

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

LUCIANA PEREIRA BOAVENTURA

**MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO POR *Cryptococcus gattii* E
SUA EVASÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DO HOSPEDEIRO**

Belo Horizonte-2013

LUCIANA PEREIRA BOAVENTURA

**MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO POR *Cryptococcus gattii* E
SUA EVASÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DO HOSPEDEIRO**

Monografia apresentada, como pré-requisito para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia, com habilitação em Ciências da Saúde, ao Instituto de Ciências Biológicas, do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Daniel de Assis Santos, e co-orientação da MSc. Julliana Ribeiro Alves dos Santos.

Belo Horizonte-2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais biológicos, aos meus pais adotivos, as minhas irmãs, que estiveram comigo durante toda esta trajetória. Alguns, mesmo estando tão longe, conseguiram dividir comigo os momentos de alegria e sacrifício, mas, principalmente por entender a minha ausência nesses 12 meses de estudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta etapa vencida em minha vida;

Ao professor Daniel, por ter me proporcionado o tema deste trabalho, em que pude alcançar mais conhecimento.

À doutoranda Julliana, pelos ensinamentos, paciência e dedicação ao longo deste trabalho;

Aos meus professores da pós-graduação, pela contribuição na minha formação;

À equipe do Museu de Ciências Morfológicas, pela oportunidade dada a mim para atuar em seus projetos e permitir o meu crescimento profissional e pessoal;

Enfim, aos meus parentes e amigos, mesmo não entendendo o que eu fazia, acreditaram na minha capacidade para realização desse trabalho.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica, causada por espécies do gênero *Cryptococcus*. É adquirida por meio da inalação de leveduras desidratadas ou basidiósporos. Além de estar associada a condições de imunodepressão celular, causada por *C. neoformans*, a doença primária pode acometer hospedeiros hígidos, pela infecção por *C. gattii*. A infecção inicia-se nos espaços alveolares do pulmão pelo confronto das leveduras com os macrófagos, podendo disseminar-se para outros tecidos, especialmente o SNC. Para o desenvolvimento nas condições adversas do hospedeiro humano, as leveduras de *C. gattii* apresentam fatores de virulência necessários para a sua sobrevivência, como componentes da cápsula, da parede celular, a termotolerância, a produção de enzimas e íons. Atualmente, a resistência de *C. gattii* às substâncias disponíveis no mercado é crescente, surgindo a necessidade de realizar um levantamento de dados sobre os mecanismos pelos quais os fungos conseguem burlar o sistema imunológico do hospedeiro. Diante deste contexto, este trabalho visa realizar um levantamento bibliográfico sobre os mecanismos de resposta imune à infecção por leveduras basidiomicéticas de *C. gattii* e sua relação com os fatores de virulência desse fungo e as estratégias utilizadas para evasão do sistema imunológico em modelo murino. Os mecanismos de defesa contra os fungos são numerosos, abrangendo desde aqueles presentes no nascimento, até os mais sofisticados, adquiridos durante a infecção. Algumas evidências demonstram que os principais mecanismos continuam sendo as respostas essenciais para o controle desse fungo, por meio da ativação de células fagocíticas e linfócitos T e B através de citocinas que medeiam o sistema imunológico. Embora a imunidade humoral tenha sido pouco estudada nas últimas décadas, os estudos mostram que os anticorpos possuem funções relevantes durante a infecção criptocócica. Resultados pertinentes também foram obtidos em estudos de fatores de virulência de *C. gattii*, principalmente em relação à urease. No entanto, mais estudos são necessários a fim de investigar cada etapa da infecção por *C. gattii*, e assim possibilitar a escolha da terapia mais adequada e estratégias para confecções de vacinas contra este patógeno.

Palavras-chaves: criptococose; macrófagos; urease; *C. gattii*; cápsula.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a fungal infection caused by species of the genus *Cryptococcus*. It is acquired through inhalation of basidiospores or dehydrated yeast. Besides being associated with cell conditions of immunodepression caused by *C. neoformans*, it can cause primary disease in healthy host, by the fungus of the same genus, *C. gattii*. The disease begins in the alveolar spaces of the lung by the confrontation of yeasts with macrophages and can disseminate to other tissues, especially the CNS. For development in the adverse conditions of the human host, the cells yeasts of the genus *Cryptococcus* exhibit virulence factors necessary for their survival, as components of the capsule, the cell wall, the thermotolerance, and enzymes and ions production. Currently, the resistance of *C. gattii* to drugs available on the market is increasing, resulting in the need to deeply know of the mechanisms by which fungi can evade from the host's immune system, so this work aims to conduct a study on the mechanisms of host immune response against the *C. gattii* yeasts and their strategies used for infection and evasion from the human immune system. The defense mechanisms against fungi are numerous, ranging from those present from birth, to the most sophisticated, being acquired during infection. Some evidence shows that the main mechanisms still are essential answers to control this fungus, through the activation of phagocytic cells and T and B lymphocytes by cytokines that mediate the immune system. Although humoral immunity has been poorly studied in the past decades, studies show that antibodies have important functions during cryptococcal infection. Relevant results were also obtained in studies of virulence factors of *C. gattii*, mainly related to urease. However, more research should be required to investigate each stage of infection by *C. gattii*, thus enabling the choice of the most appropriate therapy strategies for construction and vaccines against this pathogen.

Keywords: cryptococcosis; macrophages; urease; *C. gattii*; capsule.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Diagrama ilustrando as vias de propagação das leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> do ambiente até o hospedeiro humano	20
Figura 2	Resumo das principais vias do sistema complemento durante a infecção do gênero <i>Cryptococcus</i>	30
Figura 3	Cápsula de <i>Cryptococcus gattii</i>	40
Figura 4	Possíveis rotas para <i>Cryptococcus</i> para o cruzamento da barreira hematoencefálica	49
Figura 5	Interações entre células fúngicas e células fagocíticas e a sua disseminação através da barreira hematoencefálica	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fatores de Virulência	38
----------	-----------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo

AFLP – Análise de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados

AOX – Oxidase alternativa

GLR - Glutathione peroxidase

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

CD4 – Marcador de superfície de linfócitos T auxiliares

CD8 – Marcador de superfície de linfócitos T citotóxicos

CD14 – Marcador de superfície para o receptor LPS

CGB - Canavanina-glicina-azul de bromotimol

DC – Célula Dendrítica

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

ERK – Receptores celulares ativados por quinase

Fc – Porção constante do anticorpo

GXM – Glucuronoloxilomanana

GalXM – Galactoxilomanana

IFN- γ – Interferon Gama

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL- Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo

MAC – Complexo de Ataque a Membrana

MBL – Receptor para Manose e Lectina

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

NF- κ B – Fator nuclear

NK – Célula Natural Killer

nIgM – Imunoglobulina M de ocorrência natural

NO – Óxido Nítrico

PAMPs – Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PCR – Reação em Cadeira da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI3K – Fosfatidilinositol-3 quinase

PLB – fosfolipase B

PRRs – Receptores de Reconhecimento de Padrões

RAPD – Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico

R265 – Cepa de *Cryptococcus gattii* encontrada na ilha de Vancouver, Canadá

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido dismutase

TCR – Receptor de Célula T

TLR – Receptor do tipo Toll

T $\gamma\delta$ – linfócito T gama-delta

TNF- α – Fator alfa de necrose tumoral

URA5 – Orotidina pirofosforilase

Ure1 – Urease 1

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
RESUMO	
1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVO	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Resposta imune a <i>Cryptococcus gattii</i>	25
5.1.1 Imunidade inata	25
5.1.2 Imunidade adaptativa	29
5.1.3 Imunidade celular	30
5.1.4 Imunidade humoral	33
5.2 Fatores de virulência de <i>Cryptococcus gattii</i> e sua relação com o sistema imunológico do hospedeiro	36
5.2.1 A cápsula polissacarídica	37
5.2.2 O pigmento melanina	40
5.2.3 Capacidade de desenvolvimento a 37°C	41
5.2.4 As enzimas	41
5.2.5 Outros fatores	43
6. Mecanismos de evasão de <i>Cryptococcus gattii</i> nos tecidos do hospedeiro	47
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais relacionados aos fungos

Micologistas estimam que existam mais de um milhão de espécies de fungos, dos quais cerca de 400 sejam agentes de doença em humanos. Este diverso grupo de micro-organismos ocupa muitos nichos e, apesar de algumas espécies serem benéficas para os humanos, como o uso na fermentação de pão, queijo, vinho, cerveja e produção de antibióticos, outras podem causar doenças, como micoses e micotoxicoses (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

As micoses podem ser classificadas clinicamente de acordo com os tecidos e órgãos afetados. São denominadas superficiais ou cutâneas, quando limitadas à epiderme, subcutâneas, quando a infecção penetra significativamente na pele, e sistêmicas quando a infecção é profunda ou disseminada a órgãos internos. Ainda, as micoses sistêmicas podem ser divididas em: aquelas causadas por fungos patogênicos capazes de infectar indivíduos hígidos, e àquelas causadas por fungos oportunistas, que infectam indivíduos imunocomprometidos (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

1.2 Gênero *Cryptococcus*

Os estudos com o gênero *Cryptococcus* começaram em 1894, quando Sanfelice isolou uma levedura de um suco de pêssego, denominando-a *Saccharomyces neoformans*. Outro agente isolado foi em uma lesão tumoral de quadril, descrito por Curtis (1896), o qual foi denominado *Saccharomyces*

tumefaciens. Vuillemin (1901) examinou várias dessas culturas, mas como não foram observados ascósporos do gênero *Saccharomyces*, ele inseriu essas espécies no gênero *Cryptococcus*.

