° C, seguido por extensa lavagem com PBS para remoção de fungos não aderentes. Alguns dos complexos de células hospedeiras de fungos foram tratados por 10 min a 25 ° C com azul de Tripán (200 µg / ml). O azul de tripan é um agente de extinção de fluorescência derivada de FITC e, uma vez que não é capaz de atingir o compartimento intracelular de células viáveis; este corante é útil para discriminar *C. neoformans* intracelular e associado à superfície, extinguindo a fluorescência de células não internalizadas. O azul de tripan não ligado foi removido por lavagem extensiva com PBS e os complexos foram então analisados por citometria de fluxo.

5.7 Análise estatística

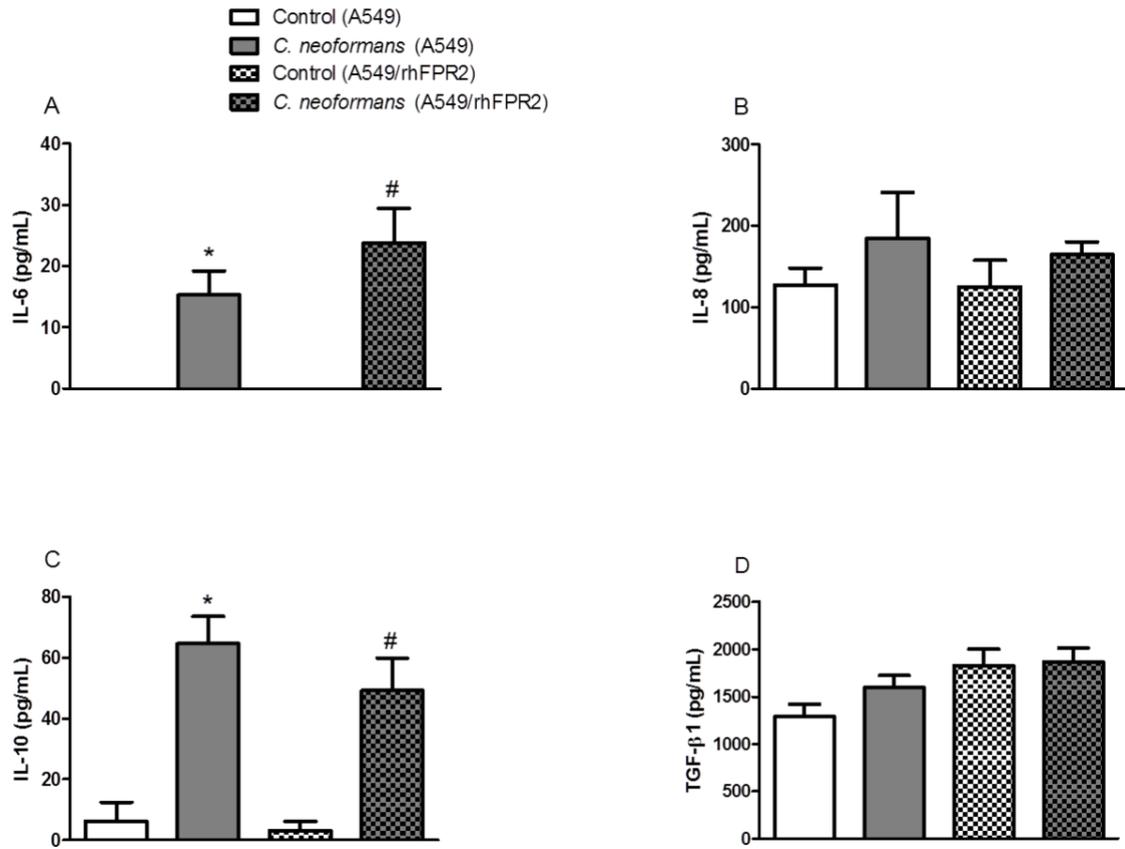
A análise estatística foi realizada usando o software “Prism” versão 5 da Graphpad (<http://www.graphpad.com>). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. A avaliação dos resultados foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tuckey. Valores de p menores que 0,05 são considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS

6.1 A produção de IL-6 e IL-10 foi aumentada em células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX infectadas com *C. neoformans*

Primeiramente, avaliamos o efeito de *C. neoformans* na produção das citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TGF- β 1 em células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX. As células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX infectadas com *C. neoformans* aumentaram significativamente a concentração de IL-6 (Fig. 1A) e IL-10 (Fig. 1C) quando comparadas aos grupos de controle. Não foram observadas alterações significativas na produção de IL-6 e IL-10 entre as células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX infectadas com fungo. Não foram observadas alterações na produção de IL-8 (Fig. 1B) e TGF- β 1 (Fig. 1D) entre os grupos.

