

## Efeitos do *Cryptococcus neoformans* na ativação de células epiteliais basais alveolares humanas adenocarcinômicas (células A549)

*Effects of Cryptococcus neoformans on activation of human alveolar basal epithelial adenocarcinoma cells (A549 cells)*

Karina Cristina da Cruz Freitas<sup>1</sup>, Wanessa Maria Santos<sup>1</sup>, Aline Beatriz Mahler Pereira<sup>1</sup>, Leonardo Euripedes Andrade-Silva<sup>2</sup>, Paulo Roberto da Silva<sup>1</sup>, Mario Leon Silva Vergara<sup>3</sup>, Alexandre de Paula Rogério<sup>\*1</sup>

### RESUMO

**Introdução:** O epitélio brônquico possui mecanismos de defesa baseados na imunidade inata contra diversos microrganismos veiculados pelo ar, entre eles o *Cryptococcus neoformans*. **Objetivo:** Avaliamos os efeitos inflamatórios de *C. neoformans* usando células de adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano (células A549). **Métodos:** Células A549 foram expostas ao *C. neoformans* (Multiplicidade de Infecção - MOI 1:100) e as análises foram realizadas 24 horas após o estímulo. **Resultados:** *C. neoformans* aumentou a produção de IL-6 e TGF- $\beta$ 1, mas não de IL-8 e IL-10, e ativou a fosforilação de ERK1/2 e NF-B em células A549 quando comparado ao grupo controle. Houve maior adesão de *C. neoformans* quando comparada à internalização em células A549. **Conclusão:** O *C. neoformans* é capaz de promover alterações nos parâmetros inflamatórios em células epiteliais basais alveolares de adenocarcinoma humano.

**Palavras-chave:** Células A549; *Cryptococcus neoformans*.

<sup>1</sup> Institute of Health Sciences, Department of Biomedicine, Laboratory of Experimental Immunopharmacology, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Infectious Diseases Unit, Internal Medicine Department, EBSEH, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup> Institute of Health Sciences, Department of Internal Medicine, Laboratory of Mycology, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

#### Editor Associado Responsável:

Dr. Henrique Vitor Leite  
Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal de Minas Gerais.  
Belo Horizonte/MG, Brasil.

#### Autor Correspondente:

Alexandre de Paula Rogério  
<sup>1\*</sup>Department of Biomedicine,  
Laboratory of Experimental  
Immunopharmacology, Instituto de  
Ciências da Saúde, Universidade Federal  
do Triângulo Mineiro, Minas Gerais,  
Brasil.

E-mail: alexandre.rogerio@uftm.edu.br

## ABSTRACT

**Introduction:** The bronchial epithelium has defense mechanisms based on innate immunity against various airborne microorganisms, including *Cryptococcus neoformans*. **Purpose:** We evaluated the inflammatory effects of *C. neoformans* using human alveolar basal epithelial adenocarcinoma cells (A549 cells). **Methods:** A549 cells were exposed to *C. neoformans* (Multiplicity of Infection - MOI 1:100) and the analyses were performed 24 hours after stimulation. **Results:** *C. neoformans* increased the production of IL-6 and TGF- $\beta$ 1, but not IL-8 and IL-10, and activated ERK1/2 and NF- $\kappa$ B phosphorylation in A549 cells when compared to the control group. There was a greater adhesion of *C. neoformans* when compared to internalization in A549 cells. **Conclusion:** The *C. neoformans* is able to promote changes in inflammatory parameters in human adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells.

**Keywords:** A549 cells; *Cryptococcus neoformans*.

## Fontes apoiadoras:

Este trabalho foi financiado por Auxílios do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (no. 475349/2010-5), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; APQ 01631/11 e APQ-01873-14), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (Rede Mineira de Pesquisa Translacional em Imunobiológicos e Biofármacos no Câncer [REMITRIBIC, RED-00031-21]). Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001.

## Conflito de Interesse:

Não há.

## Comitê de Ética:

Não se aplica.

Recebido em: 23 Novembro 2023.

Aprovado em: 3 Março 2024.

Data de Publicação: 06 Julho 2024.