A fase teleomórfica, ou sexuada, de *Cryptococcus neoformans* foi descoberta quando dois sorotipos D foram cruzados, recebendo o nome de *Filobasidiella neoformans*. Em 1970, uma linhagem atípica de *C. neoformans* foi isolada de um paciente leucêmico, sendo descrita como *C. neoformans* var. *gattii*. Contudo, quando as linhagens de sorotipos B e C foram cruzadas, um teleomorfo, que diferenciava de *F. neoformans*, foi observado. Assim, isso resultou na descrição de *Filobasidiella bacillispora*, que, atualmente, corresponde a *Cryptococcus gattii* (BOVERS et al, 2008; LAZERA; IGREJA; WANKE, 2004).

Em seu ciclo de vida, as espécies do gênero *Cryptococcus* apresentam reprodução sexuada e assexuada. Na primeira, apresenta uma forma teleomórfica, reproduzida *in vitro*, e a maioria dos isolados são heterotáticos, sendo o heterotalismo controlado por um sistema de *locus* e dois alelos **a** e **α**. A fase monocariótica ocorre por conjugação de duas células haplóides geneticamente compatíveis. Após a plasmogamia ou fusão dos dois morfotipos, as hifas dicarióticas se desenvolvem com ligações em ansa a partir dos conjugantes. Os basídios se desenvolvem na porção terminal ou em ramificação lateral da hifa; estas estruturas são longas, delgadas, hialinas e sem septos, com uma dilatação abrupta do ápice, onde ocorre a cariogamia. O núcleo zigótico origina, após meiose, quatro núcleos haplóides, localizados em quatro sítios no ápice do basídio, e se dividem por mitose e de forma repetida para formarem, por brotamento basipetal, os basidiósporos

ovalados, elípticos ou globosos, unicelulares, gerando quatro cadeias de até 20 basidiósporos, completando o ciclo sexual. Na assexuada, as espécies apresentam uma forma anamórfica, como levedura globosa ou ovalada, variando de 3 a 8 µm de diâmetro, capsulada e reproduzindo por brotamento único ou múltiplo a partir de qualquer ponto da parede celular (LAZERA; IGREJA; WANKE, 2004).

Nas últimas décadas, um grande número de técnicas de tipagem molecular tem sido utilizado para estudar a epidemiologia dos isolados de *C. neoformans*. Essas técnicas incluem: a cariotipagem, a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), estudos de hibridização em DNA, análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) *fingerprinting*. Essa última tem sido muito utilizada durante o curso da pesquisa epidemiológica global desses isolados, dividindo mais de 400 isolados clínicos e ambientais em oito tipos moleculares. VNI/VNII (var. *grubii*, sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (var. *neoformans*, sorotipo D), VGI, VGII, VGIII e VGIV (var. *gattii*, sorotipo B e C). Nenhuma correlação entre sorotipo e tipo molecular foi encontrado para *C. neoformans* var. *gattii*. Os tipos moleculares foram recentemente confirmados através da análise em RFLP do gene para a monofosfato de orotidina pirofosforilase (URA5) e o gene para a fosfolipase (PLB1) (MEYER, 2003).

C. neoformans correspondia a duas variedades fúngicas, com quatro sorotipos: var. *grubii* (A), var. *neoformans* (D), híbrido (AD) e var. *gattii* (B e C) (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Atualmente, a variedade *gattii* é reconhecida como uma nova espécie, principalmente devido às diferenças antigênicas do

principal polissacarídeo capsular, a glucuronoxilomanana (GXM) e à quantidade de dados genéticos apontando diferenças entre as variedades. Assim, a espécie passou a ser denominada *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG & VARMA, 2006).

Além das diferenças de sorotipos, as espécies se diferenciam quanto ao fenótipo, à bioquímica, à epidemiologia e aos seus nichos ecológicos. No estado anamórfico, não se diferenciam fenotipicamente, mas no estado teleomórfico, as diferenças são muito evidentes: na espécie *C. gattii*, os basidiósporos apresentam-se baciliformes e de parede lisa, enquanto na espécie *C. neoformans*, são esféricos, alongados e cilíndricos e com a parede ligeiramente rugosa. Bioquimicamente, o teste CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) é utilizado para diferenciar estas leveduras, pois a grande maioria dos isolados de *C. neoformans* são sensíveis à L-canavanina. Desta forma, esta espécie não assimila a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, assim, não ocorre crescimento e o pH permanece inalterado, conservando a cor original do meio. Entretanto, *C. gattii* é naturalmente resistente à L-canavanina, sendo capaz de crescer no meio, utilizando a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, produzindo a amônia, elevando o pH do meio e modificando a cor do indicador de pH, o azul de bromotimol para azul cobalto ou azul esverdeado forte (PEREIRA, 2012).

A distribuição das leveduras na natureza é muito ampla e pode estar associada especialmente a vegetais em decomposição, frutos e restos orgânicos de aves, principalmente pombos. A espécie *C. neoformans* é geralmente isolada a partir de excretas de aves e pombos urbanos (*Columba livia*), sendo considerada ubíqua no ambiente. *C. gattii* tem sido isolado, principalmente, a partir de amostras de

eucaliptos, como *Eucalyptus camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. gomphocephala*. No Brasil, *C. gattii* foi isolado em várias regiões geográficas, especialmente na Bahia, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (DINIZ, 2012).

Os estudos relacionados à associação de *C. gattii* às espécies de eucalipto foram importantes para a compreensão da ecologia desse micro-organismo, sendo descrito inicialmente na Austrália (SORREL et al., 1996). Atualmente, sabe-se que os eucaliptos não são habitats naturais específicos nem associação específica com *C. gattii*, mostrando que esse micro-organismo possui diferentes padrões geográficos, podendo habitar árvores nativas de regiões específicas e já tem sido isolado a partir de espécimes vegetais nativos e introduzidos, tais como Cabori (*Miroxylum peruiferum*), Sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*), e Oiti (*Moquilea tomentosa*) (RELATÓRIO TÉCNICO, 2008; BALTAZAR & RIBEIRO, 2008; DINIZ, 2012).

A distribuição geográfica destes fungos foi considerada por muito tempo restrita a regiões tropicais e subtropicais, entretanto, este paradigma, atualmente, foi quebrado, uma vez que foi relatada a presença de *C. gattii* em regiões de clima temperado, principalmente, a partir da ocorrência de uma epidemia causada por este patógeno nas ilhas Vancouver, Canadá (CHAKRABARTI, 1997; FYFE, 2008; KIDD, 2004).

1.3 Criptococose

A criptococose, ou torulose, blastomicose européia, doença de Busse-Buschke, é a infecção fúngica, causada por espécies do gênero *Cryptococcus* que acomete seres humanos e uma grande diversidade de animais (KWON-CHUNG & VARMA, 2006).

A infecção é adquirida por meio da inalação de propágulos fúngicos, como leveduras desidratadas ou basidiósporos, e após a inalação pode ocorrer disseminação hematogênica. A doença inicia-se no pulmão nos espaços alveolares, e as leveduras criptocócicas são reconhecidas pelos macrófagos, podendo disseminar sistemicamente para o tecido ósseo, a pele, a próstata e, principalmente para o sistema nervoso central. A interação primária entre o macrófago alveolar e a célula da levedura pode ser um fator determinante para saber se a doença será ou não desenvolvida (MITCHELL; PERFECT, 1995).

Pode-se observar na figura 1, adaptada de Li & Mody (2010), a rota da infecção.

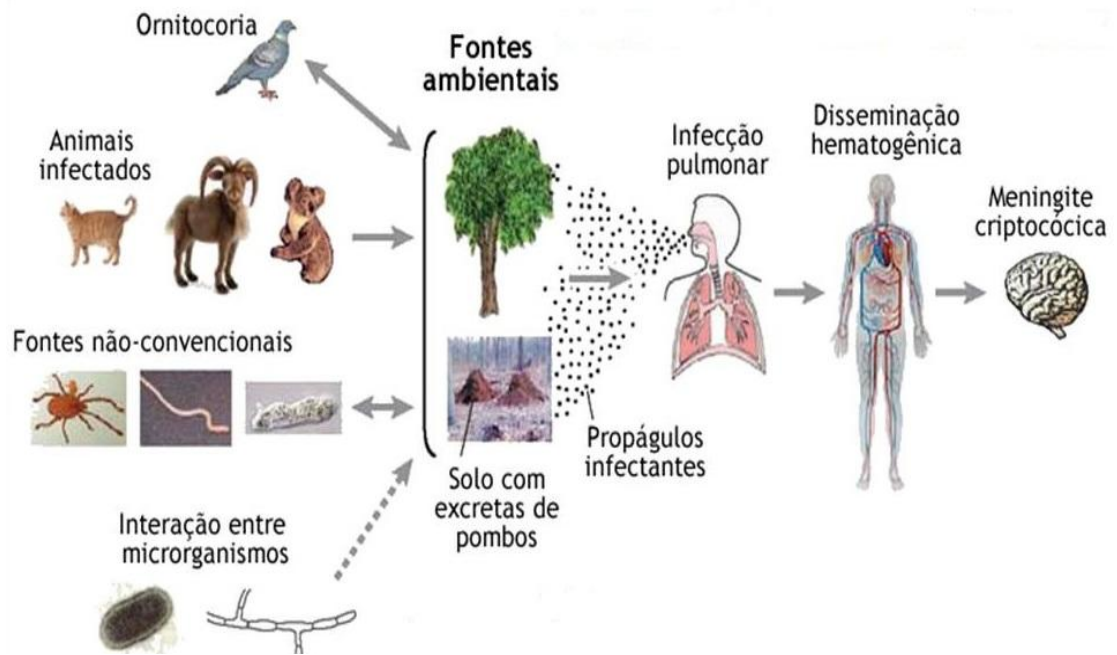


Fig. 1. Diagrama ilustrativo mostrando as vias de propagação das leveduras do gênero *Cryptococcus* a partir de várias fontes ambientais até o hospedeiro causando doença. Adaptado de Li & Mody (2010).

