



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Jéssica Cristina Bilizário Nogueiro Andrade

**ANÁLISE DO PERFIL DE CÉLULAS CD4⁺ E AVALIAÇÃO
GENOTÓXICA EM CÉLULAS MONONUCLEARES
HUMANAS INFECTADAS *IN VITRO* COM DIFERENTES
ESPÉCIES DE FUNGOS DO GÊNERO *Cryptococcus spp***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Ramos Rodrigues

**Botucatu
2017**

Jéssica Cristina Bilizario NogueroL Andrade

ANÁLISE DO PERFIL DE CÉLULAS CD4⁺ E
AVALIAÇÃO GENOTÓXICA EM CÉLULAS
MONONUCLEARES HUMANAS INFECTADAS *IN*
VITRO COM DIFERENTES ESPÉCIES DE FUNGOS
DO GÊNERO *Cryptococcus spp*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Ramos Rodrigues

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Andrade, Jéssica Cristina Bilizario Noguerol.

Análise do perfil de células CD4+ e avaliação genotóxica em células mononucleares humanas infectadas *in vitro* com diferentes espécies de fungos do gênero *Cryptococcus spp* / Jéssica Cristina Bilizario Noguerol Andrade. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
Coorientador: Daniela Ramos Rodrigues
Capes: 21100004

1. Criptococose. 2. *Cryptococcus neoformans*. 3. Técnicas *in vitro*. 4. Toxicologia genética. 5. Resposta imune. 6. Expressão gênica.

Palavras-chave: Criptococose; *Cryptococcus gatti*; *Cryptococcus neoformans*; Genotóxicidade; Resposta imune.

**Estudo realizado no laboratório do Departamento de Doenças
Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina
de Botucatu – UNESP.**

É sofrido e gratificante ao mesmo tempo. No final das contas, percebi que quanto mais eu estudo mais nítida é minha compreensão do pouco que sei, do muito que aprendi e do quanto mais tenho para estudar.



Epígrafe



*Quando a mente abre uma nova janela,
jamais volta ao seu tamanho original.*

Albert Einstein



Dedicatória



*Dedico às grandes mulheres da minha vida que me ensinaram a nunca
desistir e buscar os meus sonhos:*

*À minha vó Sella (Célia) e minha mãe Cristina, pessoas queridas que me
mostraram que se eu quiser, eu tenho que correr atrás, e por mais difícil
que seja, um dia chegaremos lá com uma carga de sabedoria.*



Agradecimentos

A gratidão é a memória do coração. Dizer obrigado às vezes não é suficiente para agradecer tão amável e gentil pessoa, que em momentos das nossas vidas, aqueles mais difíceis, nos estende a mão amiga e nos oferece amparo.

Meus sinceros agradecimentos...

A Deus, obrigada por iluminar o meu caminho. Minha vida tem sido marcada por realizações diárias, que às vezes não dou o devido valor, mas eu sei que a Sua graça se faz presente em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe, agradeço por ter você, por ser minha mãe, pai, amiga, companheira. Você me ensinou sobre respeito, educação e, acima de tudo, sobre o amor, compreensão e honestidade. Estou aqui hoje graças à senhora. Obrigada por me apoiar e acreditar nos meus sonhos.

À minha vó, minha guerreira, um exemplo de mulher que sempre trabalhou e correu atrás dos seus sonhos e objetivos. Com a Senhora eu aprendi a nunca desistir. Obrigada por estar sempre comigo, por acreditar em mim e me apoiar.

À minha irmã Beatriz, obrigada por estar comigo e acreditar na minha capacidade.

Obrigada, tia Carol e meu afilhado, por me apoiarem, pelas conversas e risadas. Obrigada por acreditarem que sou capaz de chegar aonde eu quero.

Obrigada, tia Valeria, por rezar por mim sempre nos momentos difíceis.

Ao meu namorado e companheiro Gabriel, por estar ao meu lado em todos os momentos, por ter paciência, compreensão, por me escutar, me apoiar e incentivar sempre. Obrigada por caminhar comigo.

A Carol Molini, minha amiga, companheira e irmã de coração, obrigada por sempre acreditar em mim.



À Profª Drª Sueli, quem me abriu as portas para a Pós-Graduação, você acreditou na menina que chegou toda perdida e ansiosa. Eu agradeço por ter me doado seu tempo, sua sabedoria, confiança, paciência em me orientar, me escutar, pelos momentos ao seu lado e por ter te conhecido. Você é um exemplo que sempre vou ter dentro de mim.

Aqueles que partiram continuam fazendo parte da vida dos que ficaram através da saudade. Dessa forma, quem morre nunca desaparece por completo, sendo essa a melhor homenagem daqueles que ficam para os que partem, lembrando e falando com carinho de quem se foi, recordando os bons momentos e por toda a vida carregando a sua imagem sempre no coração.

Obrigada, minha eterna orientadora.

À minha orientadora Profª Drª Ângela, dizer obrigada para a senhora não será suficiente. Em um momento complicado para nós, a senhora me acolheu de braços abertos, não mediu esforços para me ajudar. Eu aprendi muito e cresci, agradeço de todo coração por me orientar e me acalmar em todos os momentos. Obrigada por ter aumentado minha confiança e minha dedicação com meus princípios. Obrigada por ter me doado o seu tempo, sua dedicação e paciência. Para a senhora toda minha gratidão e carinho.

À minha coorientadora Drª Daniela Ramos Rodrigues, posso dizer que nesta jornada você foi além de coorientadora, se tornou uma amiga. Sofremos juntas e

isso se tornou um laço. Obrigada por me orientar, por ter aguentado minha ansiedade, por me escutar e por caminhar junto comigo na minha jornada.

À Mariana Gatto (Cat linda), não tenho como agradecer tudo o que você fez por mim. Obrigada por me orientar, me aguentar e escutar, por chorar comigo e pelas muitas risadas também, enfim, obrigada por todos os momentos. Você é um exemplo, obrigada por fazer parte desta caminhada e da minha vida.