DOI: 10.5935/2238-3182.2024e34111

## INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença infecciosa presente mundialmente com mais de 70 espécies descobertas, mas apenas duas espécies são consideradas patogênicas em humanos: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*<sup>1,2</sup>. A grande maioria das infecções por cryptocócicas são causadas por *C. neoformans* principalmente em pacientes imunocomprometidos. As células epiteliais das vias aéreas são as primeiras células hospedeiras com as quais o *Cryptococcus* spp. tem contato próximo<sup>3,4</sup>.

As infecções pulmonares em indivíduos saudáveis geralmente se resolvem por conta própria; no entanto, em indivíduos com condições de imunossupressão, como pacientes com HIV/AIDS, pacientes com transplante sólido e pacientes com câncer, o *C. neoformans* pode ter mais facilidade em escapar da resposta imune e dos pulmões, espalhando-se pelo corpo até atingir o local onde tem predileção – o cérebro, causando meningite cryptocócica ou meningoencefalite<sup>5,6</sup>.

A célula A549, linhagem epitelial alveolar humana tipo II, originada de tecido de carcinoma pulmonar de paciente humano, é utilizada para estudos farmacológicos, toxicológicos e microbiológicos<sup>4,7,10</sup>, incluindo estudos com *C. neoformans*<sup>3-14</sup>.

Neste estudo, avaliamos, *in vitro*, o efeito de *C. neoformans* sobre a ativação de A549, como a produção das citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TGF- $\beta$ 1, e a ativação da fosforilação de transcrição dos fatores ERK1/2 e NF- $\kappa$ B, além da infectividade fúngica na célula.

## MÉTODOS

### CÉLULAS

Células A549 (doadas pelo Dr. David Bruce Levy do *Brigham and Women's Hospital*) foram cultivadas em meio DMEM/F-12 (Gibco - *Life Technologies*) mais 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco - *Life Technologies*) e 1% de antibióticos (penicilina, estreptomomicina e gentamicina) (Gibco - *Life Technologies*) em frascos de cultura (TPP) com

área de crescimento de 75 cm<sup>2</sup> e volume de 65 mL, mantidos em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### C. NEOFORMANS

Todos os experimentos foram realizados com *C. neoformans* var. *grubii* cepa H99 (ATCC MYA-4564). O *C. neoformans* foi cultivado e mantido em ágar Sabouraud dextrose (BD Biosciences). Para a estimulação celular, uma única suspensão de colônia em caldo Sabouraud dextrose (BD Biosciences) foi preparada após o crescimento até a fase estacionária inicial (48h) a 37 °C.

### ESTIMULAÇÃO

Células A549 (1 x 10<sup>5</sup> cel/mL) foram incubadas em placas de 96 poços e estimuladas com *C. neoformans* (Multiplicidade de Infecção - MOI 1:100; 100 fungos para 1 célula)<sup>8</sup> por 24h.

### PRODUÇÃO DE IL-6, IL-8, IL-10 E TGF-β1

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

### EXPRESSÕES DE FOSFO-NF-B E FOSFO-ERK1/2

As vias de sinalização do fosfo-NF-B e ERK1/2 foram avaliadas por citometria segundo Oliveira et al. (2015)<sup>12</sup>. Resumidamente, 24h após a estimulação com *C. neoformans*, as células foram fixadas com BD Cytofix Buffer (4%) durante 10 min a 37 °C. Após a centrifugação, as células foram permeabilizadas em paraformaldeído gelado por 30 minutos e então coradas com monoclonais anti-fosfo-NF-B ou anti-fosfoERK1/2 (BD Biosciences Pharmingen-Phosflow, EUA) ou seu isotipo 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 a análise.

Uma expressão de moléculas sinalizadoras intracelulares fosforiladas em 50.000 células viáveis foi analisada por citometria de fluxo (FACSCalibur; BD Biosciences Pharmingen).

### FAGOCITOSE IN VITRO

Para determinar os níveis de internalização de *C. neoformans* durante as adesões com células A549, o método de Pereira et al. (2021)<sup>9</sup> foi seguido. Resumidamente, as células de levedura foram marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 0,1 mg/mL, no escuro, por 30 min, e após lavagem em PBS. Células A549 foram estimuladas com *C. neoformans* por 24h a 37 °C, seguido de lavagem com PBS (3 vezes usando 1 mL cada) 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 tripano (200 µg/ml). O azul de tripano é um agente supressor da fluorescência derivada do FITC e, como não é capaz de

atingir o compartimento intracelular de células viáveis, esse corante é útil para discriminar *C. neoformans* intracelular e associado à superfície, extinguindo, assim, a fluorescência de não internalizados células. O azul de tripano não ligado foi removido por lavagem extensa com PBS e os complexos foram então analisados por citometria de fluxo.