A micose abrange duas entidades distintas do ponto de vista clínico e epidemiológico: criptococose oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, causada principalmente por *C. neoformans*; e criptococose primária de hospedeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas temperadas, causada principalmente por *C. gattii*, comumente associada a surtos (RELATÓRIO TÉCNICO, 2008).

Em infecções por *C. gattii*, principalmente sorotipo B, predomina uma lesão pulmonar regressiva, a qual é geralmente indetectável, ou um nódulo periférico no pulmão que se diferencia de um tumor maligno. Quando atinge o sistema nervoso central pode ser subaguda ou crônica e é frequentemente confundida com meningoencefalite e outras infecções virais ou bacterianas (LAZERA et al., 2005).

C. gattii pode causar uma meningoencefalite, com ou sem lesões pulmonares, que geralmente leva a uma elevação da pressão intracraniana, dano aos nervos cranianos e hidrocefalia. Já foram relatados casos de cegueira e perda de audição (LIN & HEITMAN, 2006).

1.4 Resposta imune ao gênero *Cryptococcus*

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra os fungos são numerosos, abrangendo desde aqueles presentes do nascimento à fase adulta (imunidade inata ou inespecífica), e os adquiridos e induzidos especificamente durante a infecção ou doença (imunidade adaptativa ou específica). O resultado da infecção por espécies do gênero *Cryptococcus* é determinado por respostas de vários tipos celulares, dessas duas formas de imunidade, tais como: células natural-killer (NK), linfócitos e macrófagos. Essas últimas células iniciam o contra-ataque ao micro-organismo nos tecidos do hospedeiro, constituindo um dos principais mecanismos de defesa contra a infecção criptocócica (BLANCO & GARCIA, 2008; MA & MAY, 2009).

1.5 Mecanismos de evasão de *Cryptococcus* dos tecidos do hospedeiro

A sobrevivência e proliferação de espécies do gênero *Cryptococcus* é muito comum, sendo tal comportamento relevante para a sua patogenicidade, por sua capacidade de disseminação e latência. As leveduras intracelulares podem ser transportadas por macrófagos a várias partes do corpo sem ficar expostas aos perigos extracelulares, tais como componentes do complemento ou agentes antimicrobianos presentes na circulação sanguínea. Dentre os principais mecanismos de evasão, pode-se citar: “Cavalo-de-Tróia”, “Transferência Lateral” e a Transcitose (MA & MAY, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Para saber como a resposta imune do hospedeiro é estabelecida frente a um determinado patógeno fúngico, o estudo bibliográfico torna-se indispensável para a realização de pesquisas futuramente, e assim, permitir a busca do tratamento adequado e prevenção da doença.

Devido ao crescente aumento no número de casos de criptococose em indivíduos imunocompetentes e a resposta à infecção diferente entre os indivíduos infectados, surge a necessidade de explorar, de forma mais profunda, os mecanismos pelos quais *C. gattii* consegue burlar o sistema imunológico do hospedeiro, com enfoque em modelos murinos, proporcionando, assim, um embasamento inicial para o estudo clínico posteriormente.

Além disso, este conhecimento pode servir como ferramenta para a confecção de vacinas e, principalmente antimicrobianos, devido à crescente seleção de amostras resistentes de fungos às drogas disponíveis no mercado.

3. OBJETIVO

O presente trabalho tem por finalidade realizar uma revisão bibliográfica acerca dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro frente as leveduras basidiomicéticas de *Cryptococcus gattii*, e as estratégias utilizadas por este patógeno para infecção e evasão do hospedeiro em modelos murinos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Buscando atender ao objetivo proposto, a pesquisa foi abordada de forma qualitativa sobre o tema escolhido, por meio de revisão bibliográfica. O levantamento foi realizado de forma a construir um conhecimento acerca dos mecanismos de resposta imune á infecção por *Cryptococcus gattii*, relacionando os fatores de virulência e a sua evasão do hospedeiro em modelos murinos.

As principais bases científicas de dados utilizadas foram: Google Scholar, PubMed (United States National Library of Medicine National Institutes of Health), SciELO (Scientific Electronic Library Online), Biblioteca Central da Universidade Federal de Minas Gerais, entre outros. Para a pesquisa dos artigos, as seguintes palavras-chave foram: “*Cryptococcus gattii*”, “resposta imune a fungos”, “criptococose” e outros termos relacionados.

Os artigos relacionados ao tema foram selecionados a partir de revistas científicas nacionais e internacionais, entre os anos 2003 e 2012, no período de maio de 2012 a janeiro de 2013.

5. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

5.1. Resposta imune a *Cryptococcus gattii*

5.1.1 Imunidade inata

A imunidade inata ou inespecífica é a primeira linha de defesa do hospedeiro, a qual é formada desde o nascimento. Apesar de não apresentar uma especificidade, esta resposta é capaz de distinguir estruturas próprias de não-próprias do corpo. A pele e as membranas mucosas são as barreiras físicas principais em uma determinada infecção fúngica, visto que em suas células epiteliais e endoteliais, substâncias antimicrobianas são produzidas visando à eliminação do patógeno. Além disso, organismos comensais habitam tais regiões, fazendo parte da microbiota normal, impedindo assim que outras espécies possam se instalar e causar doença. Se os fungos ultrapassarem essas barreiras físicas, estes organismos podem se deparar com uma série de componentes dos mecanismos imunológicos, como membranas celulares, receptores celulares, fatores humorais, neutrófilos, leucócitos mononucleares (macrófagos e monócitos), células dendríticas, células NK e T $\gamma\delta$ (BLANCO & GARCIA, 2008).

Além disso, o reconhecimento de fungos patogênicos pode ser mediado por determinados tipos de receptores de superfície celular, denominados receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs). Tais estruturas incluem os receptores Toll-like (TLRs), proteínas da família de receptores celulares que mediam o reconhecimento dos patógenos microbianos e a consequente ativação inflamatória

em vertebrados e invertebrados. Esses receptores, em geral, reconhecem proteínas antigênicas, denominadas padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), frequentemente compartilhadas por classes de micro-organismos. De forma direta ou indireta, PAMPs estimulam a imunidade inata, atuando como agonistas para PRRs. Quando são reconhecidos por PRRs de células apresentadoras de antígenos (APCs) e células T e B, os PAMPs ativam a síntese de quimiocinas, induzindo a expressão de moléculas co-estimulatórias para promover a ativação da imunidade adaptativa durante a apresentação do antígeno. Essa ativação leva à produção de espécies reativas de oxigênio, que podem provocar a morte do patógeno (MACPHERSON & AUSTIN, 2012; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010; BLANCO & GARCIA, 2008).

Os peptídios antimicrobianos, como histatinas, defensinas e catelicidinas, são moléculas efetoras que mediam a imunidade inata e adaptativa e possuem ampla ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e contra fungos. Eles ativam quimiocinas durante a infecção e inflamação, desempenhando algumas funções: inativam fungos através de múltiplos efeitos diretos em suas membranas, atacam alvos externos específicos, exibem efeitos adjuvantes e polarizantes no desenvolvimento da célula dendrítica, e apresentam uma influência direta sobre as respostas imunes adaptativas, ativando fatores imunes distintos, como TNF- α , IL-1 e IFN- γ (MIZOBE-ONO, 2006; BLANCO & GARCIA, 2008).

As células dendríticas são também APCs, principalmente para linfócitos T, podendo fagocitar *C. gattii*. Essas células atuam como sentinelas para o reconhecimento do patógeno infeccioso, de forma a induzir uma resposta imune

adaptativa. A resposta das células dendríticas ao gênero *Cryptococcus* é mais intensa do que por macrófagos alveolares ou derivados de monócitos, com as manoproteínas constituindo os antígenos presentes na cápsula destes fungos, que são reconhecidos especialmente por essas células. Juntamente com o DNA criptocócico, as manoproteínas ativam as células dendríticas, sendo essa ativação dependente de Toll-Like Receptor-9 (TLR-9) (MA & MAY, 2009; LI & MODY, 2010).

O sistema complemento é composto por uma cascata de proteínas específicas que são ativadas pelo sistema imunológico, apresentando três principais vias: a MB lectina (ligação da manose à superfície do patógeno), a alternativa (superfície do patógeno na ausência de anticorpos) e a clássica (complexos antígeno-anticorpo) (VOELZ, 2010). É parte central da primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção criptocócica e, através da opsonização do patógeno e atração das células efectoras fagocíticas, realiza preparações importantes para a resposta imune, porém espécies do gênero *Cryptococcus* podem ser resistentes à formação de poro e lise durante o MAC (VOELZ & MAY, 2010).