Figura 3. Modulação da produção de citocinas em células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX estimuladas com *C. neoformans* e A549 / rhFPR2 / ALX. Células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX foram estimuladas com *C. neoformans* (MOI 100) por 24 h. Após isso, foram coletados os sobrenadantes de IL-6 (a), IL-8 (b), IL-10 (c) e TGF- β 1 (d). As concentrações foram avaliadas por ELISA. Os resultados foram avaliados por uma análise de variância (ANOVA) seguida de um pós-teste de Tukey. * P <0,05 versus grupo controle (A59). #P <0,05 versus grupo de controle (A549 / rhFPR2 / ALX).

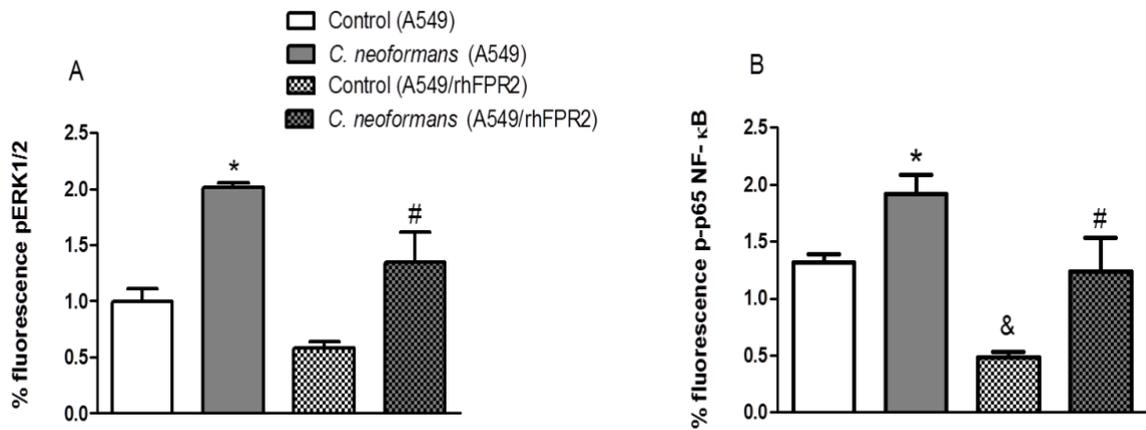


6.2 *C. neoformans* aumentou a fosforilação de ERK1 / 2 e NF-kB em células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX

Em seguida, avaliamos a ativação de ERK1 / 2 e NF-kB por *C. neoformans* em A549 e A549 / rhFPR2 / ALX. *C. neoformans* aumentou significativamente a fosforilação de ERK1 / 2 (Fig. 2A) e NF-kB (Fig. 2B) em ambas as células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX em comparação aos grupos de controle. Não foram observadas alterações significativas na fosforilação de ERK1 / 2 e NF-kB entre células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX infectadas com fungo. O controle A549 / rhFPR2 / ALX apresentou menor nível basal de ativação de NF-kB quando comparado ao controle com células A549.

Figura 4. As fosforilações de ERK1 / 2 e NF-kB foram aumentadas em A549 e A549rhFPR2 / ALX estimulado com *C. neoformans* (MOI 100) por 24 h. Depois, as células foram recuperadas e o gráfico de citometria de fluxo e gráfico mostrando as porcentagens de ERK1 / 2 (a), NF-kB (b), a fluorescência foi analisada a 50.000 células por citometria de fluxo. Os resultados foram avaliados por uma análise de variância (ANOVA) seguida de um pós-teste de Tukey. * P <0,05 versus grupo

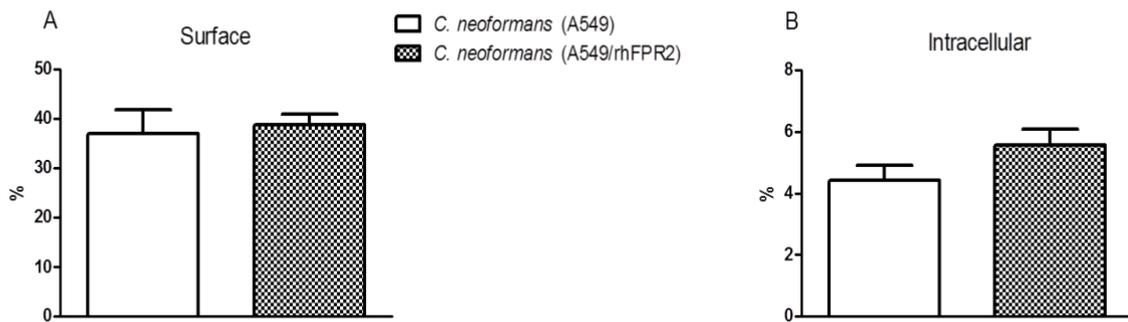
controle (A549). #P <0,05 versus grupo de controle (A549 / rhFPR2 / ALX). &P <0,05 versus grupo controle (A549)



6.3 Não houve alteração na adesão e internalização de células *C. neoformans* A549 e A549 / rhFPR2 / ALX

As adesões de células epiteliais de criptococos desempenham um papel significativo na disseminação a partir dos pulmões. Não foram observadas diferenças na aderência extracelular (Fig. 3A) e internalização (Fig. 3B) em A549 e A549 / rhFPR2 / ALX estimulado por *C. neoformans*.