À Mariana Miziara (Mizi), com quem eu aprendi muitas coisas, não só no laboratório mas na vida. Me ensinou a ter um olhar diferente e também me mostrou que “não sou obrigada” (risos). Você me orientou, se dedicou, foi amiga, companheira e afilhada (casamento). Sou grata por você fazer parte da minha vida.

Ao Leonardo Teodoro (Leozinho), obrigada por ser esse exemplo de bondade e alegria, sou grata por ter sua amizade.

Ao Sebastião, meu amigo, obrigada por estar comigo sempre me dando apoio em todos os momentos e me lembrando que “tudo vai dar certo”.

À Minha companheira de aprimoramento e pós-graduação Livia (Diva), obrigada pela caminhada, companheirismo, pelas risadas e choros, por todos os momentos.

Aos meus companheiros de laboratório, Beatriz, Camila, Drica, Fran, Karen, Lariza, Patrícia, Vanessa, Rodrigo, Thaty, Thaysa e Régis. Obrigada pelo apoio, pelos cafés, risadas e companheirismo.

Aos meus professores da faculdade, principalmente ao Prof. Dr. Luciano Gatti, pelo aprendizado, orientação, apoio e incentivo que me deu para continuar sempre à procura de novos conhecimentos.

A todos que contribuíram com esse trabalho, seja de forma direta ou indireta;

Aos amigos do “Encontro da Pós-Graduação em Doenças Tropicais” pela companhia, conversas e trocas de experiências.

Ao Prof. Dr. Ramon Kaneno, do Departamento de Microbiologia Imunologia do IBB, por disponibilizar o citômetro de fluxo e por toda a assistência.

À Carú, por ter toda a paciência e carinho comigo durante as análises.

Aos funcionários da Unipex, principalmente a Vick e ao Igor, pela paciência em me ensinar e disponibilizar o tempo de vocês.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, do Departamento de Morfologia do IBB, por disponibilizar o microscópio de imunofluorescência e ao Brunno Caetano, que teve paciência em me ensinar a ler as lâminas do teste do cometa.

À banca do Exame Geral de Qualificação, Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira e Dr. Rodrigo Mattos dos Santos, pela cooperação e disposição em analisar este trabalho. Obrigada pelas valiosas observações.

À banca da defesa, Profa. Dra. Camila Renata Correia Camacho e Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino. Agradeço a disponibilidade e atenção.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e à Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB.

Ao Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem e seus respectivos chefes, coordenadores e funcionários.

À Seção da Pós-Graduação da FMB, em especial a Janete e a Bruna.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

Aos doadores de sangue, que voluntariamente e sem nenhum tipo de bonificação aceitaram de bom grado participar deste estudo.

Agradeço todas as dificuldades que passei no mestrado. Elas foram grandes adversárias, mas que tornaram minha vitória muito mais gratificante.



Resumo

A Criptococose é uma micose sistêmica, cuja incidência tem aumentado nas últimas décadas. É causada pelos fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* que se apresentam sob a forma de levedura capsulada. Uma importante característica da infecção com as duas espécies do fungo é que enquanto o *C. neoformans* está associado à doença em pacientes imunossuprimidos, o *C. gattii* é capaz de induzir a micose em indivíduos imunocompetentes. O entendimento dos mecanismos envolvidos nestas diferenças tem sido um desafio para os pesquisadores da área. No que se refere à resposta imune do hospedeiro contra o *Cryptococcus*, está bem estabelecido que a resistência/suscetibilidade a infecção envolve a participação de diferentes subpopulações de células CD4. No entanto, os estudos sobre o papel das subpopulações TH17 e Treg são escassos. Além disso, são raros os trabalhos que de uma forma sistemática objetivaram comparar o perfil de células CD4 induzido por uma ou outra espécie do fungo. Diferenças nesse perfil poderiam explicar a indução da doença em diferentes populações. Assim, um primeiro objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de células CD4 efectoras induzido pelo *C. neoformans* e *C. gattii*. A abordagem experimental foi a incubação de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) in vitro com leveduras vivas de *C. neoformans* e *C. gattii*, seguida da avaliação da expressão intracitoplasmática das citocinas IFN- γ (TH1), IL-4 (TH2), IL-17 (TH17) e o fator de transcrição Foxp3 (células Tregs), por citometria de fluxo, bem como a expressão de mRNA para Foxp3 e ROR γ t (fator de transcrição para TH17). A análise global dos resultados mostrou que o *C. neoformans* não é capaz de induzir a diferenciação de TH1 e TH2, mas sim de células Treg e TH17. Por outro lado, o *C. gattii* induz apenas a diferenciação de células Treg. Outro aspecto da relação hospedeiro/ *Cryptococcus* que merece ser avaliado, refere-se ao achado de que vários microrganismos podem causar genotoxicidade em células do hospedeiro como uma forma de evasão dos mecanismos de defesa. Assim, um segundo objetivo do presente estudo foi avaliar se as diferentes espécies do *Cryptococcus* são capazes de induzir danos no DNA de PBMCs e se este processo está relacionado aos níveis de óxido nítrico (NO) produzidos por essas células. Detectamos que ambas as espécies são igualmente capazes de induzir genotoxicidade em PBMCs. No entanto, uma associação entre danos no DNA e altos níveis de NO foi detectada apenas em relação a *C. gattii*. Os resultados apontam para a possibilidade de que os pacientes com criptococose sejam mais suscetíveis ao desenvolvimento de outras doenças.