Em um estudo envolvendo a investigação do papel das vias do complemento durante a infecção por *Cryptococcus gattii* em camundongos deficientes de componentes da via clássica ou alternativa, verificou-se que aqueles deficientes de fator B morreram mais rápido do que os selvagens, devido a uma carga fúngica elevada, indicando que a via alternativa desempenha uma função essencial na resistência da infecção por *C. gattii*. Outros camundongos, deficientes em C1q e C4, não morreram tão rápido do que àqueles que eram selvagens, mostrando que a via clássica não foi essencial para a proteção desse patógeno. Entretanto, a deficiência

de C3 foi mais prejudicial do que a de fator B, conforme demonstrado pela morte rápida de alguns camundongos. Há duas diferenças fundamentais entre camundongos deficientes de fator B e C3: 1) o primeiro pode ainda opsonizar com fragmentos C3, e 2) a via MB lectina permanece funcional na ausência de fator B, embora a quantidade de C3 depositada é esperada ser reduzida. Portanto, a via MB lectina também desempenha um papel importante durante a infecção criptocócica, principalmente à infecção causada por *C. gattii*, pela ligação da MBL murina a essa espécie (MERSHON, 2009).

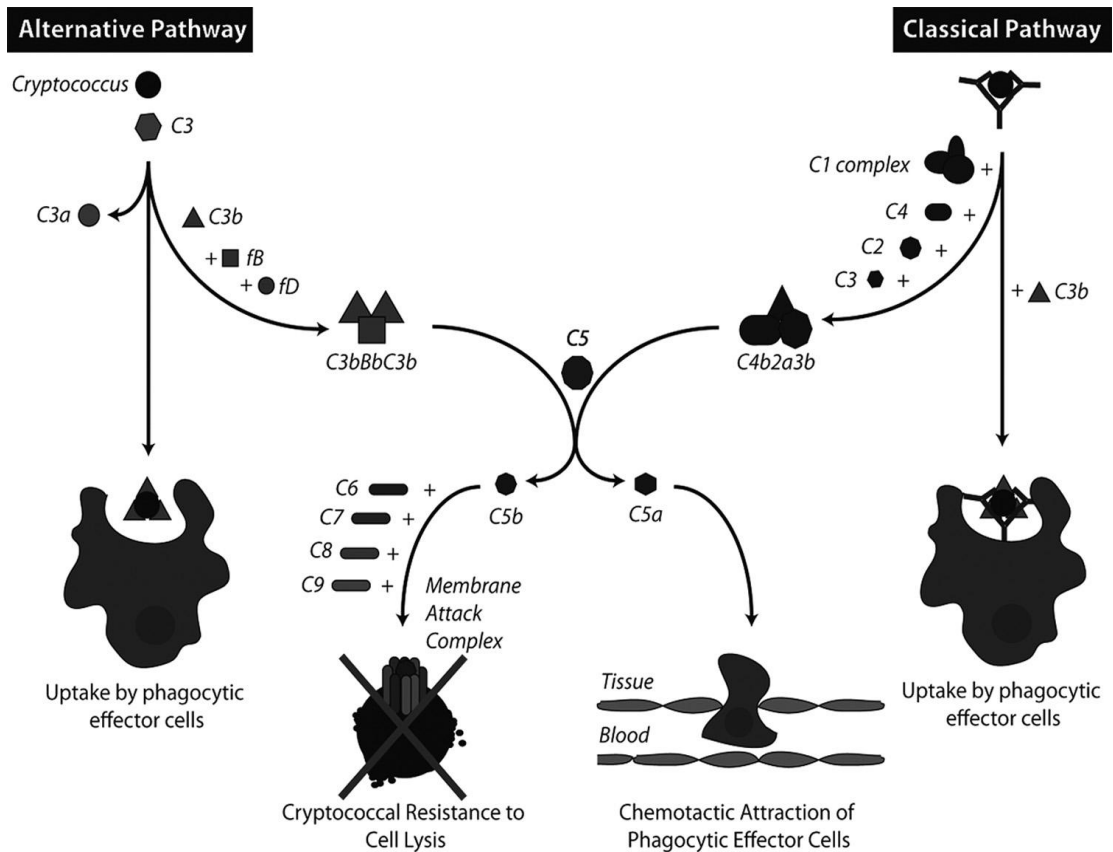


Fig. 2. Resumo das Vias do Sistema Complemento ativadas durante a infecção do gênero *Cryptococcus*. A levedura pode ativar a via clássica (mediada por anticorpo) e a via alternativa (mediada pela superfície microbiana). Ambas eventualmente convergem na formação de C3-convertase e a clivagem de C3 em C3a e C3b. C3B ou facilita a opsonização do patógeno e amplia a fagocitose, ou permite a clivagem de C5 em C5a e C5b. C5a funciona como um mediador das respostas inflamatórias e atrai as células efetoras fagocíticas, considerando que C5b inicia a formação do complexo de ataque a membrana (C5b, C6, C7, C8, C9). Contudo, o gênero *Cryptococcus* é resistente à formação do poro e lise celular pelo MAC. fB, fator B; fD, fator D. Adaptado de VOELZ & MAY, 2010.

5.1.2 Imunidade adaptativa

A imunidade adaptativa ou adquirida requer o reconhecimento de moléculas específicas do patógeno, sendo caracterizada por especificidade, memória e tolerância imunológica e é mediada por linfócitos T e B. A imunidade adaptativa necessita de ativação e proliferação de clones específicos desses linfócitos, a partir de uma célula progenitora, alcançando uma massa crítica de células efetoras que possam lidar com o agente infeccioso. Assim, tal resposta ocorre mais lentamente

do que os mecanismos inatos de defesa, embora seja mais robusta em casos de re-infecção (MACPHERSON & AUSTIN, 2010).

Os fagócitos, como macrófagos e células dendríticas, apresentam os antígenos protéicos, via MHC aos receptores de células T (TCR) localizados na superfície de linfócitos. Os TCRs de cada linfócito interagem de forma específica com um único antígeno. Cada linfócito T é dividido em: células T citotóxicas (Tc), que atacam e destroem diretamente células do hospedeiro infectadas com o patógeno, e células T auxiliares (Th) (do inglês *helper*), que secretam proteínas denominadas citocinas de forma indireta que, por sua vez, ativam outras células para combater o patógeno (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ desempenham um importante papel na erradicação da infecção criptocócica. Estas células podem utilizar granulísina, como molécula efetora, para eliminar espécies do gênero *Cryptococcus*. De forma especial, os linfócitos T CD4⁺ requerem a expressão de IL-2R β , dependente de PI3K, que é um pré-requisito para o recrutamento dessas células. Por outro lado, na imunidade inespecífica, as células NK protegem contra a infecção, utilizando perforina como molécula citolítica, sendo dependente de PI3K e ERK1/2 (LI & MODY, 2010).

5.1.3 Imunidade celular

A defesa do hospedeiro contra as espécies do gênero *Cryptococcus* requer principalmente a imunidade mediada por células. A infecção é determinada por

vários tipos celulares e suas citocinas, que compreendem um grupo de proteínas solúveis, produzidas por leucócitos, cuja função é mediar a resposta imune, através da ativação das células efetoras que combaterão o patógeno fúngico. As principais citocinas do hospedeiro são: IL-2 e IL-12 (resposta Th1) e IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (resposta Th2), incluindo também TNF e IFN. Um aumento nos níveis de citocinas, como IL-10 e IL-4, favorece a progressão da doença, visto que IL-10 apresenta um papel na inibição da ativação macrofágica. Tais citocinas são ativadas após a infecção dos patógenos extracelulares e resulta em uma imunidade mediada por anticorpos (MA & MAY, 2009; VOELZ, 2010; HOLE, 2012).

As citocinas já citadas anteriormente e, principalmente outras, estão envolvidas na proteção contra *Cryptococcus gattii*. IL-4 e IL-13 reduzem a habilidade do hospedeiro em combater a infecção causada por esse fungo, enquanto o aumento da expressão de citocinas associadas à resposta Th1 resulta em melhor depleção do fungo, devido à ativação de macrófagos (VOELZ, 2010).

Durante a infecção criptocócica, o balanço dessas citocinas é mantido principalmente por células efetoras fagocíticas, como: DC, neutrófilos, linfócitos primários, células NK e células T $\gamma\delta$. As células NKT podem estimular a produção de elevadas concentrações de IFN- γ pela estimulação de seus receptores antigênicos. Após a infecção, essas células foram encontradas sendo recrutadas para o pulmão, para desencadear uma resposta que levará ao controle da infecção (Th1), porém sem desencadear as respostas que possam levar à infecção (Th2). Ao contrário, as células T $\gamma\delta$ (gama-delta) desempenham um papel redutor da imunomodulação no desenvolvimento da resposta Th1 e resistência do hospedeiro contra o patógeno.

Assim, as células T $\gamma\delta$ podem atuar para equilibrar as respostas Th1 e Th2 pela supressão da resposta Th1 exagerada causada por células NKT. Essas funções contrastantes entre células NKT e T $\gamma\delta$ sugerem que essas respostas imunes não são as únicas para a indução da defesa do hospedeiro, mas também para equilibrar o nível de defesa (MA & MAY, 2009).

Os estudos que avaliam a resposta imune do hospedeiro às infecções criptocócicas têm sido realizados com a utilização de *C. neoformans* como um micro-organismo modelo. Entretanto, vários estudos sugerem, hoje em dia, que os mecanismos para mediar a proteção contra a infecção por *C. neoformans* diferem daqueles que induzem proteção contra *C. gattii*. Segundo estudos experimentais, *C. gattii* pode sobreviver em hospedeiros imunocompetentes através da supressão da resposta imune. A linhagem R265 de *C. gattii*, o isolado mais predominante do surto ocorrido na ilha de Vancouver (Canadá), mostrou ser mais supressora em camundongos comparado àqueles infectados por *C. neoformans*. Em camundongos infectados por *C. gattii*, houve a redução do recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (HOLE & WORMLEY JR., 2012).