Figura 5. Nenhuma alteração na adesão e internalização de *C. neoformans* ocorreu nas células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX. *C. neoformans* foi incubado com FITC (0,1 mg / mL) no escuro por 30 min. A549 e A549 (rhFPR2 / ALX) foram estimulados com *C. neoformans* (MOI 100). Após 24 h, as células foram recuperadas e analisadas por citometria de fluxo para quantificar a superfície (a) e intracelular (b) de *C. neoformans*.



7 DISCUSSÃO

O papel das células epiteliais na resposta inflamatória ao *C. neoformans* é pouco explorado. O *C. neoformans* é capaz de modular várias respostas pulmonares e pode exacerbar ou limitar a ativação de certos mediadores das células epiteliais. Embora existam vários modelos animais de infecções criptocócicas, as diferenças entre as células pulmonares de camundongos e humanas prejudicam uma visão mais ampla de como o *C. neoformans* interage com o epitélio pulmonar (BINGISSER; HOLT, 2001). A célula A549, uma linha celular derivada de um adenocarcinoma de pulmão humano (GIARD et. Al, 1973), provou ser muito útil em vários estudos farmacológicos, toxicológicos e estudos microbiológicos (NARDONE; ANDREWS, 1978; FOSTER et. Al, 1998 .) incluindo em *C. neoformans* (TAYLOR-SMITH, 2017)

Os receptores de peptídeo formil são um grupo de proteína G acoplada a receptores quimioatraentes que desempenham papéis importantes na defesa do hospedeiro, inflamação e processos de resolução (HE; YE et. Al, 2017; ZHUANG et. al, 2020). FPR2 pode reconhecer diversos agonistas de formil peptídeo. Devido a vários estudos com lipoxina A4 (LXA4), um agonista antiinflamatório, o receptor FPR2 foi renomeado para FPR2 / ALX. Em um modelo experimental de criptococose, o líquido do lavado broncoalveolar LXA4 foi elevado em camundongos C57BL / 6 (mais suscetíveis à infecção) em comparação com camundongos C.B-17 (mais protetores contra infecção). No entanto, uma maior indução da expressão de FPR2 / ALX foi observada em camundongos CB-17 infectados por *C. neoformans* quando comparados a camundongos C57BL / 6 infectados por *C. neoformans*, o que poderia

estar associado à regulação da defesa do hospedeiro fúngico no pulmão (COLBY et al, 2016)

IL-6 desempenha um papel fundamental na inflamação e infecção (Jevnikar, et al., 2019). Camundongos knockout para IL-6 infectados com *C. neoformans* apresentaram aumento da quebra da barreira hematoencefálica, causando uma morte mais rápida quando comparados aos camundongos do tipo selvagem (Li et al., 2015). Reforçando isso, em um estudo com pacientes positivos para o vírus da imunodeficiência humana com meningite criptocócica, a alta concentração de IL-6 no líquido cefalorraquidiano foi associada a respostas protetoras do hospedeiro, como controle de infecção e integridade da barreira hematoencefálica. (Midiri et al., 2020). Não foi observada diferença na produção de IL-6 pela presença ou não de FPR2 / ALX em células epiteliais alveolares após infecção por *C. neoformans*, sugerindo não haver interferência direta desse receptor nos mecanismos pró-inflamatórios nessas células.

A IL-8, é um mediador quimiotático, principalmente de neutrófilos, que atua na defesa do hospedeiro contra fungos, bactérias e vírus (HARADA et. Al, 1994; CHAUDHRY et al, 2013). Na obra de Guillot et. al, (2008) foi observado que *C. neoformans* acapsulares viáveis são poderosos ativadores das células epiteliais brônquicas (BEAS-2B), induzindo uma secreção significativa de IL-8, que corresponde a uma resposta inflamatória aguda na célula. Nenhuma alteração na produção de IL-8 foi observada em A549 e A549 / rhFPR2 / ALX estimulados com *C. neoformans* quando comparados aos controles, o que está em desacordo com o estudo anterior descrito acima. Os resultados da diferença podem estar associados à diferença entre as células (BEAS-2B, linhas celulares de pulmão brônquico normal e A549, linha celular de carcinoma).

A IL-10 é uma citocina com efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, auxiliando na redução da inflamação. O aumento da produção de IL-10 em amostras de sangue periférico de pacientes com criptococose está geralmente relacionado à disseminação da doença e mortalidade precoce (MANABU et. Al, 2011; TEITZ-TENNENBAUM et. Al, 2018). *C. neoformans* aumentou a concentração de IL-10 em A549 e A549 / rhFPR2 / ALX, sem diferenças entre eles, sugerindo que os

mecanismos anti-inflamatórios nessas células não foram afetados pela expressão de FPR2 / ALX.