Abstract

Cryptococcosis is a systemic mycosis, whose incidence has increased in the last decades. It is caused by the fungi *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* which present as capsulated yeasts. An important feature of infection with both fungus species is that while *C.neoformans* is associated with the disease in immunosuppressed patients, *C.gattii* is able to induce mycosis in immunocompetent individuals. To understanding the mechanisms involved in these differences has been a challenge for researchers. Regarding the host immune response against *Cryptococcus*, it is well established that resistance/ susceptibility to infection involves the participation of different subpopulations of CD4 cells. However, studies on the role of TH17 and Treg subpopulations are scarce. In addition, there are few studies that systematically aimed to compare the CD4 cell subpopulations profile induced by one or another species of the fungus. Differences in this profile could explain the induction of the disease in different populations. Thus, a first objective of the present study was to evaluate the effector CD4 cells subpopulations profile induced by *C.neoformans* and *C.gattii*. The experimental approach was the incubation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro with living yeasts of *C. neoformans* and *C.gattii*, followed by evaluation of the intracytoplasmic expression of the cytokines IFN- γ (TH1), IL-4 (TH2), IL-17(TH17) and Foxp3 transcription factor (Tregs cells) by flow cytometry, as well as mRNA expression for Foxp3 and ROR γ t (transcription factor for TH17). Overall, the analysis of the results showed that *C.neoformans* is not able to induce the differentiation of TH1 and TH2, but induces Treg and TH17 cells. On the other hand, *C.gattii* only induces Treg cells differentiation. Another aspect of the host / *Cryptococcus* interaction that deserves to be evaluated relates to the finding that various microorganisms may cause genotoxicity in host cells as a mechanism of evading defense mechanisms. Thus, a second objective of the present study was to evaluate if the different species of *Cryptococcus* are able to induce DNA damage of PBMCs and whether this process is related to the levels of nitric oxide (NO) produced by these cells. We have detected that both species are equally capable of inducing genotoxicity in PBMCs. However, an association between DNA damage and high NO levels was only detected in relation to *C. gattii*. The results point to the possibility that patients with cryptococcosis are more susceptible to the development of other diseases.



Lista de Abreviaturas

Ag - Antígeno

ARG-1 - Arginase-1

CIRs - Síndrome de resposta inflamatória crônica

CPGs – Sequências de DNA (Fosfoguanidina citosina)

BMDCs - Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea

CBA - Cytometric Beads Array

CTL - Linfócitos T citotóxicos

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DCs - Células Dendríticas

FBP-1 – Peptídeo Ligado a Fibronectina (fibronectin-binding peptide)

FOXP3 - Forkhead Box P3

GXM - Glicuronoxilomanana

iNOS - óxido nítrico sintase

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

MCCC - Meio completo para cultura de células

NLRs - Receptores de ligação a nucleotídeo

NO - Óxido Nítrico

NK- *Natural Killers*

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBMCs - Células Mononucleares Humanas do Sangue Periférico

PCR - Proteína C Reativa

PRRs - Receptores de Reconhecimento Padrão

RNA - Ácido Ribonucleico

RORYT - Related Orphan Receptor Gamma

ROS- Espécies reativas de oxigênio

TLRs - Receptores do tipo To



Sumário

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de abreviaturas

Revisão Bibliográfica.....25

Referências Bibliográficas.....35

Capítulo I (artigo enviado para publicação).....49

Capítulo II.(artigo a ser submetido).....63

Conclusões.....77

Anexos.....79

1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

2. Carta de aceite do Comitê de Ética



Revisão Bibliográfica

Cryptococose e resposta imune

O fungo do gênero *Cryptococcus spp.* foi descrito pela primeira vez na Itália em 1894, por Sanfelice.⁽¹⁾ A criptococose é uma micose sistêmica causada pelas espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.^(2,3,4) O *C. neoformans* compreende os sorotipos A, D, AD (molecularmente conhecidos como VNI, VNII, VNIII e VNIV) enquanto que o *C. gattii* corresponde aos sorotipos B e C (VGI, VGII, VGIII e VGIV).⁽⁵⁾

Esses fungos apresentam-se sob a forma de leveduras basidiomicéticas, globulosas ou ovuladas, de 3 a 8 µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo. O principal fator de virulência do gênero *Cryptococcus spp.* é a presença da cápsula polissacarídica contendo manose, xilose e ácido glucurônico, determinante dos sorotipos.⁽⁶⁾ A infecção criptococócica ocorre através da inalação de basidiósporos do fungo que alcançam os pulmões, atingem a corrente sanguínea, podendo assim afetar outros órgãos, particularmente o sistema nervoso central.⁽⁷⁾

O *C. neoformans* pode ser encontrado no solo, principalmente naqueles enriquecidos com fezes de aves, excretas secas, ricas em fontes de nitrogênio, como uréia e creatinina.⁽⁸⁾ Sua distribuição é cosmopolita, acometendo geralmente indivíduos imunocomprometidos em área urbana. O *C. gattii* se encontra na vegetação e madeiras apodrecidas de certas árvores. (*Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus mucrocarpa*, *Eucalyptus camadulensis* e *Eucalyptus tereticornis*).^(8,9) A sua presença é relatada apenas em clima tropical e subtropical, no entanto, áreas de clima temperado e frio devem ser incluídas em sua distribuição. Geralmente acomete indivíduos imunocompetentes em áreas rurais e urbanas e apresenta-se em forma de surtos.^(10,11)

O aumento dos casos de criptococose ocorreu após a pandemia da Aids, pois essa infecção ocorre como a primeira manifestação oportunista em cerca de 4% desses pacientes e é responsável por 50% dos óbitos neste grupo.^(4,12) No Brasil, a criptococose associada com a Aids predomina nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste.⁽⁴⁾ Outros grupos de risco incluem indivíduos submetidos ao uso prolongado de tratamento imunossupressor como os transplantados.⁽¹³⁾