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o *software* "Prisma" versão 5 da Graphpad (<http://www.graphpad.com>). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. A avaliação dos resultados foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tuckey. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## RESULTADOS

### A PRODUÇÃO DE IL-6 E TGF-β1 FOI AUMENTADA EM CÉLULAS A549 INFECTADAS COM C. NEOFORMANS

Primeiramente, avaliamos o efeito de *C. neoformans* na produção das citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TGF-β1 em A549. Células A549 infectadas com *C. neoformans* aumentaram significativamente a concentração de IL-6 (Figura 1A) e TGF-β1 (Figura 1D) quando comparadas ao grupo-controle. Não foram observadas alterações na produção de IL-8 (Figura 1B) e IL-10 (Figura 1C) entre os grupos.

Células A549 foram estimuladas com *C. neoformans* (MOI 100) por 24h. As concentrações de IL-6 (A), IL-8 (B), IL-10 (C) e TGF-β1 (D) foram avaliadas por ELISA. Os dados são a média ± SEM de três experiências independentes em triplicado (n=10).

### C. NEOFORMANS AUMENTOU A FOSFORILAÇÃO DE ERK1/2 E NF-B EM CÉLULAS A549

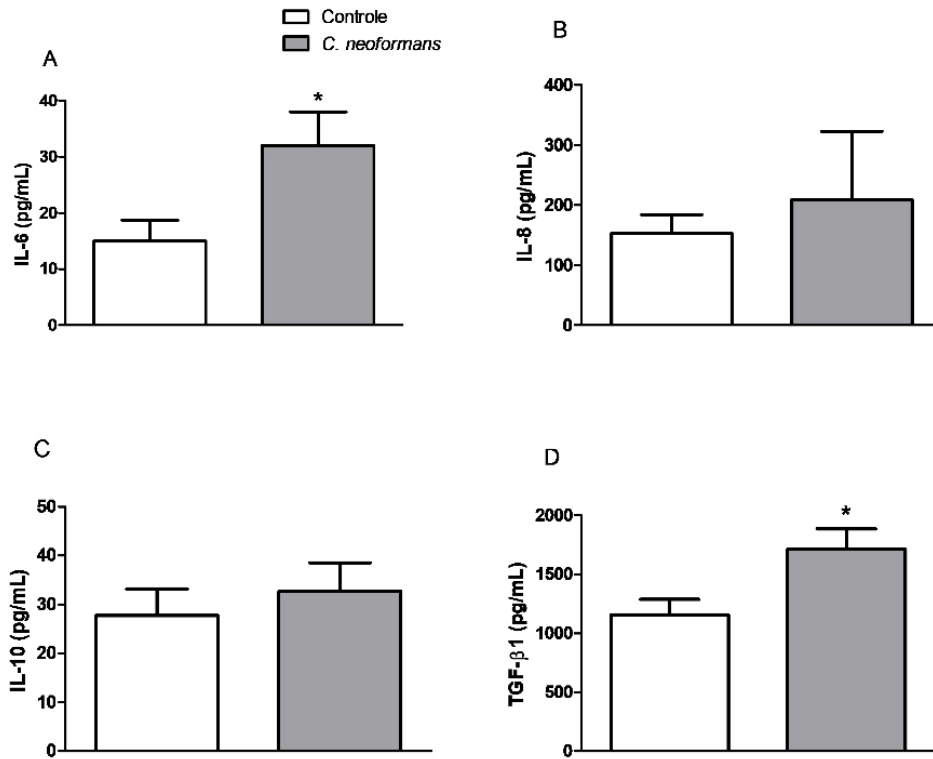
*C. neoformans* aumentou significativamente a fosforilação de ERK1/2 (Figura 2A) e NF-B (Figura 2B) em células A549 em comparação com grupos de controle.

Após 24h, as células foram recuperadas e a citometria de fluxo mostrando porcentagens de ERK1/2 (A) e NF-B (B) foram analisadas. Os dados são a média ± SEM de três experiências independentes em triplicado (n=4).