O TGF- β 1 (TGF) é uma citocina multifuncional que desempenha um papel central na patogênese de várias doenças crônicas na regulação das respostas inflamatórias (LETTERIO; ROBERTS, 1998). O trabalho de Shao et. al., 2005 demonstrou que a expressão do TGF- β contribui para a persistência da infecção criptocócica durante os estágios crônicos da infecção, mas pode promover a liberação de lisozima pelos macrófagos, que possui ação antifúngica. o fungo foi incapaz de modular a resposta de TGF- β 1 em ambas as células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX.

O NF- κ B atua na inflamação e na resposta do hospedeiro a várias infecções (HAYDEN; GOSH, 2011). Pereira et. al., 2021 observaram que a atividade de NF- κ B em células epiteliais brônquicas (células BEAS-2B) pode ser desnecessária para o desenvolvimento de inflamação das vias aéreas em resposta a *C. neoformans*. Este trabalho está de acordo com McDermmot et. al, 2018, que demonstrou, no modelo de camundongo de criptococose, que a sinalização de NF- κ B em células epiteliais do pulmão é totalmente dispensável para inflamação das vias aéreas em resposta a *C. neoformans*. (PEREIRA et al., 2021; McDermott et. Al., 2018). *C. neoformans* aumentou a ativação de fosfo-NF- κ B em A549 e A549 / rhFPR2 / ALX quando comparado aos controles. Esses resultados estão em desacordo com estudos anteriores e podem estar relacionados a diferenças de modelos (in vivo e in vitro) ou células (células BEAS-2B e A549) utilizadas. No entanto, esses resultados estão associados a aumentos de IL-6 e IL-10, uma vez que ambas as citocinas poderiam ser produzidas pelo NF- κ B (Cao et. Al., 2006; Son et. Al., 2008).

A outra importante via de sinalização para a inflamação é a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), que participa de procedimentos regulatórios importantes, como adesão celular, progressão do ciclo celular e migração celular (Mercer, D'Armiento, 2006). Estudos demonstraram que a cápsula GXM de *C. neoformans* tem a capacidade de diminuir a ativação de ERK em camundongos CD45 + do tipo selvagem (Pericolini et al, 2010; Merkel, Scofield, 2000). *C. neoformans* aumentou a ativação de fosfo-ERK1 / 2 em A549 e A549 / rhFPR2 / ALX quando comparado aos controles. Portanto, esses resultados, em associação com os demais, sugerem que o FPR2 / ALX não é essencial, pelo menos nas células A549, para modular o processo de inflamação na criptococose.

A capacidade das células criptocócicas de aderir à superfície pulmonar do hospedeiro é importante para o estabelecimento da doença (MERKEL, SCOFIELD; 1997, BARBOSA et. Al, 2006, TAYLOR-SMITH, 2017). Vários artigos foram publicados tentando investigar os mecanismos de adesão e internalização do fungo a *C. neoformans* em células epiteliais do trato respiratório (MERKEL, CUNNINGHAM, 1992; MERKEL, SCOFIELD, 1997; CHOO et. Al, 2015; CASADEVALL et. Al. , 1998; BARBOSA et.al., 2006) Em nosso estudo, não foi observada diferença na adesão e internalização de *C. neoformans* a células A549 e A549 / rhFPR2 / ALX, sugerindo que a presença de FPR2 / ALX não altera o patogenicidade do fungo. Mais estudos com outras células e modelos in vivo são necessários para avaliar o papel do FPR2 / ALX na criptococose.

8 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o receptor FPR2 / ALX não é capaz de alterar as respostas inflamatórias em células A549 infectadas com *C. neoformans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARECHAVALA, A.I.; ROBLES, A.M.; NEGRONI, R.; BIANCHI, M.H.; TABORDA, A. Valor de los métodos directos e indirectos de diagnóstico en las micosis sistémicas asociadas al sida. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v.35, n.2, p.163-9, 1993.
- ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G., & BROWN, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in microbiol.**, 22(3), 120–127, 2014.
- ARORA, S.; HERNANDEZ, Y.; ERB-DOWNWARD, J.R.; McDONALD, R.A.; TOEWS, G.B.; HUFFNAGLE, G.B. Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. **J Immunol**. v.174, n.10, p.6346-56, 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*. **Infect Immun**. v.79, n.5, p.1915-26, 2011.
- BALS R.; HIEMSTRA P.S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. **Eur Respir J**. Feb;23(2):327-33, 2004.