O maior número de casos de criptococose ocorre na África, onde a mortalidade é estimada entre 50 e 70%. Nos EUA, a incidência anual de criptococose entre as pessoas com HIV/Aids é estimada entre 2 e 7 casos por 1.000 habitantes.⁽¹⁴⁾ A meningite

criptocócica é a infecção fúngica mais frequente do sistema nervoso central e a 3ª complicação neurológica em pacientes com Aids nos quais pode causar mortalidade de até 30%.⁽¹⁵⁾

A criptococose por *C. gatti* ocorre em vários países da América Latina incluindo o Brasil, Austrália, países de África Central, sudeste da Ásia, México e algumas regiões dos Estados Unidos. No Brasil, o *C. gattii* é endêmico nas regiões Norte e Nordeste e causa letalidade entre 35% a 40% dos casos detectados. A incidência anual é de entre 0,4 e 1,3 casos por 100.000 pessoas da população em geral.⁽¹⁴⁾

As manifestações clínicas gerais da criptococose podem ser inespecíficas. Geralmente, os pacientes relatam história crônica com duração de semanas ou meses, caracterizada por febre baixa, anorexia e perda de peso. As manifestações específicas são polimorfas e variam com os órgãos afetados. Manifestações cutâneas podem ocorrer em 10 a 15% dos casos.⁽¹⁶⁾

O desenvolvimento da criptococose ocorre em dois estágios: um primeiro, delimitado ao sistema respiratório e um segundo onde há disseminação sistêmica pela via hematogênica. A doença pulmonar sintomática pode assumir formas agudas, subagudas ou crônicas, sendo de difícil diagnóstico e confundida inúmeras vezes com outras doenças pulmonares. Os principais sintomas da forma pulmonar, quando presentes, incluem febre variável, dor no peito, tosse e produção de escarro mucóide e sanguinolento. Os achados radiológicos são variáveis com áreas bem circunscritas de pneumonite comum e as lesões podem ser uni ou bilaterais. Infiltrado difuso e doença miliar semelhante à tuberculose também são diagnosticados.^(16,17)

A infecção do cérebro e das meninges por *C. neoformans* é a forma clínica mais importante, sendo também a mais relacionada com mortes.⁽¹⁶⁾ A meningite criptocócica é a infecção fúngica mais frequente do sistema nervoso central e a 3ª complicação neurológica em pacientes com Aids nos quais pode causar mortalidade de até 30%. Mundialmente, o *C. neoformans* causa um número estimado de 1 milhão de casos de meningite criptocócica por ano entre pessoas com HIV/Aids, resultando em cerca de 625 mil óbitos.⁽¹⁸⁾ No paciente imunocompetente a infecção por *C. gattii* é clinicamente caracterizada por queixas pulmonares e pneumonia, com ou sem meningite, podendo também ocorrer manifestação nos músculos esqueléticos, com tendência a apresentar lesões com massa pulmonar e/ou cerebral, e hidrocefalia.⁽¹⁶⁾

A defesa imunológica do hospedeiro contra as micoses sistêmicas, incluindo a cryptococose é complexa e multifatorial, dependendo de uma série de mecanismos inatos e adaptativos ainda não totalmente esclarecidos.^(19,20)

A grande maioria dos estudos para o entendimento da relação hospedeiro/*Cryptococcus* foram realizados com o *C. neoformans* e mostraram que de forma similar aos outros fungos as primeiras barreiras contra esses microrganismos incluem as epiteliais (pele e mucosas) e fatores fungicidas solúveis contidos no soro e saliva.^(21,22)

Após ultrapassar as barreiras anatômicas e solúveis, as células fagocitárias passam a ser as barreiras mais importantes na defesa contra o fungo.⁽²³⁾ Assim, após inalação, o *Cryptococcus* encontra de início com os macrófagos alveolares e outras células fagocitárias como os neutrófilos e células dendríticas.^(24,25,26) O processo de fagocitose pode ser mediado por receptores para complemento assim como para a fração Fc de anticorpo.^(27,28) A cápsula do *Cryptococcus* consegue ativar o sistema complemento pela via alternativa⁽²⁹⁾ ou pela via clássica^(30,31) ou ainda pela via da lectina.⁽³²⁾ No entanto, a fagocitose do *Cryptococcus* pode ainda ocorrer por processos independentes de opsonização envolvendo o reconhecimento de PAMPS do fungo pelos PRRs que incluem os TLRs, os receptores do tipo lectinas (CLRs) e os do tipo NOD. Nesse sentido, os TLR2 e TLR4 reconhecem a glicuronoxilomanana (GXM) da cápsula do *Cryptococcus*.^(33,34,35) O TLR9 é um PRR endossomal que reconhece CPGs não metiladas dos patógenos. Alguns estudos têm mostrado que o DNA do *Cryptococcus* pode ser reconhecido pelo TLR9.^(36,37) A presença abundante de diferentes carboidratos na superfície do fungo permite que ele seja reconhecido pelos receptores do tipo lectina como o dectina-1 que reconhece β -glucanas.⁽³⁸⁾ As mananas do fungo podem ser reconhecidas pelos receptores dectin-2, receptor de manose (MR- CD206) e DC-SIGN.^(39,40)

Após a fagocitose, é extremamente importante que essas células consigam destruir os fungos evitando a disseminação desses microrganismos a partir do pulmão. Assim, após a fagocitose, haverá a formação do fagossomo que irá maturar, fundir-se com o lisossomo, formando o fagolisossomo um local propício para a destruição de microrganismos fagocitados.

No entanto, os *Cryptococcus ssp.* desenvolveram uma série de mecanismos de defesa e fatores de virulência que permitem que eles sobrevivam no interior do fagossoma ou mesmo evitem a sua fagocitose,^(41, 42,43,44,45,46) fazendo com que essa interação a favor

do fungo, seja determinante para o desenvolvimento da doença, comprovando o importante papel dos macrófagos nos mecanismos de defesa do hospedeiro infectado.