### ADESÃO E INTERNALIZAÇÃO DE C. NEOFORMANS EM CÉLULAS A549

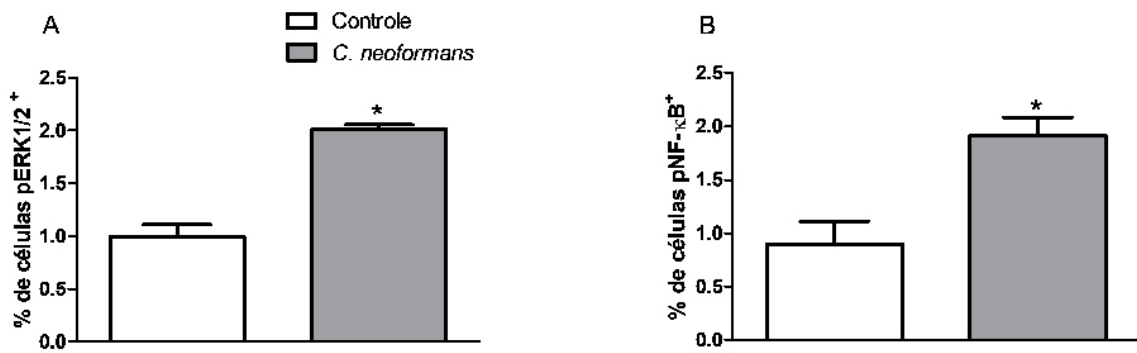
O número de células internalizadas por *C. neoformans* é muito menor do que a quantidade aderida nas células A549.

*C. neoformans* foi incubado com FITC (0,1 mg/mL) no escuro por 30 min. A549 foram estimulados com *C. neoformans* (MOI 100). Após 24h, as células foram recuperadas e analisadas por citometria para determinar a quantidade na superfície (barra branca) e intracelular (barra cinza) de *C. neoformans* foi então analisada por citometria de fluxo. Os dados são a média ± SEM de três experiências independentes em triplicado (n=8).



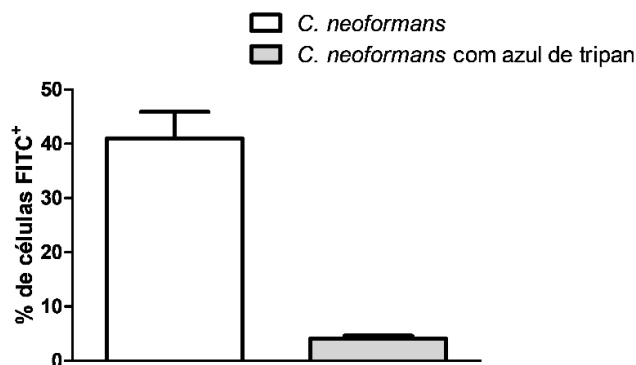
\* $p < 0,05$  versus grupo-controle.

**Figura 1.** Modulação da produção de citocinas em A549 estimulado com *C. neoformans*.



\* $p < 0,05$  versus grupo-controle.

**Figura 2.** As fosforilações de ERK1/2 e NF- $\kappa$ B foram aumentadas em A549 estimulado com *C. neoformans* (MOI 100).



**Figura 3.** Internalização e adesão de *C. neoformans* ocorreu em A549.

## DISCUSSÃO

O papel das células epiteliais na resposta inflamatória a *C. neoformans* é pouco explorado. *C. neoformans* é capaz de modular diversas 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 células pulmonares de camundongos e humanos prejudicam uma visão mais ampla de como *C. neoformans* interage com o epitélio pulmonar<sup>15</sup>. A célula A549, uma linha celular derivada de um adenocarcinoma pulmonar humano<sup>16</sup>, tem se mostrado muito útil em diversos estudos farmacológicos, toxicológicos e microbiológicos<sup>15,9</sup> inclusive em *C. neoformans*<sup>3</sup>.

A IL-6 desempenha um papel fundamental na inflamação e infecção<sup>16</sup>. Camundongos *knockout* para IL-6 infectados com *C. neoformans* aumentaram a quebra da barreira hematoencefálica, causando morte mais rápida em comparação com camundongos selvagens<sup>17</sup>. Reforçando isso, em um estudo de 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<sup>18</sup>. *C. neoformans* aumentou a produção de IL-6 em células A549 correspondendo a uma resposta inflamatória imune inata à infecção fúngica. Como a IL-6 desempenha um papel significativo na inflamação das vias aéreas e no controle de infecções fúngicas, sua produção pelas células imunes inatas das vias aéreas poderia favorecer os mecanismos de proteção das vias aéreas e diminuir a suscetibilidade ao desenvolvimento criptocócico.