5.1.4 Imunidade humoral

Embora poucos estudos sugiram que os anticorpos possam ter um papel fundamental nas infecções fúngicas, a imunidade humoral não era bem estudada devido à dificuldade em demonstrar anticorpos ao patógeno por técnicas imunológicas existentes, gerando resultados inconsistentes. Assim, acreditava-se

que somente a imunidade mediada por células oferecia amplas funções na defesa do hospedeiro contra fungos, enquanto a imunidade mediada por anticorpos não apresentava nenhuma importância. Porém, nas últimas décadas, mostrou-se que este tipo de imunidade pode oferecer proteção aos patógenos fúngicos se certos tipos de anticorpos protetores estiverem disponíveis em quantidade suficiente. As principais funções reconhecidas da imunidade humoral em tais infecções incluem: prevenção de aderência, neutralização de toxinas, opsonização de anticorpo e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (BLANCO & GARCIA, 2008).

Os anticorpos contra proteínas criptocócicas e polissacarídeos da cápsula destes fungos podem ser encontrados em indivíduos sem nenhuma infecção aparente na rotina clínica, indicando infecções latentes ou assintomáticas. Observou-se em estudos de criptococose, que a administração passiva de anticorpo ligado à cápsula prolonga a sobrevivência e/ou diminui a carga fúngica do hospedeiro. Tais anticorpos reverterem o efeito protetor da cápsula por meio da opsonização, potencializando a fagocitose dependente do receptor Fc e da ativação da via clássica do complemento (VOELZ & MAY, 2010).

A proteção contra a infecção é dependente do isótipo do anticorpo, concentração e especificidade. Em estudos com o gênero *Cryptococcus* a partir de modelos murinos, percebe-se que anticorpos idênticos em suas regiões variáveis, porém se diferenciando, nas regiões constantes, mostram afinidade de ligação e especificidade a um antígeno peptídico univalente e, assim, subgrupos de anticorpos desenvolvidos do mesmo linfócito B podem ser protetores ou não-protetores de acordo com alguns padrões característicos (anular ou pontual). Embora derivados

do mesmo linfócito B, estes dois subtipos reconhecem áreas espacialmente distintas da cápsula criptocócica, e apenas um padrão de opsonização pode induzir uma resposta imune protetora em camundongos. A predominância de anticorpos protetores comparado a não-protetores determina a eficácia da imunidade mediada por anticorpos à infecção criptocócica, devido às pequenas diferenças nas especificidades no epítipo do anticorpo apresentarem um grande impacto no efeito protetor. Aqueles que são protetores mostram uma distribuição pontual na cápsula, e esses com um padrão anular de distribuição são não-protetores (VOELZ & MAY, 2010).

A concentração do anticorpo desempenha uma importante função para a proteção do hospedeiro. Em modelos murinos, a resistência à infecção pode depender da proporção de anticorpos anti-criptocócicos produzidos quando esses animais são infectados por espécies do gênero *Cryptococcus*. Entretanto, a eficácia desses anticorpos pode ser perdida se induzida ou passivamente administrada em excesso. Há uma evidência que mostra que o efeito protetor de anticorpos é no mínimo parcial, devido à interação com a imunidade mediada por células. Camundongos que possuem depleção de citocinas, como IFN- γ , não podem ser protegidos pela administração passiva de anticorpos IgG1 (VOELZ & MAY, 2010; HOLE & WORMLEY JR., 2012).

Apesar do conhecimento sobre estudos animais de isótipos de anticorpos protetores, a eficácia de vários isótipos de imunoglobulinas contra a infecção criptocócica pode variar entre humanos e camundongos, requerendo cuidados na tentativa de traduzir achados em modelos animais e levá-los para a clínica. Esses

anticorpos apresentam diversas vantagens, além das citadas anteriormente, uma vez que podem inibir a formação de biofilme criptocócico, alterar o metabolismo de lipídeos, resultando em sensibilidade às drogas antifúngicas com atividade antifúngica direta e modulação da resposta imune do hospedeiro (HOLE & WORMLEY JR, 2012).

Embora ainda existam controvérsias em relação à imunidade mediada por anticorpos durante a infecção por *Cryptococcus gattii*, há necessidade de realizar novos estudos. O papel protetor de anticorpos contra a criptococose já foi observado em um estudo no qual revela que a ocorrência natural de IgM (nIgM) é essencial para a prevenção da criptococose em camundongos. A criptococose é mais grave em camundongos que não apresentam IgM no soro e também em camundongos deficientes de IgM secretória (sIgM), com essa última resultando em mortalidade, devido à carga fúngica elevada no sangue e cérebro, comparados àquela observada em camundongos infectados com a cepa selvagem (HOLE & WORMLEY JR, 2012).

5.2. Fatores de virulência de *C. gattii* e sua relação com o sistema imunológico

Leveduras do gênero *Cryptococcus* possuem vários fatores de virulência, que permitem o seu desenvolvimento no hospedeiro humano, propiciando o estabelecimento da relação parasitária e contribuindo no processo da doença. Dentre os principais fatores de virulência deste gênero destacam-se a termotolerância, os componentes da parede celular e da cápsula, a capacidade de adesão, os receptores de hormônios e a produção de enzimas, como lacases, ureases e fosfolipases B (KUROKAWA, 1998).

A tabela 1, adaptada de Ashwin et al. (2009), expõe uma série de fatores de virulência de *C. gattii* e seus papéis frente ao hospedeiro.

Tabela 1 – Fatores de virulência

Fator	Função
Cápsulas e polissacarídeos associados	Evasão da fagocitose; Redução da apresentação do antígeno; Redução da produção de citocinas; Indução de células T supressoras, que inibem imunidade mediada por células; Inibição da resposta das células T por GXM; Inibição pela GXM da migração de leucócitos aos sítios de inflamação.
Melanina	Proteção contra a radiação UV; Proteção contra radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio; Pode contribuir ao tropismo pelo SNC; Contribui a carga celular negativa.
Manitol	Sugestão de aumento na pressão intracranial; Proteção contra estresse; Proteção contra radicais livres derivados de oxigênio.
Proteases extracelulares	Atividade proteolítica; Pode contribuir com a degradação de proteínas envolvidas na integridade tecidual e imunidade do hospedeiro.
Produtos da rota da lacase	Oxidação de difenol; Síntese de melanina; Degradação de lignina da madeira.
Superóxido-dismutase	Proteção contra estresse oxidativo; Proteção contra ruptura oxidativa produzidas por células imunes efectoras.
Fosfolipases	Invasão tecidual pela degradação de lipídeos de membrana dos mamíferos e surfactante pulmonar.
Urease	Função exata desconhecida; Pode agir na transferência de <i>Cryptococcus</i> para o SNC.
Fator de transcrição stea (em células de mating-type α)	Seu aumento pode levar a síntese da difenoloxidase (que é uma lacase).
Crescimento a temperatura fisiológica (37°C)	Sobrevivência e persistência no hospedeiro
Tolerância a pH baixo	Sobrevivência e persistência no ambiente
Tolerância a níveis elevados de sal	Sobrevivência e persistência no ambiente
Mudança fenotípica	Mudança no tamanho da cápsula – variante mucóide mais virulenta, variante mais lisa supostamente capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica.

FONTE: Ashwin, 2009.

Dentre os fatores citados na tabela acima, os mais importantes são a presença da cápsula polissacarídica, a produção do pigmento melanina e as enzimas.

5.2.1 A cápsula polissacarídica

Os componentes capsulares predominantes são os polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM), determinante dos sorotipos A, B, C, D e AD, e a galactoxilomanana (GalXM), um polissacarídeo de pequeno tamanho. A GXM constitui cerca de 90% da cápsula, dentre resíduos de manose, conectados com grupos laterais de xilosil e glucuronil, enquanto GalXM apresenta uma estrutura mais elaborada, apesar de constituir apenas 7% da massa capsular. Além disso, há outros componentes que constituem a fração menor da cápsula, como as manoproteínas, que têm sido foco de vários estudos imunológicos, pelo seu envolvimento na indução da imunidade mediada por células e produção de citocinas. Embora ainda não esteja bem definido se as manoproteínas são componentes capsulares, as manoproteínas, quando manosiladas ou glicosiladas, atuam como antígenos criptocócicos, promovendo a maturação e ativação das células dendríticas, sendo responsáveis pela estimulação da resposta aos linfócitos T (BOSE et al., 2003; MA & MAY, 2009).

A cápsula criptocócica pode variar de tamanho dependendo das condições ambientais. Durante a infecção por *Cryptococcus gattii*, há um aumento significativo deste polissacarídeo, podendo ser induzido *in vitro* por concentrações elevadas de CO₂, pela limitação de ferro e contato com os macrófagos. Assim, os efeitos da cápsula são benéficos para o próprio fungo, pois o encapsulamento dificulta a

fagocitose por neutrófilos, monócitos e macrófagos. Além de inibir a fagocitose, a levedura por meio da cápsula pode também inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, inativar o sistema complemento por meio do bloqueio da fixação de C3b e da via clássica, reduzir a migração de leucócitos para o local da infecção e suprimir a expressão de moléculas de adesão (BOVERS, 2008; GOULART, 2009; RELATÓRIO TÉCNICO, 2008).

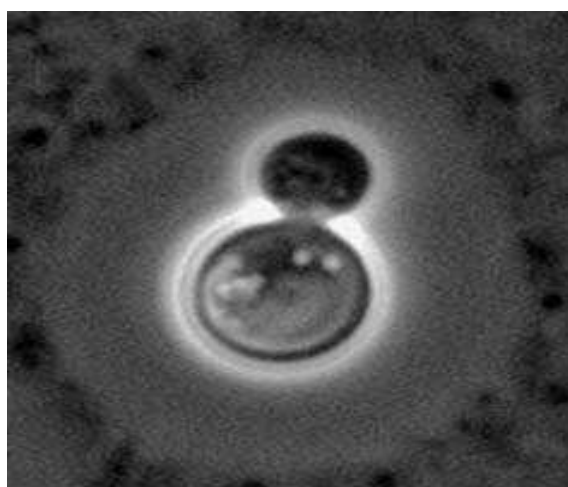


Fig. 3. **Cápsula de *Cryptococcus gattii***. Célula leveduriforme em brotamento corada com tinta da Índia após 2 dias à temperatura ambiente em ágar Littmann. Adaptado de Bovers (2008).