Um desses fatores que inibem a fagocitose do fungo envolve a GXM da cápsula que tem atividade anti-fagocítica devido a sua espessura, pode mascarar PAMPs que seriam reconhecidos pelos vários PRRs ou ainda evitar a ação de fatores microbicidas como os do metabolismo oxidativo e peptídeos antimicrobianos.⁽⁴⁷⁾ A opsonização com anticorpos anti-capsulares ou ainda com fatores do complemento é justamente necessária para evitar as propriedades anti-fagocíticas da cápsula.⁽⁴⁸⁾ Outros mecanismos de escape levam a proliferação dos fungos no interior dos fagócitos. Entre esses mecanismos está a sua capacidade de proliferação mesmo em condições ácidas do fagossoma, nas quais fica exposto a fatores microbicidas como os metabólitos do oxigênio e nitrogênio.^(49,50) Assim, o mecanismo de escape não está no fato de esse microrganismo alterar o pH ácido para alcalino, mas sim pela sua capacidade de inibir a ação dos metabólitos microbicidas. Realmente, estudos têm mostrado que características de membrana do fungo vinculadas aos canais de cálcio promovem a sobrevivência do fungo durante exposição ao stress oxidativo. Outros estudos têm mostrado que o *C. neoformans* é capaz de sobreviver mesmo em um fagossoma com ROS, em parte devido à absorção desses metabólitos pela cápsula.⁽⁴⁷⁾ Além disso, a sobrevivência no interior do macrófago pode ocorrer devido à ativação da via de stress nessas células incluindo a HIF-1alfa, proteína que interage com o receptor 1, o fator de indução de apoptose e despolarização da mitocôndria.⁽⁵¹⁾

De forma diferente dos primeiros estudos, outros mais recentes demonstraram que o *C. neoformans* induz a acidificação do fagossoma, influxo de cálcio e atividade de protease tornando o fagossoma permissivo à sua proliferação.⁽⁵²⁾ Outro mecanismo de escape envolve a capacidade do fungo de causar danos nos lisossomos dos macrófagos.⁽⁵³⁾

Esses mecanismos estão vinculados a proteínas do *Cryptococcus* consideradas como fatores de virulência. Por ex: a Fosfolipase B (PLB1) é uma enzima da superfície celular⁽⁵⁴⁾ importante para a proliferação e sobrevivência dos fungos dentro dos macrófagos e também pela disseminação ao sistema nervoso central.⁽⁵⁵⁾ Outra proteína, a Fbp1, é crítica para a sobrevivência e proliferação dentro de macrófagos e disseminação a partir dos pulmões, assim como para a resistência ao NO.⁽⁵⁶⁾

Um mecanismo de escape tem sido atribuído unicamente ao *C.gatti*. Essa espécie do fungo induz tubularização de suas mitocôndrias, facilitando o crescimento de células

vizinhas e consequentemente fazendo com que o macrófago se torne um nicho de armazenamento de fungos. ⁽⁵⁷⁾

Esses mecanismos de escape do *Cryptococcus* exige que o hospedeiro infectado desenvolva respostas imunes inata e adaptativa que culminem com um processo de ativação dessas células, transformando-os em macrófagos com fenótipo M1. Essas células medeiam a defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos microbianos por meio da geração de espécies de oxigênio e nitrogênio.⁽⁵⁸⁾ A enzima NO sintase (iNOS) que se constitui em um marcador desse tipo de macrófago, atua sobre o substrato L-arginina para produzir óxido nítrico (NO), que possui propriedades anti-criptocócicas.^(59, 60, 61, 62,63,64) Durante a resposta imune inata esse processo é garantido pela liberação de IFN- γ por células NK. No entanto, durante a resposta imune adaptativa é necessário o desenvolvimento de uma resposta imune mediada por TH1 caracterizada pela produção de IL-2, IL12, IL-18, IFN- γ e TNF- α ^(65,66,67, 68,69,70,71,72,6) que induzirá ativação macrofágica e portanto sendo considerada como a subpopulação de células CD4⁺ envolvida na resistência do hospedeiro ao fungo. Ao contrário, indução de resposta imune TH2 anti-inflamatória caracterizada pela liberação de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 está associada com a geração de macrófagos M2 e exacerbação da doença. ^(72,73, 74,75,76,77, 78,79)

As citocinas IL-4 e IL-13 estão diretamente envolvidas na indução de macrófagos M2. ^(80, 81,82) Ao contrário dos macrófagos M1 que possuem como marcador importante a enzima iNOS, os M2 tem como marcador a enzima arginase-1 (Arg-1) que compete com a iNOS pelo substrato produzindo L-ornitina e uréia ⁽⁸³⁾ em vez de NO, fazendo com que esses macrófagos não tenham capacidade de destruir o fungo.⁽⁶³⁾ Essas diferenças fazem com que a relação Arg-1/NO seja considerada como determinante no processo de polarização de macrófagos para M1 ou M2.^(84,82)

Apesar de os macrófagos M2 serem induzidos por uma resposta do tipo TH2, essas células já podem adquirir esse fenótipo em fases iniciais da infecção via os mecanismos de escape do fungo. Uma proteína denominada Ssa1 está envolvida na indução de macrófagos M2 por estimular uma produção precoce de IL-4 e IL-13, durante a resposta imune inata.⁽⁸⁵⁾ Outros estudos mostraram que a quitina que integra a parede do fungo estimula a produção de citocinas que levam as células linfóides da resposta inata a produzirem IL-5, IL-13 e IL-4.^(86,87)

Além das subpopulações TH1 e TH2, as TH17 caracterizadas pela produção de IL-17A, IL-21, IL-22, IL-6, e TGF- β ,^(88,89,90) podem participar dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o fungo.^(71,91) No entanto, outros estudos mostraram que a resposta mediada por IL-17 é importante para uma otimização da resposta contra a infecção pulmonar por *Cryptococcus* uma vez que a resposta TH1 é suficiente para conferir proteção. Assim, o papel da TH17 na infecção por *Cryptococcus* permanece ainda indefinido.⁽⁹²⁾