A IL-8 é um mediador quimiotático, principalmente para neutrófilos, que atua na defesa do hospedeiro contra fungos, bactérias e vírus<sup>19,20,21</sup>. No trabalho de Guillot et al. (2008)<sup>22</sup>, observou-se que *C. neoformans* acapsulares viáveis são potentes ativadores de células epiteliais brônquicas humanas (BEAS-2B), induzindo uma secreção significativa de IL-8, que corresponde a uma resposta inflamatória aguda na célula. No entanto, em nosso experimento, nenhuma alteração significativa na produção de IL-8 foi observada entre as células controle e infectadas.

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 geralmente está relacionado à disseminação da doença e mortalidade precoce<sup>22,23</sup>. A IL-10 faz parte da imunidade Th2 relacionada à disseminação da doença no hospedeiro. *C. neoformans* não aumentou a produção de IL-10 em células A549. Esse resultado pode sugerir que *C. neoformans* não modula o mecanismo anti-inflamatório da IL-10 em células A549 em favor da suscetibilidade à infecção criptocócica.

O TGF- $\beta$ 1 é uma citocina multifuncional que desempenha papel central na patogênese de diversas doenças crônicas na regulação de respostas inflamatórias<sup>24,25</sup>. *C. neoformans* aumentou a produção de TGF- $\beta$ 1 em células

A549. O aumento de TGF- $\beta$ 1 pode contribuir para a persistência da infecção criptocócica durante as fases crônicas da infecção, conforme visto em Shao et al. (2005)<sup>26</sup>.

O NF- $\kappa$ B atua na inflamação e na resposta do hospedeiro a várias infecções<sup>26,27</sup>. Pereira et al. (2021)<sup>9</sup> observaram que a atividade de NF- $\kappa$ B em células epiteliais brônquicas (células BEAS-2B) poderia ser desnecessária para o desenvolvimento de inflamação das vias aéreas em resposta a *C. neoformans*. Este trabalho está de acordo com McDermot et al. (2018)<sup>28</sup>, que demonstraram, no modelo camundongo de criptococose, que a sinalização de NF- $\kappa$ B em células epiteliais pulmonares é totalmente dispensável para a inflamação das vias aéreas em resposta a *C. neoformans*. Em nosso estudo, *C. neoformans* aumentou a ativação de fosfo-NF- $\kappa$ B em células A549 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 um aumento de IL-6, que pode ser produzida pelo NF- $\kappa$ B<sup>28,29</sup>.

Uma outra importante via de sinalização para a inflamação é a quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK), que participa de importantes processos regulatórios como adesão celular, progressão do ciclo celular e migração celular<sup>30</sup>. Estudos demonstraram que a cápsula GXM de *C. neoformans* tem a capacidade de diminuir a ativação de ERK1/2 em camundongos CD45+ tipo selvagem<sup>4,10</sup>. Pereira et al. (2021)<sup>9</sup> observaram que a atividade de ERK1/2 em células epiteliais brônquicas (células BEAS-2B) pode ser desnecessária para o desenvolvimento de inflamação das vias aéreas em resposta a *C. neoformans*. Observamos um aumento da fosforilação de ERK1/2 por *C. neoformans* em células A549. As diferenças entre nossos resultados e os demais podem estar relacionadas aos tipos de células utilizadas nos experimentos e modelos *in vitro* e *in vivo*, bem como ao uso de polissacarídeo fúngico em vez de células fúngicas vivas. O aumento de ERK1/2 poderia estar associado ao processo inflamatório em favor do controle da infecção por *C. neoformans* nas vias aéreas.

A capacidade das células criptocócicas de aderir à superfície pulmonar do hospedeiro é importante para o estabelecimento da doença<sup>3,4</sup>. Vários artigos foram publicados tentando investigar os mecanismos de adesão e internalização do fungo a *C. neoformans* em células epiteliais do trato respiratório<sup>5,31-34</sup>. Observamos tanto internalização como adesão de *C. neoformans* em células A549, o que poderia favorecer as lesões primárias nas vias aéreas<sup>35,36</sup>.