A cápsula provavelmente funciona como um inibidor do sistema complemento durante a resposta do hospedeiro, como o ataque aos fungos pela fagocitose, inibindo a via clássica e reduzindo a atividade de C3-convertase pela remoção eficiente de C3b e, assim, restringindo a amplificação da atividade. Assim, as diferenças na ativação do complemento entre *C. neoformans* e *C. gattii* pode ser importante para a virulência de certas linhagens do sorotipo B. Alguns dados recentes de ensaios de sobrevivência de fator B ou camundongos deficientes em

C3, após a infecção por *C. gattii*, sugeriram que as vias do sistema complemento contribuem para a proteção do hospedeiro (VOELZ & MAY, 2010).

Em um estudo envolvendo os sorotipos do gênero *Cryptococcus*, o qual correlaciona as propriedades físico-químicas e estruturais de 5 amostras de GXM na habilidade de estimular a produção de óxido nítrico (NO) e ativar o fator nuclear kB (NF-kB) em células que expressam, ou TLR2/TLR1, ou TLR2/TLR6, verificou-se que a amostra de GXM do sorotipo B de *Cryptococcus gattii* é especialmente eficiente na ativação dessas respostas celulares, juntamente com propriedades sorológicas específicas e com o diâmetro reduzido de moléculas polissacarídicas. De acordo com tal estudo, a resposta celular a essa amostra de GXM foi sempre mais intensa em células que expressam TLR2/TLR1 do que as que expressam TLR2/TLR6, e os níveis elevados de ativação de NF-kB foram obtidos quando as células HEK293A foram expostas ao sorotipo B. Além disso, ao utilizar um modelo de produção de NO por macrófagos neste estudo, foram observados que os polissacarídeos com dimensões reduzidas induziram uma resposta celular mais forte, sendo esta propriedade exclusiva de amostras de GXM do sorotipo B. Portanto, esses isolados que produzem pequenas moléculas de GXM manifestariam uma habilidade para ativar alguns mecanismos da resposta imune (FONSECA, 2010).

O estudo da interação entre os diversos componentes de *Cryptococcus gattii* com células que inicialmente interagem com o mesmo é relevante para o entendimento dos fatores de virulência e da resposta imune a esse fungo. A GXM pode interagir com as células pulmonares por meio de TLRs e do receptor CD14, resultando na produção de quimiocinas que contribuirão para o processo

inflamatório. Com essa interação, pode ocorrer o aumento da expressão de CD40 e CD86, a redução da expressão de MHC de classe II e, posteriormente, a indução da produção de IL-10 com a redução da produção de citocinas após estímulo com LPS (NOGUEIRA, 2012).

5.2.2 O pigmento melanina

A produção de melanina é outro fator de virulência importante. Sua síntese é catalisada por uma lacase, ocorrendo quando componentes fenólicos, como catecolaminas, estão presentes. A produção desse fator de virulência que se deposita na parede do fungo é proveniente de substratos contendo dopamina e da ação de enzimas como a fenoloxidase. *C. gattii* e *C. neoformans* apresentam tropismo pelo SNC, uma vez que o cérebro é rico em substratos para a fenoloxidase. A capacidade de produzir melanina é caracterizada pela formação de colônias marrons em meios com extrato de sementes de *Niger*, não ocorrendo em outras espécies do gênero *Cryptococcus* (BOVERS, 2008; RELATÓRIO TÉCNICO, 2008).

No ambiente, a melanina pode proteger a levedura de fatores físicos, como a luz ultravioleta, as altas temperaturas, congelamento e descongelamento. Além disso, a melanina pode exercer proteção contra agentes oxidantes, possuindo certa afinidade a metais e radicais livres, podendo estabilizar essas substâncias em sistemas biológicos e promover armadilhas aos elétrons desemparelhados para evitar algum dano em potencial. O papel antioxidante da melanina do gênero *Cryptococcus* pode ser particularmente importante à temperatura de 37°C, cuja atividade da superóxido dismutase é reduzida (MA & MAY, 2009; URÁN, 2008).

Alguns autores observaram que as células criptocócicas recuperadas de tecido cerebral humano são melanizadas e os estudos de inativação do gene para a síntese de melanina indicam que cepas selvagens de *Cryptococcus gattii* produtoras de melanina são mais virulentas. As células melanizadas são menos susceptíveis aos oxidantes em comparação com as não-melanizadas. Esses resultados sugerem que a melanina pode ampliar a virulência, protegendo os fungos do ataque das células efectoras do sistema imunológico (MA & MAY, 2009).

5.2.3 As enzimas

Além de lacases, *Cryptococcus gattii* também produz proteinases, fosfolipases e ureases. As proteinases degradam proteínas do hospedeiro, como colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulinas e fatores do complemento. A multiplicação de *C. gattii* no interior de macrófagos é acompanhada pela produção dessas enzimas, levando à lise da membrana macrofágica e, conseqüente dano aos tecidos do hospedeiro. Já as fosfolipases são um grupo heterogêneo de enzimas que são capazes de hidrolizar uma ou mais ligações-éster em glicerofosfolídeos. Como a proteinase, a hidrólise das ligações pela fosfolipase pode resultar na desestabilização das membranas, provocando lise da célula hospedeira, e liberação de metabólitos lipídicos secundários (MA & MAY, 2009).

A urease é uma enzima que catalisa a hidrólise da uréia a carbamato e constitui um importante fator de virulência para certos micro-organismos. A urease

do gênero *Cryptococcus*, denominada Ure1, é um fator de virulência relevante nestes fungos e segundo Ma & May (2009), camundongos infectados com uma cepa mutante ure1, com depleção da urease, apresentam uma maior sobrevivência quando comparados àqueles infectados com a cepa selvagem. Os padrões de disseminação no encéfalo, baço e outros órgãos após a inoculação intravenosa diferenciaram-se daqueles da cepa selvagem, levando à hipótese mais aceita de que a Ure1 é importante na invasão ao SNC pela captação da levedura por macrófagos nos microcapilares do cérebro (MA & MAY, 2009).

Para se proteger contra os efeitos danosos de radicais livres produzidos por macrófagos e neutrófilos, *Cryptococcus gattii* ainda pode produzir outras enzimas, como uma oxidase alternativa (AOX1), glutatona peroxidase (GLR1) e a superóxido dismutase (SOD). Esta última enzima converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, prevenindo a geração de moléculas tóxicas e radicais hidroxila. A maioria dos eucariotos expressa duas formas de SOD: a SOD que se liga ao cobre e zinco (SOD1p), encontrada no citoplasma, e a SOD mitocondrial (SOD2p). A SOD1p, segundo alguns estudos anteriores, desempenha um papel crucial na patogênese de isolados de *C. neoformans*, apresentando vários modos de ação, como proteger a levedura contra a morte fagocítica; guardar a maquinaria celular da levedura contra as condições de estresse; e, além disso, é necessária para o processamento adequado de vários fatores de virulência. Já a SOD2p é muito importante para a virulência de *C. gattii* à temperatura de 37°C, sob alta tensão de oxigênio (19-20%), enquanto essa enzima não é necessária na presença de antioxidante, como ácido ascórbico. Além disso, SOD2p é essencial para a manutenção do fungo sob condições de estresse (osmóticos e oxidativos) e

limitantes de nutrientes. Em um modelo murino de criptococose, nem sempre a SOD2p é necessária para a proteção de *C. gattii* contra os mecanismos de morte por PMN, muito menos os fatores de virulência. Estas descobertas, juntamente com estudos prévios, indicam que SOD1p e SOD2p desempenham funções essenciais e independentes na biologia e virulência deste patógeno fúngico primário, via dois modos de ação distintos (NARASIPURA, 2005; VOELZ & MAY, 2010).

5.2.4 Outros fatores

Várias observações de autores apontam que o *mating-type* pode ser um fator de virulência importante na infecção por espécies do gênero *Cryptococcus*. Como outros basidiomicetos, a recombinação genética pode ocorrer quando dois morfotipos distintos (a e α) se reconhecem e se fundem um ao outro para produzir um *dicáriorion* filamentoso, resultando em um estado diplóide transitório a / α , que imediatamente sofre meiose, com posterior esporulação, produzindo uma progênie haplóide a e α . As células de *mating-type* α são muito mais prevalentes do que células *mating-type* a. Isso pode ser comprovado de acordo com uma pesquisa feita com isolados clínicos e ambientais desses fungos, mostrando que o MAT α é 40 vezes mais abundante no ambiente e 30 vezes mais abundante em isolados clínicos do que o MAT a. Portanto, essa comprovação justifica-se pelo fato da maioria dos isolados clínicos da ilha de Vancouver ser MAT α (MA & MAY, 2009).