- BARBOSA, F.M.; FONSECA, F.L.; HOLANDINO, C.; ALVIANO, C.S.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M.L. Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. **Microbes Infect.** v.8, n.2, p.493-502, 2006.
- BINGISSER, R.M.; HOLT, P.G. Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. **Swiss Med Wkly.** Apr 7;131(13-14):171-9, 2001.
- BLACKSTOCK, R.; MURPHY, J.W. Role of interleukin-4 in resistance to *Cryptococcus neoformans* infection. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v.30, n.1, p.109-17, 2004.
- BLANCO, J.L.; GARCIA, M.E. Immune response to fungal infections. **Vet Immunol Immunopathol.** v.125, n.1-2, p.47-70, 2008.
- BONNANS C, FUKUNAGA K, LEVY MA, LEVY BD. Lipoxin A(4) regulates bronchial epithelial cell responses to acid injury. **Am J Pathol.** 168(4):1064-1072, 2006.
- BYRNES, E.J. 3rd.; BARTLETT, K.H.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infect.** v.13, n.11, p.895-907, 2011.
- CAMPBELL, G.D. Primary pulmonary cryptococcosis. **Am Rev Respir Dis.** v.94, n.2, p.236-43, 1966.
- CATTANEO, F.; GUERRA, G.; AMMENDOLA, R. Expression and signaling of formyl-peptide receptors in the brain. **Neurochem Res.** Dec;35(12), 2018.
- CAO, S.; ZHANG, X.; EDWARDS, J.P.; MOSSER, D.M. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. **J Biol Chem.** Sep 8;281(36):26041-50, 2006.
- CAO, J., WONG, C.K., YIN, Y., LAM, C.W. Activation of human bronchial epithelial cells by inflammatory cytokines IL-27 and TNF-alpha: implications for immunopathophysiology of airway inflammation. **J Cell Physiol.** v.223, n.3, p.788-97, 2010.
- CASADEVALL, A.; CLEARE, W.; FELDMESSER, M.; GLATMAN-FREEDMAN, A.; GOLDMAN, D.L, KOZEL, T.R, LENDVAI, N.; MUKHERJEE, J.; PIROFSKI, L.A.; RIVERA, J.; ROSAS, A.L.; SCHARFF, M.D.; VALADON, P.; WESTIN, K.; ZHONG, Z. Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. **Antimicrob Agents Chemother.** Jun;42(6):1437-46, 1998.
- CHAUDHRY, H.; ZHOU J.; ZHONG Y.; ALI M.M, MCGUIRE, F.; NAGARKATTI, P.S.; NAGARKATTI, M. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. **Vivo** 27(6):669–684, 2013.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am.** v.20, n.3, p.507-44, 2006.

CHEN, G.H.; OLSZEWSKI, M.A.; McDONALD, R.A.; WELLS, J.C.; PAINE, R. 3rd.; HUFFNAGLE, G.B.; et al. Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in host defense against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection during murine allergic bronchopulmonary mycosis. **Am J Pathol.** v.170, n.3, p.1028-40, 2007.

CHOO K.K.; CHONG P.P.; HO A.S.; YONG P.V. The role of host microfilaments and microtubules during opsonin-independent interactions of *Cryptococcus neoformans* with mammalian lung cells. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** Dec;34(12):2421-7, 2015.

CLEMONS, K.V.; CALICH, V.L.; BURGER, E.; FILLER, S.G.; GRAZZIUTTI, M.; MURPHY, J.; ROILIDES, E.; CAMPA, A.; DIAS M.R.; EDWARDS J.E Jr.; Fu, Y.; Fernandes-Bordignon G, Ibrahim A, KATSIFA, H.; LAMAIGNEREC.G.; MELONI-BRUNERI LH, REX, J.; SAVARY, C.A.; XIDIEH, C. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. **Med Mycol.** v.38, p.99-111, 2000.

COELHO, C.; BOCCA, A.L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Pathol.** v.9, p. 219-38, 2014.

COLBY, J.K.; GOTT, K.M.; WILDER, J.A.; LEVY, B.D. Lipoxin Signaling in Murine Lung Host Responses to *Cryptococcus neoformans* Infection. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 54(1):25-33, 2016.

DANESI, P.; FALCARO, C.; SCHMERTMANN, L.J.; de MIRANDA, L.H.M.; KROCKENBERGER, M.; MALIK, R. *Cryptococcus* in Wildlife and Free-Living Mammals. **J Fungi (Basileia)** 7 (1): 29, 2021.

EBLEN, S.T. Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes. **Adv Cancer Res** 138:99–142, 2018.

FANG, F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nat Rev Microbiol.** 2(10), 820–832, 2004.

FU, M. S.; COELHO, C.; DE LEON-RODRIGUEZ, C. M.; ROSSI, D.; CAMACHO, E.; JUNG, E. H.; KULKAMI, M.; CASADEVALL, A. 2018. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS Pathogens.** 14(6), e1007144, 2018.

GIARD, D.J.; AARONSON, S.A.; TODARO, G.J.; ARNSTEIN, P.; KERSEY, J.H.; DOSIK, H.; PARKS, W.P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. **J Natl Cancer Inst.** Nov;51(5):1417-23, 1973.

GOLDMAN, D. L.; KHINE, H.; ABADI, J.; LINDENBERG, D. J.; PIROFSKI L. A.; NIANG, R.; CASADEVALL, A. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics,** 107(5), E66, 2001.