## CONCLUSÃO

O epitélio pulmonar é um componente da resposta imune inata e demonstra um papel multifuncional além de uma barreira física protetora entre o ambiente externo e os tecidos através da liberação de uma série de mediadores, como citocinas e quimiocinas, que podem orquestrar e influenciar as respostas imunes inatas e adaptativas na modulação da inflamação das vias aéreas. Dessa forma, nossos resultados

demonstraram que *C. neoformans* é capaz de ativar e interagir com células epiteliais basais alveolares do adenocarcinoma humano, modulando a resposta imune inata das vias aéreas a seu favor para promover o desenvolvimento de infecções criptocócicas.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

As contribuições dos autores estão estruturadas de acordo com a taxonomia (CRediT) descrita abaixo:

*Conceitualização, Investigação, Metodologia, Visualização & Redação - revisão e edição:* KCCF. *Concebeu e projetou a análise; coletou os dados, realizou a análise, escreveu o artigo:* Realizou a análise e escrita: WMS. *Realizou a análise e escrita:* ABMP. *Realizou a análise e escrita:* ALEA-S. *Redação e aquisição de recursos e financiamento:* PRS. *Supervisão, redação e aquisição de recursos e financiamento:* MLSV. *Administração do projeto, supervisão, redação e aquisição de recursos e financiamento:* APR. *Todos os autores discutiram, leram e aprovaram a versão final do capítulo.*

## COPYRIGHT

Copyright© 2021 Freitas et al. Este é um artigo em acesso aberto distribuído nos termos da Licença *Creative Commons* Atribuição 4.0 Licença Internacional que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.

## REFERÊNCIAS

1. Kwon-Chung KJ, 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 Casadevall A, editors. *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. Washington, DC: ASM Press; 2011. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70140-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70140-2)
2. Danesi P, Falcaro C, Schmettmann LJ, Miranda LHM, Krockenberger M, Malik R. *Cryptococcus* in Wildlife and Free-Living Mammals. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(1):29. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7010029>
3. Taylor-Smith, LM. 2017 *Cryptococcus*-epithelial adhesions. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(4):53. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof3040053>
4. Merkel GJ, Scofield BA. The in vitro interaction of *Cryptococcus neoformans* with human lung epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997;19(3):203-13. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1997.tb01089.x>
5. Barbosa FM, Fonseca FL, Holandino C, Alviano CS, Nimrichter L, Rodrigues ML. Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes Infect*. 2006;8(2):493-502. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.07.027>
6. Denham ST, Brown JCS. Mechanisms of Pulmonary Escape and Dissemination by *Cryptococcus neoformans*. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(1):25. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof4010025>
7. Strickland AB, Shi M. Mechanisms of fungal dissemination. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Abr;78(7):3219-38. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03736-z>
8. Kawakami K. Regulation by innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Infect Dis*. 2004;57(4):137-45.
9. Pereira ABM, Oliveira JR, Souza ALJ, Andrade-Silva L, Silva MV, Silva PR, et al. Effects of cigarette smoke extract on bronchial epithelial cells stimulated with *Cryptococcus neoformans*. *Med Microbiol Immunol*. 2021 Ago;210(4):221-33. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00430-021-00715-4>
10. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res*. 1998 Set;243(2):359-66. DOI: <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4172>
11. Merkel GJ, Scofield BA. 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*. 2000;29(4):329-32. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01541.x>
12. Panigrahy D, Gilligan MM, Serhan CN, Kashfi K. Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. *Pharmacol Ther*. 2021 Nov;227:107879. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107879>
13. Oliveira JR, Favarin DC, Tanaka SC, Balarin MA, Teixeira DN, Levy BD, et al. AT-RvD1 modulates CCL-2 and CXCL-8 production and NF-κB, STAT-6, SOCS1, and SOCS3 expression on bronchial epithelial cells stimulated with IL-4. *Biomed Res Int*. 2015;2015:178369. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/178369>
14. Bingisser RM, Holt PG. Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. *Swiss Med Wkly*. 2001 Abr;131(13-14):171-9.
15. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973 Nov;51(5):1417-23. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>
16. Nardone LL, Andrews SB. Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte. Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors. *Biochim Biophys Acta*. 1979 Mai;573(2):276-95. DOI: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(79\)90061-4](https://doi.org/10.1016/0005-2760(79)90061-4)
17. Jevnikar Z, Östling J, Ax E, Calvén J, Thörn K, Israelsson E, et al. Epithelial IL-6 trans-signaling defines a new asthma phenotype with increased airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Fev;143(2):577-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.05.026>
18. Li X, Liu G, Ma J, Zhou L, Zhang Q, Gao L. Lack of IL-6 increases blood-brain barrier permeability in fungal meningitis. *J Biosci*. 2015;40(1):7-12. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-014-9496-y>
19. Midiri A, Mancuso G, Lentini G, Famà A, Galbo R, Zummo S, et al. Characterization of an immunogenic cellulase secreted by *Cryptococcus* pathogens. *Med Mycol*. 2020 Nov;58(8):1138. DOI: <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa012>