A mudança fenotípica, como um fator de virulência para *Cryptococcus gattii*, já foi observada em procariotos e eucariotos, sendo um processo reversível e detectável em uma fração de células. Ela pode ocorrer pela expressão espontânea do gene que promove o escape do reconhecimento pelas células do sistema

imunológico e à adaptação a um novo ambiente. Essa mudança fenotípica tem sido observada, até o momento, nos sorotipos A, B e D de isolados de *C. neoformans*, e tal mudança sempre provoca alterações na virulência, causando efeitos na cápsula polissacarídica ou na morfologia da parede celular. No caso da morfologia da parede celular, a mudança reversível foi encontrada entre dois tipos de colônia (mucóides e lisas). A mudança para colônias mucóides (paredes espessas) foi observada durante a infecção pulmonar, resultando em ampla sobrevivência intracelular devido à espessura da cápsula. Entretanto, as colônias lisas (parede delgada) puderam disseminar pelo SNC em camundongos infectados, porque colônias lisas atravessam a barreira hematoencefálica com mais facilidade. Além disso, a mudança fenotípica também influencia o resultado da resposta imune. Enquanto, colônias mucóides resultam em uma resposta mediada por neutrófilos e macrófagos, as colônias lisas resultam em uma resposta mediada por linfócitos (JAIN et al., 2006; MA & MAY, 2009).

Outro fator de virulência importante é o zinco, o qual é considerado como um micronutriente indispensável para todos os organismos vivos, principalmente fungos. Ele é um componente catalítico estrutural para o funcionamento de várias proteínas durante o metabolismo fúngico, o que pode ser comprovado pelo fato de cerca de 3% do proteoma necessitar de zinco para o seu funcionamento adequado. Por isso, os mamíferos desenvolveram uma estratégia de defesa contra estes micro-organismos, indisponibilizando zinco por meio da formação de complexos deste íon com proteínas, tais como calprotectina. Esta proteína é um componente da imunidade inata, encontrada principalmente na saliva, que inibe o crescimento

microbiano por meio da competição pelo zinco (SCHNEIDER et al., 2012; MIZOBE-ONO et al., 2006).

Os estudos sobre o metabolismo de zinco em fungos patogênicos foram mais focados em *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, devido à descoberta de fatores de transcrição (Zap1p, ZafA e Csr1p, respectivamente), que regulam o metabolismo de íons em tais espécies. A quelação de zinco pela calprotectina parece ser importante durante as interações entre as células criptocócicas e do sistema imunológico, como o neutrófilo, sendo a calprotectina constituindo 50% do teor protéico do citoplasma desta célula. Segundo Schneider e colaboradores (2012), o homólogo funcional de *S. cerevisiae*, Zap1p, foi caracterizado em *C. gattii* e utilizado para analisar a influência do zinco com relação à virulência criptocócica. Isso levou à descoberta de quatro evidências que apóiam a hipótese de que a Zap1 de *C. gattii* é um fator de transcrição para a homeostase de zinco, as quais são: 1) os níveis de Zap1 elevam em resposta à privação de zinco; 2) através da análise *in silico* da sequência protéica de Zap1, foram identificados vários domínios de zinco, comuns a todos os homólogos encontrados em outros fungos; 3) Zap1 está associada com a regulação da expressão de transportadores de zinco. Em mutantes “knockout” para este fator em *C. gattii*, os níveis de transcritos gênicos, que codificam os transportadores da família ZIP são muito reduzidos comparados a outras células; e 4) o crescimento da cepa *C. gattii* contendo zap1 Δ é diminuído nas condições limitantes de zinco. Consequentemente, os mutantes “knockout” de *C. gattii* para o fator de transcrição ZAP1 exibiram virulência atenuada em modelo de criptococose murina intranasal,

associando com macrófagos e cepas complementares nos ensaios de fagocitose (SCHNEIDER et al., 2012).

6. Mecanismos de evasão de *Cryptococcus gattii* nos tecidos do hospedeiro

O mecanismo de disseminação, denominado “Cavalo de Tróia”, apóia-se na observação de que *C. gattii* foi descoberto desenvolvendo-se no interior de macrófagos em infecções latentes e crônicas. As células criptocócicas podem cruzar o endotélio dos vasos sanguíneos do cérebro via esse mecanismo, envolvendo a migração de células efetoras fagocíticas com o fungo no seu interior. Além disso, as espécies deste gênero mostram-se capazes de infectar diretamente um macrófago a partir de outro sem estes fungos estarem expostos ao ambiente extracelular, mecanismo este denominado “transferência lateral”, sendo dependente de actina (MA & MAY, 2009; KRONSTAD et al., 2011).

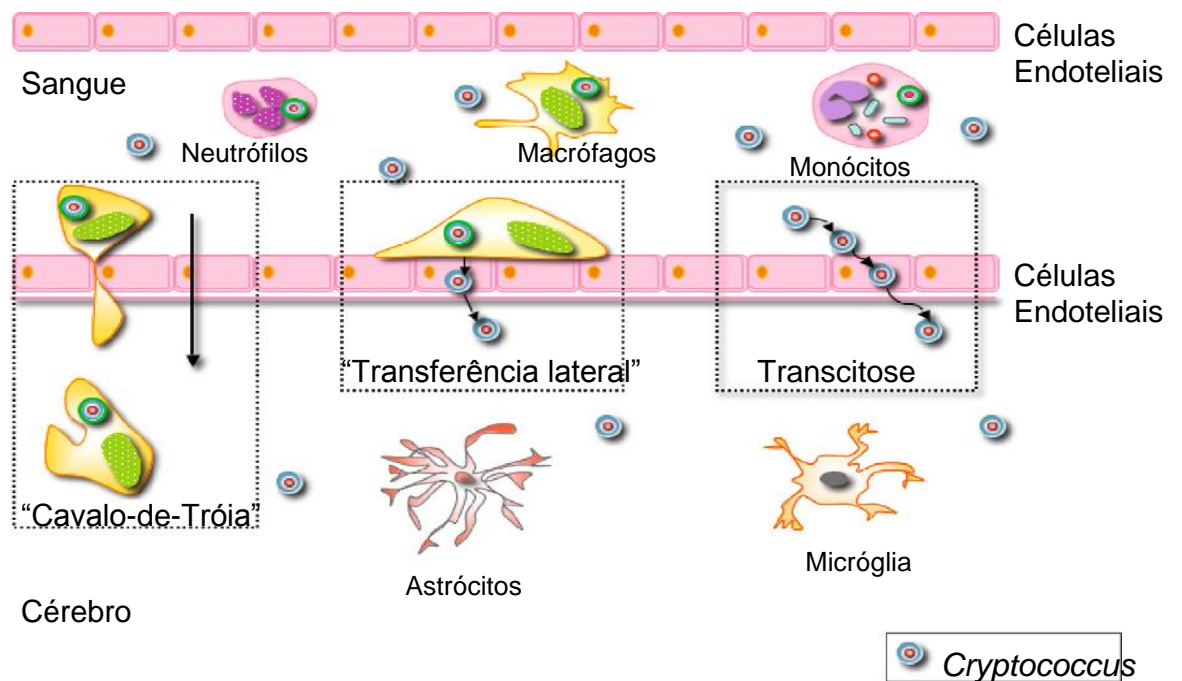


Fig. 4. Possíveis rotas para *Cryptococcus* para o cruzamento da barreira hematoencefálica: 1) Mecanismo “Cavalo-de-Tróia”; 2) Transferência lateral; e 3) Transcitose. Adaptado de Ma & May, 2009.

Por outro lado, *C. gattii* pode utilizar outro mecanismo para cruzar a barreira hematoencefálica: a transcitose, que é um processo em que tais fungos chegam ao cérebro por meio da passagem direta entre as células endoteliais dos vasos sanguíneos. De forma surpreendente, as células fúngicas podem exibir, durante a transmigração ao cérebro, uma morfologia distinta, com formato ovóide, apresentando um broto na superfície celular, sugerindo que uma mudança morfológica possa ocorrer como parte desse processo (KRONSTAD et al., 2011).