GOLDMAN, D.L.; DAVIS, J.; BOMMARITO, F.; SHAO, X.; CASADEVALL, A. Enhanced allergic inflammation and airway responsiveness in rats with chronic *Cryptococcus neoformans* infection: potential role for fungal pulmonary infection in the pathogenesis of asthma. **J Infect Dis.** v.193, n.8, p.1178-86, 2006.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol.** v.3, n.1, p.23-35, 2003.

GUILLOT, L.; CARROLL, S.F.; BADAWY, M.; QURESHI, S.T. *Cryptococcus neoformans* induces IL-8 secretion and CXCL1 expression by human bronchial epithelial cells. **Respir Res.** v.9, p.9, 2008.

GULLO, F.P.; ROSSI, S.A.; SARDI, J. de C.; TEODORO, V.L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v.32, n.11, p.1377-91, 2013.

GUSHIKEN, A. C.; SAHARIA, K. K.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am.** 35(2), 493–514, 2021.

HARADA, A.; SEKIDO, N.; AKAHOSHI, T.; WADA, T.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **J Leukoc Biol.**, 56(5), 559–564, 1994.

HAYDEN, M.; GHOSH, S. NF- κ B in immunobiology. **Cell Res** 21, 223–244, 2011.

HE, H. Q.; YE, R. D. The Formyl Peptide Receptors: Diversity of Ligands and Mechanism for Recognition. **Molecules.** 22 (3), 455, 2017.

HOAG, K.A.; STREET, N.E.; HUFFNAGLE, G.B.; LIPSCOMB, M.F. Early cytokine production in pulmonary *Cryptococcus neoformans* infections distinguishes susceptible and resistant mice. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v.13, n.4, p.487-95, 1995.

HOAG, K.A.; LIPSCOMB, M.F.; IZZO, A.A.; STREET, N.E. IL-12 and IFN- γ are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant C.B-17 mice. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v.17, n.6, p.733-9, 1997.

JEVNIKAR, Z.; ÖSTLING, J.; AX, E.; CALVÉN, J.; THÖM, K.; ISRAELSSON, E.; ÖBERG, L.; SINGHANIA, A.; LAU, L.C.K.; WILSON, S.J.; WARD, J.A.; CHAUHAN, A.; SOUSA, A.R.; De MEULDER, B; LOZA, M.J.; BARIBAUD, F.; STERK, P.J.; CHUNG, K.F.; SUN, K.; GUO Y.; ADCOCK, I.M.; PAYNE, D.; DAHLEN, B.; CHANEZ, P.; SHAW, D.E.; KRUG, N.; HOHLFELD, J.M.; SANDSTRÖM, T.; DJUKANOVIC, R.; JAMES, A.; HINKS, T.S.C.; HOWARTH, P.H.; VAARALA, O.; van GEEST, M., OLSSON, H. Epithelial IL-6 trans-signaling defines a new asthma phenotype with increased airway inflammation. **J Allergy Clin Immunol.** Feb;143(2):577-590. 2019.

KAWAKAMI, K.; QURESHI, M.H.; ZHANG, T.; KOGUCHI, Y.; SHUIBUYA, K.; NAOE, S.; et al. Interferon- γ (IFN- γ)-dependent protection and synthesis of

chemoattractants for mononuclear leucocytes caused by IL-12 in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Clin Exp Immunol.** v.117, n.1, p.113-22, 1999a.

KAWAKAMI, K.; HOSSAIN QURESHI, M.; ZAHNG, T.; KOGUCHI, Y.; XIE, Q.; KUMIROTO, M.; et al. Interleukin-4 weakens host resistance to pulmonary and disseminated cryptococcal infection caused by combined treatment with interferon-gamma-inducing cytokines. **Cell Immunol.** v.197, n.1, p.55-61, 1999b.

KAWAKAMI, K. Regulation by innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Jpn J Infect Dis.** v.57, n.4, p.137-45, 2004.

KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. *Medical mycology in the nineteenth century.* **Mycoses.** 37(7-8), 229–233. 1994.

KOGUCHI, Y.; KAWAKAMI, K. Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. **Int Rev Immunol.** v.21, n.4-5, p.423-38, 2002.

KOZEL, T.R.; WILSON, M.A.; PFROMMER, G.S.; SCHLAGETER, A.M. Activation and binding of opsonic fragments of C3 on encapsulated *Cryptococcus neoformans* by using an alternative complement pathway reconstituted from six isolated proteins. **Infect Immun.** v.57, n.7, p.1922-7, 1989.

KWON CHUNG, K.; BOEKHOUT, T.; WICKES, B.; FELL J. Systematics of the genus *Cryptococcus* and its type species *C. neoformans*. In: Heitman J, Kozel T, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A, eds. *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. Washington, DC: ASM Press, 2011.

LETTERIO, J.J.; ROBERTS A.B. Regulation of immune responses by TGFbeta, *Annu. Rev. Immunol.* 16 137–161, 1998.

LI, Z.; LU, G.; MENG, G. Pathogenic fungal infection in the lung. **Front Immunol** 10:1524, 2019.