20. 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.* 1994 Nov;56(5):559-64. DOI: <https://doi.org/10.1002/jlb.56.5.559>
21. Bernhard S, Hug S, Stratmann AEP, Erber M, Vidoni L, Knapp CL, Thomaß BD, Fauler M, Nilsson B, Nilsson Ekdahl K, Föhr K, Braun CK, Wohlgemuth L, Huber-Lang M, Messerer DAC. Interleukin 8 Elicits Rapid Physiological Changes in Neutrophils That Are Altered by Inflammatory Conditions. *J Innate Immun.* 2021;13(4):225-241. doi: 10.1159/000514885.
22. Guillot L, Carroll SF, Badawy M, Qureshi ST. *Cryptococcus neoformans* induces IL-8 secretion and CXCL1 expression by human bronchial epithelial cells. *Respir Res.* 2008 Jan;9(1):9. DOI: <https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-9>
23. Manabu H, Hiroo W, Tetsuo Y, Shinichiro M, Kojiro H, Masuo N, et al. IL-10 resolves the neutrophilic inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Eur Res J.* 2021;38(Suppl 55):419. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058258>
24. Teitz-Tennenbaum S, Viglianti SP, Roussey JA, Levitz SM, Olszewski MA, Osterholzer JJ. Autocrine IL-10 signaling promotes dendritic cell type-2 activation and persistence of murine cryptococcal lung infection. *J Immunol.* 2018;201(7):2004-15. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800070>
25. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:137-61. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.137>
26. Hayden MS, Ghosh S. NF-κB in immunobiology. *Cell Res.* 2011 Feb;21(2):223-44. DOI: <https://doi.org/10.1038/cr.2011.13>
27. Shao X, Rivera J, Niang R, Casadevall A, Goldman DL. A Dual Role for TGF-β1 in the Control and Persistence of Fungal Pneumonia. *J Immunol.* 2005;175(10):6757-63. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6757>
28. McDermott AJ, Tumeay TA, Huang M, Hull CM, Klein BS. Inhaled *Cryptococcus neoformans* elicits allergic airway inflammation independent of Nuclear Factor Kappa B signalling in lung epithelial cells. *Immunol.* 2018;153(4):513-22. DOI: <https://doi.org/10.1111/imm.12853>
29. Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem.* 2006 Sep;281(36):26041-50. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M602222200>
30. Son YH, Jeong YT, Lee KA, Choi KH, Kim SM, Rhim BY, et al. Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008;51(1):71-7. DOI: <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31815bd23d>
31. Mercer BA, D'Armiento JM. Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2006;1(2):137-50. DOI: <https://doi.org/10.2147/copd.2006.1.2.137>
32. Pericolini E, Gabrielli E, Bistoni G, Cenci E, Perito S, Chow SK, et al. Role of CD45 signaling pathway in galactoxylomannan-induced T cell damage. *PLoS One.* 2010 Sep;5(9):e12720. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012720>
33. Merkel GJ, Cunningham RK. The interaction of *Cryptococcus neoformans* with primary rat lung cell cultures. *J Med Vet Mycol.* 1992;30(2):115-21. DOI: <https://doi.org/10.1080/02681219280000161>
34. Choo KK, Chong PP, Ho AS, Yong PV. The role of host microfilaments and microtubules during opsonin-independent interactions of *Cryptococcus neoformans* with mammalian lung cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015 Dec;34(12):2421-7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2497-4>
35. Casadevall A, Cleare W, Feldmesser M, Glatman-Freedman A, Goldman DL, Kozel TR, et al. Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jun;42(6):1437-46. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.42.6.1437>
36. Taylor-Smith LM, May RC. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. *Curr Opin Microbiol.* 2016 Dec;34:67-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.018>