Além dessas subpopulações de T CD4⁺, as TCD4⁺ “naives” podem transformarem-se preferencialmente em células T reguladoras (Tregs), cuja diferenciação ocorre na presença de TGF- β e são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição FOXP3 e produção de IL-10 e TGF- β . As Tregs apresentam atividade supressora e desempenham um papel importante na modulação das respostas inflamatórias. Assim, podem ter um importante papel protetor, limitando as respostas inflamatórias excessivas e prejudiciais ao hospedeiro, mas ao mesmo tempo podem exercer um papel não protetor inibindo de forma desnecessária essas respostas.⁽⁹³⁾ Desse modo, é crucial que exista durante uma infecção um equilíbrio entre a indução das subpopulações de células TCD4⁺ efetoras e a atuação das células Tregs.^(94,95) No entanto, os estudos sobre o papel das Tregs na cryptococose são escassos.

Quando do estudo das diferentes subpopulações de linfócitos efetores /reguladores dentro de uma determinada relação hospedeiro /parasita deve-se lembrar que a indução preferencial de uma ou outra subpopulação depende essencialmente da natureza da interação desses microrganismos com células da resposta imune inata tais como as dendríticas (DCs) e monócitos/ macrófagos, as quais além de funcionarem como células efetoras dessa resposta tem um papel primordial na instrução da resposta imune adaptativa durante o processo de processamento e apresentação de antígenos para as células TCD4⁺ “naives”.

Embora os macrófagos sejam importantes células apresentadoras de antígenos, as DCs são especializadas nesta função. Assim, a relação DC/ *Cryptococcus* é extremamente importante no sentido de definir a resposta imune que se desenvolverá contra o fungo. Estudos iniciais *in vitro* mostraram que essas células são extremamente importantes para a ligação, fagocitose, destruição, processamento e apresentação de antígenos do fungo para as células T^(96,97,98,99) e que elas são necessárias para a indução de respostas protetoras contra o *C. neoformans*.^(96,79) Estudos têm mostrado que as DCs pulmonares

internalizam os *Cryptococcus* e são ativadas a maturarem expressando as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, as MHC de classe II e apresentam antígenos compostos por manoproteínas do fungo para células T que proliferam e se diferenciam em células TH1 específicas.^(100,98,101) Além dos marcadores de ativação as manoproteínas do fungo induzem essas células a secretarem IL-12 e TNF- α associados a uma resposta TH1.⁽¹⁰²⁾ Apesar desses trabalhos mostrando essa atividade das DCs os estudos têm deixado claro que esse processo é altamente influenciado pela cápsula do fungo que além de impedir a fagocitose pelas DCs na ausência de opsonização por anticorpo e complemento, interfere com a ativação e maturação dessas células ^(103,104,105) e a expressão gênica de várias citocinas e quimiocinas associadas a apresentação de Ag.⁽¹⁰⁴⁾

Apesar desse estudo mostrando o papel protetor das DCs na criptococose, outros mostraram que a cepa virulenta do *C.neoformans* leva a um aumento significativo na quantidade de DCs imaturas nos linfonodos associados ao pulmão ⁽¹⁰⁶⁾ e consequente indução de células TH2 em vez de TH1.⁽¹⁰⁷⁾

Estudos bastante interessantes mostraram que a interação de DCs com *C. gattii* difere de uma forma substancial da com *C. neoformans*. DCs derivadas de monócitos humanos destroem o *C.gattii*, mas esse processo não resulta em uma efetiva maturação dessas células, pois não há um aumento da expressão de moléculas MHC classe II, CD86, CD83, CD80, e CCR7, e não liberam TNF- α . ⁽¹⁰⁸⁾ Em camundongos infectados com *C. gatti*, as DCs expressam níveis muito mais baixos de MHC classe II, IL-12 ou IL-23 e consequentemente não induzem uma resposta efetora TH1 e TH17. Um processo contrário, no entanto, ocorre quando os camundongos são infectados com o *C. Neoformans*.⁽¹⁰⁹⁾ A não maturação das DCs em resposta ao *C.gatti* parece envolver a cápsula do microrganismo uma vez que a captação por essas células de um mutante acapsular leva a um aumento na expressão de moléculas co-estimuladoras induzidas e de citocinas inflamatórias.⁽¹¹⁰⁾ Camundongos imunizados por via intravenosa com BMDCs pulsadas com este mutante acapsular e desafiados com *C. gattii* R265 mostraram uma significativa redução da carga fúngica, e aumento de células produtoras de IL-17, IFN- γ e TNF- α em comparação aos não imunizados.⁽¹¹⁰⁾

De uma forma global os estudos citados acima mostram que a resposta imune ao *Cryptococcus* pode variar na dependência de cepas mais ou menos virulentas dentro da mesma espécie, mas principalmente em relação às duas espécies *C. neoformans* e *C.gattii*. Embora existam vários estudos comparativos em relação à resposta imune do hospedeiro

infectado com *C. neoformans* e *C. gattii*, ainda faltam estudos comparando de uma forma mais sistemática qual o perfil de células CD4⁺ induzidos por uma ou outra espécie em células humanas, particularmente em relação às células Tregs e TH17.