LI, X.; LIU, G.; MA, J.; ZHOU, L.; ZHANG, Q.; GAO, L. Lack of IL-6 increases blood-brain barrier permeability in fungal meningitis. **Journal of biosciences**, 40(1), 7–12, 2015.

LIN, X. & HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol.** v.60, p.69-105, 2006.

LIU S.; YOUNGCHIM S.; ZAMITH-MIRANDA D.; NOSANCHUK J. D. Fungal Melanin and the Mammalian Immune System. **J Fungi** (Basel), 2021.

LUBERTO C.; MARTINES-MARIÑO B.; TARASKIEWICZ D.; BOLAÑOS, B.; CHITANO, P.; TOFFALETTI, D. L.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HANNUN, Y. A.; BALISH, E.; DEL POETA, M. Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Invest.**;112(7):1080-1094, 2003.

MANABU H.; HIROO W.; TETSUO Y.; SHINICHIRO M.; KOJIRO H.; MASUO N.; MAMORU N.; FUMIE K, SHIGERU K.; HAJIME G. IL-10 resolves the neutrophilic inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Eur Res J** 38:419. 2021.

McDERMOTT, A.J.; TUMEY, T.A.; HUANG, M.; HULL, C.M.; KLEIN, B.S. Inhaled *Cryptococcus neoformans* elicits allergic airway inflammation independent of Nuclear Factor Kappa B signalling in lung epithelial cells. **Immunology**. 153(4):513-522. 2018.

MERCER, B.A.; D'ARMIENTO, J.M. Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon**. 1(2):137-50. 2006.

MERKEL, G.J.; CUNNINGHAM, R.K. The interaction of *Cryptococcus neoformans* with primary rat lung cell cultures. **J Med Vet Mycol**. 30(2):115-21.1992.

MERKEL, G.J.; SCOFIELD, B.A. The effects of *Cryptococcus neoformans*-secreted antigens on tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression on human lung epithelial cells. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v.29, n.4, p.329-32, 2000.

MIDIRI, A.; MANCUSO, G.; LENTINI, G.; FAMÀ, A.; GALBO, R.; ZUMMO, S.; GIARDINA M.; De GAETANO, G.V.; TETI, G.; BENINATI, C.; BIONDO, C. Characterization of an immunogenic cellulase secreted by *Cryptococcus* pathogens. **Med Mycol**. Nov 10;58(8):1138-1148. 2020.

MOMIN M.; WEBB G. The Environmental Effects on Virulence Factors and the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* . **Int J Mol Sci**. 2021.

MURDOCK, B.J.; HUFFNAGLE, G.B.; OLSZEWSKI, M.A.; OSTERHOLZER, J.J. Interleukin-17A enhances host defense against cryptococcal lung infection through effects mediated by leukocyte recruitment, activation, and gamma interferon production. **Infect Immun**. v.82, n.3, p.937-48, 2014.

NADROUS, H.F.; ANTONIOS, V.S.; TERRELL, C.L.; RYU, J.H. Pulmonary cryptococcosis in nonimmunocompromised patients. **Chest**. v.124, n.6, p.2143-7, 2003.

NARDONE, L.L.; ANDREWS, S.B. Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte. Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors. **Biochim Biophys Acta**. May 25;573(2):276-95. 1979.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clin Dermatol**. v.30, n.6, p.599-609, 2012.

OLIVEIRA, J.R.; FAVARIN, D.C; TANAKA, S.C; BALARIN, M.A; TEIXEIRA, D.N; LEVY, B.D, ROGÉRIO, A. de P. AT-RvD1 modulates CCL-2 and CXCL-8 production and NF- κ B, STAT-6, SOCS1, and SOCS3 expression on bronchial epithelial cells stimulated with IL-4 2015. **BioMed Research International**. v. 2015, p. 1-8, 2015.