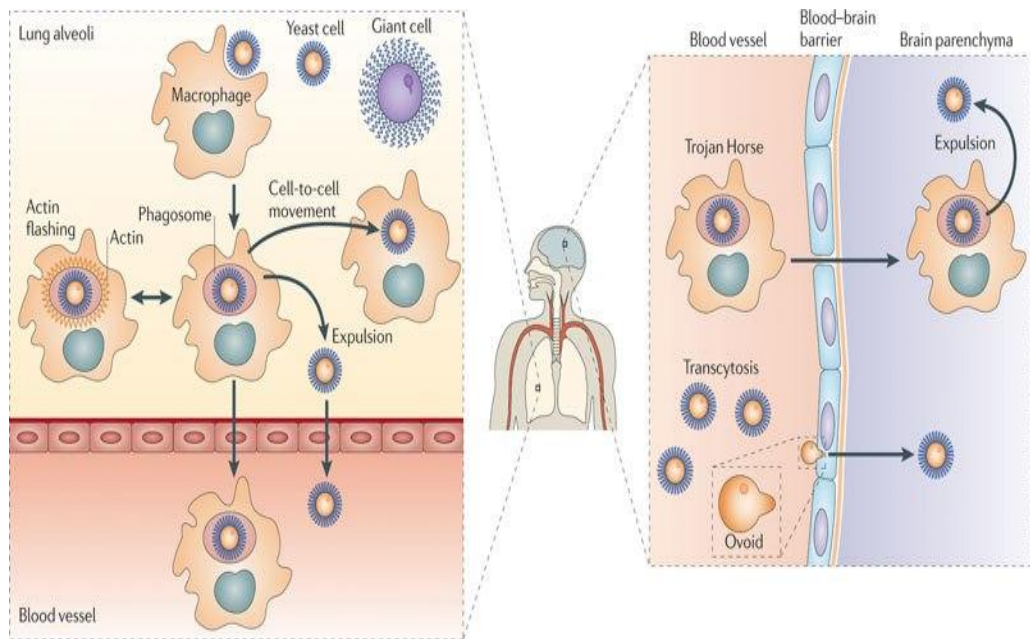


Fig. 5. Interações de células fúngicas com as células fagocíticas, e a disseminação fúngica através da barreira hematoencefálica. As células fúngicas no pulmão (painel esquerdo) são fagocitadas por macrófagos alveolares e outras células fagocíticas, tais como neutrófilos. Entretanto, a subpopulação de células gigantes nos pulmões é refratária à fagocitose e pode permanecer extracelular. Na ausência de células efetoras do sistema imune, o fungo prolifera intracelularmente e extracelularmente. As células fúngicas podem escapar dos fagossomos de macrófagos por um mecanismo de expulsão que mantém a viabilidade de ambos os tipos celulares. O processo de expulsão pode também resultar em movimento do fungo célula a célula, quando resulta em passagem de leveduras entre macrófagos adjacentes. Células fúngicas podem estar contidas dentro de macrófagos por inibição transitória de expulsão, causada pela formação de um envoltório de actina. As células fúngicas livres ou que estão no interior das células fagocíticas entram na corrente sanguínea e alcançam o SNC. Observações por microscopia intravital também apóiam um mecanismo adicional por meio do qual as células fúngicas cruzam o endotélio capilar pela transcitose direta, sendo então proposto que uma mudança morfológica pode ocorrer durante esse processo. Especificamente, as leveduras esféricas adotam uma morfologia mais ovóide no sítio de interação inicial com as células endoteliais. Adaptado de Kronstad et al., 2011.

De forma especial, foi descoberto que *C. gattii* pode ser expelido por macrófagos como células individualizadas ou como microcolônias em forma de um biofilme, sendo um processo extremamente rápido e ocorrendo ainda muitas horas após o processo fagocítico. Apesar de tal mecanismo ser desconhecido em níveis moleculares, o processo parece ser dependente do citoesqueleto e não da maturação do fagossoma. Paralelamente aos estudos recentes de proliferação intracelular e lise celular, este mecanismo permite o patógeno re-emergir da célula hospedeira de forma sutil, representando uma forma de escape das células fagocíticas sem desencadear morte celular e inflamação (MA & MAY, 2009).

7. CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados até o momento, os mecanismos de resposta imune à infecção por *C. gattii* têm sido cada vez mais elucidados, sendo considerados ótimos parâmetros para a criação de novos medicamentos e vacinas para o tratamento da criptococose.

Além disso, algumas evidências conclusivas demonstram que a imunidade natural e a adaptativa do hospedeiro continuam a ser respostas essenciais para o controle desse fungo, por meio da ativação de células (macrófagos, células dendríticas, etc) e linfócitos T e B por meio de citocinas que medeiam o sistema imunológico. Embora a imunidade humoral tenha sido pouco estudada nas últimas décadas, os estudos mostram que os anticorpos também possuem funções relevantes durante a infecção, como por exemplo, a inibição do biofilme criptococócico.

Resultados relevantes também foram obtidos a respeito dos fatores de virulência de *C. gattii*, principalmente em relação à Ure1, pelo envolvimento na transmigração de leveduras ao cérebro. No entanto, mais pesquisas ainda são necessárias para investigar cada processo de forma bem detalhada, e assim possibilitar o entendimento fidedigno da infecção para a escolha da terapia mais adequada.

8. REFERÊNCIAS

ASHWIN, D.; CARROLL, S. F.; QURESHIL, S. T. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, n. 840452, 13 p, 2009.

BALTAZAR, L. M.; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Soc. Bras. Med. Trop**, v.41, n. 5, p. 449-453, 2008.

BLANCO, J.L.; GARCIA, M.E. Immune response to fungal infections. **Vet. Immun. Immunopathol.**, v. 125, p. 47–70, 2008.

BOSE, I.; REESE, A. J.; ORY, J. J.; JANBON, G.; DOERING, T. L. A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 4, p. 655–663, 2003.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E. E.; DIAZ, M. R.; SPANIAARD, L.; DROMER, F.; HOOGVELD, H. L.; BOEKHOLT, T. Unique hybrids between fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 599-607, 2006.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOECKHOUT, T. Diversity of *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, p. S4-S12, 2008.

CHAKRABARTI, A.; JATANA, M.; KUMAR, P.; CHATHA, L.; KAUSHAL, A.; PADHYE, A. A. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 12, p. 3340-3342, 1997.

CURTIS, F. Contribution à l'étude de la saccharomycose humaine. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 10, p. 449-468, 1896.

DINIZ JR, P. L; AMADIO, J. V. R. S; MARTINS, E. R.; SIMÕES, S. A. A.; YAMAMOTO, C. A.; LEAL-SANTOS, F. A.; TAKAHARA, D. T.; HAHCN, R. C. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, 2012, v. 7, n. 11, pp. 1-7.

FONSECA, F. L.; NOHARA, L. L.; CORDERO, R. J. B.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ALMEIDA, I. C.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L. **Infect. Immun**, 2010, 78 (9): 3861. DOI: 10.1128/IAI.00111-10.

FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; ROMNEY, M.; STARR, M.; PEARCE, M.; MAK, S. et al. *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate climate. **Can. Commun. Dis. Rep.**, v. 34, p. 1–13, 2008.

GOULART, Leticia Silveira. Genes diferencialmente expressos por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* durante a infecção de macrófagos. Porto Alegre, 2009. 101 f. Tese [Doutorado em Ciências] – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

HARVEY, R.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **MICROBIOLOGIA ILUSTRADA**. Tradução: SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 448 p., 2008.

HOLE, C. R.; WORMLEY JR, F. L. Vaccine and immunotherapeutic approaches for the prevention of cryptococcosis: lessons learned from animal models. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 291, 2012.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, p. 17258-17263, 2004.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **IMUNOLOGIA DE KUBY**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 704 p., 2008.

KRONSTAD, J. W.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B.; CHOI, J.; D'SOUZA, C. A.; GRIFFITHS, E. J.; GEDDES, J. M. H.; HU, G; JUNG, W. H.; KRETSCHMER, M.; SAIKIA, S.; WANG, J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews**, v. 9, p. 193-203, 2011.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 40, n. 3, 1998.

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

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. In Kwon-Chung, K. J. & Bennett, J. E. (eds.), **Medical Mycology**, 1 ed, Lea & Febiger, Philadelphia, p. 392-446, 1992.

LAZERA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 24, p. 254-264.

LAZERA, M. S.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; CAVALCANTI, M.A.S.; WANKE, B. Criptococose. In J. R. Coura (org), *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 1 ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Vol. II, pp. 1223-1235, 2005.

LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v. 7, p. 186–196, 2010.

LIN, X.; HEITMAN, J.. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Ann Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* Species. In: LASKIN, A. I.; SARIASLANI, S.; GADD, G. M. editors: **Adv. in App. Microb.**, v. 67, Burlington: Academic Press, p. 131-190, 2009.

MACPHERSON, G.; AUSTIN, J. **Exploring immunology**: concepts and evidence. Reino Unido: Wiley-Blackwell, 2012, 372 p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **MICROBIOLOGIA DE BROCK**. Tradução: KYAW, C. M. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004, 608 p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **MICROBIOLOGIA DE BROCK**. Tradução: KYAW, C. M. 12 ed. São Paulo: Artmed, 2010, 1128 p.

MERSHON, K. L.; VASUTHASAWAT, A.; LAWSON, G. W.; MORRISON, S. L.; BEENHOUWER, D. O. **Infect. Immun.** 2009, 77 (3): 1061. DOI: 10.1128/IAI.01119-08.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; E OUTROS. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, 2003, v. 9, n. 2, pp. 189-195.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical of Microbiology Review**, v. 8, p. 515-548, 1995.

MIZOBE-ONO, L.; ARAÚJO, J. L. P.; DOS-SANTOS, M. C. Componentes das imunidades inata e adaptativa presentes na saliva humana. **Revista de Odontologia da UNESP**, 2006, v. 35, n. 4, pp. 253-261.

NARASIPURA, S. D.; CHATURVEDL, V.; CHATURVEDL, S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. **Molecular Microbiology**, 2005, v. 55, n. 6, pp. 1782-1800.

NOGUEIRA, Marcelo Rocha. Efeito da glucuronoxilomanana (GXM) obtida do *Cryptococcus neoformans* e do *Cryptococcus gattii* sobre a resposta de células mononucleares humanas ao IFN- γ . Uberaba, 2012. Dissertação [Mestrado em Patologia Clínica] – Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2012.

PEREIRA, T., BARROS, R. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: Perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. **FACIDER - Revista Científica**, 2012. Disponível em: <<http://seicesucol.edu.br/revista/index.php/facider/article/view/19>>. Acesso em: 14 Dez 2012.

RELATÓRIO TÉCNICO. Consenso em criptococose. **Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.

SCHNEIDER, R.; FOGAÇA, N. S. S.; KMETZSCH, L; SCHRANK, A; VAINSTEIN, M. H.; STAATS, C. C. Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8: e43773, 2012.

SORREL, T. et al. Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p.1261-1263, 1996.

URÁN, M. E.; CANO, L. E. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. **Asociación Colombiana de Infectología**, 2008, v. 12, n. 2, pp. 357-377.

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

VOELZ, K. Macrophage-Cryptococcus interactions during cryptococcosis. Birmingham, 2010. Tese [Doutorado em Filosofia], Escola de Biociências, Universidade de Birmingham, 2010.

VUILLEMIN, P. Les blastomycètes pathogènes. **Rev. Gen. Sci. Pures. Appl.**, v. 12, p. 732-751, 1901.