Genotoxicidade é a capacidade de um agente químico, físico ou biológico de causar alterações no DNA que podem ou não ser reparáveis. Quando estas alterações não são reparáveis e se fixam no material genético, o agente é considerado mutagênico. A indução de mutações gênicas ou cromossômicas pode levar a diferentes problemas de saúde como câncer, alterações reprodutivas e anomalias genéticas.⁽¹¹¹⁾ Um dos fatores que pode também estar associado a infecções são as mutações no DNA, que podem ser decorrentes de alterações na resposta imune, e responsáveis pelo aumento da susceptibilidade a transformações malignas. Estima-se que de 8 a 17% dos cânceres sejam causados por vírus, bactérias, protozoários. A carcinogênese associada à infecção é um processo complexo que muitas vezes é mediado por condições inflamatórias crônicas que se constituem em microambientes para o desenvolvimento de tumores.⁽¹¹²⁻¹¹⁵⁾

Ribeiro-Vieira⁽¹¹⁶⁾ realizaram um estudo em pacientes com paracoccidioidomicose e observaram que o fungo causador dessa micose não induz genotoxicidade. Entretanto, outros estudos realizados na leishmaniose ⁽¹¹⁷⁾ e na tuberculose ⁽¹¹²⁾ observaram que os pacientes apresentaram danos no DNA em células mononucleares do sangue periférico. Além disso, em infecção de camundongos com o *Trypanosoma cruzi* ⁽¹¹³⁾ e com *Leishmania chagasi* ⁽¹¹⁵⁾ também foi verificada a ocorrência de danos no DNA em órgãos e células desses animais. Vale ressaltar que nestas infecções os danos no DNA foram associados com processo inflamatório intenso ligado ao stress oxidativo. ^(118,117) Desta forma, temos que considerar que a resposta imune responsável pelo controle da maioria das infecções intracelulares é dependente da produção de NO e de algumas citocinas como IFN- γ e TNF- α , e quando esses mediadores inflamatórios são estimulados de forma excessiva podem causar danos celulares e induzir alterações no DNA. Embora estudos com inúmeras infecções mostrem a ocorrência de danos no DNA e associação destes danos com carcinogênese em algumas destas infecções, são ausentes estudos que verifiquem alterações genotóxicas em infecção com *C. neoformans* e *C. gatti*.

O estudo genotóxico pode ser realizado pelo Ensaio Cometa ou Eletroforese em gel, considerado como um método sensível que avalia danos ao DNA de células individuais e

possibilita a quantificação de quebras da fita. Possui custo relativamente baixo, rapidez, precisão e reprodutibilidade.⁽¹¹⁹⁾

Embora existam vários estudos comparando a resposta imune dos hospedeiros infectados com o *C. neoformans* e *C. gattii*, ainda faltam estudos comparando de uma forma mais sistemática qual o perfil de células CD4 + induzido por uma ou outra espécie em células humanas, particularmente em relação às células Tregs e TH17. Esse estudo pode contribuir de forma significativa para o entendimento dos mecanismos que levam o *C. neoformans* a cometer com mais frequência os indivíduos imunosuprimidos e o *C. gattii* os imunocompetentes. Também há ausência de estudos objetivando avaliar as possíveis alterações genotóxicas induzidas pelas duas espécies de *Cryptococcus*. Portanto, acreditamos que um estudo comparando o comportamento dessas duas espécies no contexto imunológico e genotóxico, permitirá um melhor entendimento da relação parasita /hospedeiro na micose contribuindo ao final para uma melhor compreensão da patogênese da doença.



Referências

Bibliográficas

- 1- Sanfelice F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomicetiche si sviluppano nei succhi di alcunifrutti. Ann d'Igiene. 1894; (4): 463-498.
- 2- Fernandes OF, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJ, Silva MR. *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2000; 33:(1) 75-78.
- 3- Filiú WF, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RC, Lazéra M. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35(6):591-5.
- 4- Moretti ML, Resendi MR, Lazara MS, Colombo AL, Shikanai-Yasuda MA. Guidelines in Cryptococcosis 2008. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2008; 41:524-44.
- 5- Kidd SE, Sorrell TC, Meyer W. Isolation of two molecular types of *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* from insect frass. Med Mycol 2003; 41(2): 171-176.
- 6- Olszewski MA, Zhang Y, Huffnagle GB. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. Future Microbiol 2010; 5(8):1269–1288.
- 7- Gullo FP, Rossi SA, Sardi Jde C, Teodoro VL, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32(11):1377-91.
- 8- Sorrell TC, Brownlee AG, Ruma P, Malik R, Pfeiffer TJ, Ellis DH. Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol. 1996; 34(5):1261-3.
- 9- Lazéra MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*--evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. Med Mycol 1998; Apr; 36(2):119-22.
- 10- Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J. Clin. Microbiol 1999; 37(3) 838-840.

- 11- Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 7: 101(49):17258-63.
- 12- Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(3):513-21.
- 13- Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2006; 20 (3):507-44, v-vi. Review.
- 14- Harris J, Lockhart S, Chiller T. *Cryptococcus gattii* where we go from here. *Med Mycol* 2012 ; 50 : 113 – 29.
- 15- Friedman GD, Jeffrey Fessel W, Udaltsova NV, Hurley LB. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses* 2005; 48(2):122-5.
- 16- Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical of Microbiology Review.* 1995; 8: 515-548.
- 17- Kavanaugh LA, Fraser JA, Dietrich FS. Recent evolution of the human pathogen *Cryptococcus neoformans* by intervarietal transfer of a 14-gene fragment. *Mol Biol* 2006; 23(10):1879-90.
- 18- Brandão AFM, Lima AS, Rodrigues ABN, Lobato FJ, Santos I, Coelho MS, Sousa RCS. Meningoencefalite criptocócica: estudo clínico- epidemiológico de 59 pacientes. 2004; Net Disponível<<http://www.maymone.com.br/espaco>>. Acesso em: 2004.
- 19- Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11 :275-88.
- 20- Rohatgi S, Pirofski LA. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol.* 2015. 10 (4):565-81.
- 21- Baum GL, Artis D. Growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by cell free human serum. *Am J Med Sci* 1961; 241:613–616.