- PARK, B.J.; WANNEMUEHLER, K.A.; MARSTON, B.J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P.G.; CHILLER, T.M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**. v.23, n.4, p.525-30, 2009.
- PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**. v.16, n.4, p.837-74, 2002.
- PEREIRA, A.; OLIVEIRA, J. R.; SOUZA, A.; ANDRADE-SILVA, L.; SILVA, M. V.; SILVA, P. R.; SILVA-VERGARA, M. L.; ROGERIO, A. P.. Effects of cigarette smoke extract on bronchial epithelial cells stimulated with *Cryptococcus neoformans*. **Med Microbiol Immunol**. 210(4), 221–233, 2021.
- PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; BISTONI, G. et al. Role of CD45 signaling pathway in galactoxylomannan-induced T cell damage. **PLoS ONE** 5(9):12720. 2010.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**. v.4, n.1, p.1-23, 2004.
- SALIK, E.; TYORKIN, M.; MOHAN, S.; GEORGE, I.; BECKER, K.; OEI, E.; et al. Antigen trafficking and accessory cell function in respiratory epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v.21, n.3, p.365-79, 1999.
- SALLUSTO, F.; CELLA, M.; DANIELI, C.; LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J Exp Med**. v.182, n.2, p.389-400, 1995.
- SAMARASINGHE, H.; ACEITUNO-CAICEDO, D.; COGLIATI, M.; KWON- K. J.; RICKERTS, V.; VELEGRAKI, A.; ACKAGLAR, S.; XU, J. Genetic Factors and Genotype-Environment Interactions Contribute to Variation in Melanin Production in the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Scientific reports**. 8(1), 9824, 2018.
- SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol**. 6(12):1191-7, 2005.
- SHAO, X.; RIVERA, J.; NIANG, R.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D. L. A dual role for TGF-beta1 in the control and persistence of fungal pneumonia. **J Immunol (Baltimore, Md. : 1950)**, 175(10), 6757–6763, 2005.
- SIAFAKAS, A. R.; SORRELL, T. C.; WRIGHT, L. C.; WILSON, C.; LARSEN, M.; BOADLE, R.; WILLIANSO, P. R.; DJORDJEVIC, J. T. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. **J Biol Chem**. 282(52), 37508–37514, 2007.
- SON, Y.H.; JEONG Y.T.; LEE, K.A.; CHOI, K.H.; KIM, S.M.; RHIM, B.Y.; KIM, K. Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. **J Cardiovasc Pharmacol**. 2008.
- STRICKLAND, A. B., SHI, M. Mechanisms of fungal dissemination. **Cell. Mol. Life Sci**. 78, 3219–3238, 2021.

TEITZ-TENNENBAUM, S.; VIGLIANTI, S. P.; ROUSSEY, J. A.; LEVITZ, S. M.; OLSZEWSKI, M. A, OSTERHOLZER, J.J. Autocrine IL-10 Signaling Promotes Dendritic Cell Type-2 Activation and Persistence of Murine Cryptococcal Lung Infection. **J Immunol**, 2018.

TEIXEIRA, P.A.; PENHA, L.L.; MENDOCA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J.O. Mannoprotein MP84 mediates the adhesion of *Cryptococcus neoformans* to epithelial lung cells. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 2014, 4, 106, 2001.

TRAYNOR, T.R.; HUFFNAGLE, G.B. Role of chemokines in fungal infections. **Med Mycol.** v.39, n.1, p.41-50. 2013.

TYLEK, K., TROJAN, E., REGULSKA, M., LACIVITA, E., LEOPOLDO, M., BASTA-KAIM, A. Formyl peptide receptor 2, as an important target for ligands triggering the inflammatory response regulation: a link to brain pathology. **Pharmacological rep.** 73(4), 1004–1019. 2021.

VAN ASBECK, E.C.; HOEPELMAN, A.I.; SCHARRINGA, J.; HERPERS, B.L.; VERHOEF, J. Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells. **BMC Microbiol.** v.8, p.229, 2008.

VIOLA G.M.; MALEK A.E, ROSEN L.B.; DINARDO A.R.; NISHIGUCHI T.; OKHUUSEN P.C.; HOLLAND S.M.; KONTOYIANNIS D.P. Disseminated cryptococcosis and anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies: An underappreciated association. **Mycoses.** 2021.

VECCHIARELLI, A.; PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; KENNO, S.; PERITO, S.; CENCI, E.; et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiol.** v.8, n.9, p.1107-16, 2013.

VOELZ, K.; MAY, R.C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryot Cell.** v.9, n.6, p.835-46, 2010.

WANG, J.; HOMER, R. J.; CHEN, Q.; ELIAS J. A. Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. **J. Immunol.** 165 4051–4061, 2000

WIESNER, D.L.; BOULWARE, D.R. *Cryptococcus*-Related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS): Pathogenesis and Its Clinical Implications. **Curr Fungal Infect Rep.** v.5, n.4, p.252-261, 2011.

YE, R. D., BOULAY, F., WANG, J. M., DAHLGREN, C., GERARD, C., PARMENTIER, M., et al. International union of basic and clinical pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. **Pharmacol. Rev.** 61, 119–161, 2009.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence*, v. 10, p. 490-501, 2019.

ZHANG, H.; ZHONG, Z.; PIROFSKI, L.A. Peptide epitopes recognized by a human anti-cryptococcal glucuronoxylomannan antibody. **Infect Immun.** v.65, n.4, p.1158-64, 1997.

ZHANG, Y.; WANG, F.; TOMPKINS, K.C.; McNAMARA, A.; JAIN, A.V.; MOORE, B.B.; et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. **Am J Pathol.** v.175, n.6, p.2489-500, 2009.

ZHUANG, Y.; LIU, H.; EDWARD ZHOU, X.; KUMAR VERMA, R.; de WAAL, P. W.; JANG, W.; XU, T. H.; WANG, L.; MENG, X.; ZHAO, G.; et al. Structure of Formylpeptide Receptor 2-Gi Complex Reveals Insights into Ligand Recognition and Signaling. **Nat. Commun.** 11 (1), 1–12. 2020.