- 22- Igel HJ, Bolande RP. Humoral defense mechanisms in cryptococcosis: substances in normal human serum, saliva, and cerebrospinal fluid affecting the growth of *Cryptococcus neoformans*. J Infect Dis 1966; 116:75–83.
- 23- Leopold Wager CM¹, Hole CR¹, Wozniak KL¹, Wormley FL Jr¹. Cryptococcus and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. Front Microbiol. 2016; Feb 9;7:105.
- 24- Mansour MK, Levitz SM. Interactions of fungi with phagocytes. Curr Opin Microbiol 2002; 5(4): 359–365.
- 25- Del Poeta M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell 2004; 3(5):1067–1075.
- 26- Shao X, Mednick A, Alvarez M, Van Rooijen N, Casadevall A, Goldman DL. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. J Immunol 2005; 175(5):3244–3251.
- 27- Griffin FM Jr. Roles of macrophage Fc and C3b receptors in phagocytosis of immunologically coated *Cryptococcus neoformans*. Proc Natl Acad Sci USAn 1981; 78(6):3853–3857.
- 28- Levitz SM, Tabuni A. Binding of *Cryptococcus neoformans* by human cultured macrophages. Requirements for multiple complement receptors and actin. J Clin Invest 1991; 87(2):528–535.
- 29- Diamond RD, May JE, Kane MA, Frank MM, Bennett JE. The role of the classical and alternate complement pathways in host defenses against *Cryptococcus neoformans* infection. J Immunol 1974; 112(6):2260–2270.
- 30- Gates MA, Kozel TR. Differential localization of complement component 3 within the capsular matrix of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 2006; 74(6):3096–3106.
- 31- Pirofski LA. Of mice and men, revisited: new insights into an ancient molecule from studies of complement activation by *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 2006; 74(6):3079–3084.
- 32- Van Asbeck EC, Hoepelman AI, Scharringa J, Herpers BL, Verhoef J. Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced

complement activation and enhanced uptake of polymorpho nuclear cells. BMC Microbiol 2008; 8:229.

33-Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, and Levitz SM. Tolllike receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in responseto *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. J Immunol 2001; 166, 4620–4626.

34- Yauch LE, Mansour MK, Shoham S, Rottman JB, and Levitz SM. (2004). Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. Infect Immunol 2004; 72, 5373–5382.

35- Yauch LE, Mansour MK, and Levitz SM. Receptor-mediated clearance of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide in vivo. Infect. Immunol 2005; 73,8429–8432.

36- Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, et al. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via aTLR9-dependent path way.J.Immunol 2008; 180:4067–4074.

37- Kasperkovitz PV, Khan NS, Tam JM, Mansour MK, Davids PJ, and Vyas JM. Toll-like receptor 9 modulates macrophage antifungal effector function during innate recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Infect Immun 2011; 79,4858–4867.

38- Giles SS, Dagenais TR, Botts MR, Keller NP, and Hull CM. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 2009; 77: 3491–3500.

39- Mansour MK, Latz E, and Levitz SM. *Cryptococcus neoformans* glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells. J Immunol 2006; 176: 3053–3061.

40- Nakamura Y, Sato K, Yamamoto H, Matsumura K, Matsumoto I, Nomura T, et al. Dectin-2 deficiency promotes Th2 response and mucinproduction in the lungs after pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2015; 83:671–681.

41- Tucker SC, and Casadevall A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of

vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2002; 99: 3165–3170.

42- Voelz K, Lammas DA, and May RC. Cytokine signal in gregulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009; 77:3450–3457.

43- Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9: 193–203.

44- Johnston SA, and May RC. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cell Microbiol*. 2013; 15:403–411.

45- Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect. Med*. 2014; 4:019760.

46- Alspaugh JA. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genet Biol*. 2015; 78:55–58.

47- Zaragoza O, Chrisman CJ, Castelli MV, Frases S, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL, et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol*. 2008; 10:2043–2057.

48- Kozel TR. Opsonization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Arch Med Res*. 1993; 24:211–218.

49- Diamond RD, and Bennett J. Growth of *Cryptococcus neoformans* with in human macrophages in vitro. *Infect Immun*. 1973; 7:231–236.

50-Levitz SM, Nong SH, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, and Simons ER. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun*. 1999; 67:885–890.

51- Coelho C, Souza AC, Derengowski L da S, de Leon-Rodriguez C, Wang B, Leon-Rivera R, et al. Macrophage mitochondrial and stress response to ingestion of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*. 2015; 194:2345–2357.

- 52- Smith LM, Dixon EF, and May RC. The fungus pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. *Cell Microbiol.* 2015; 17:702–713.
- 53- Davis MJ, Eastman AJ, Qiu Y, Gregorka B, Kozel TR, Osterholzer JJ, et al. *Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. *J Immunol* 2015; 194:2219–2231.
- 54- Djordjevic JT, Del Poeta M, Sorrell TC, Turner KM, and Wright LC. Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. *Biochem J* 2005; 389:803–812.
- 55- Evans RJ, Li Z, Hughes WS, Djordjevic JT, Nielsen K, and May RC. Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation and control of titan cell morphology during macrophage infection. *Infect Immun* 2015; 83:1296–1304.
- 56- Liu TB, and Xue C. Fbp1-mediated ubiquitin-proteasome pathway controls *Cryptococcus neoformans* virulence by regulating fungal intracellular growth in macrophages. *Infect. Immun* 2014; 82:557–568.
- 57- Voelz K, Johnston SA, Smith LM, Hall RA, Idnurm A, and May RC. ‘Division of labour’ in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nat Commun* 2014; 5:5194.
- 58- Ding AH, Nathan CF, and Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141:2407–2412.
- 59- Alspaugh JA, and Granger DL. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. *Infect Immunol* 1991; 59:2291–2296.
- 60- Arora S, Olszewski MA, Tsang TM, McDonald RA, Toews GB, and Huffnagle GB. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2011; 79:1915–1926.
- 61- Hardison SE, Herrera G, Young ML, Hole CR, Wozniak KL, et al. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. *J. Immunol* 2012; 189:4060–4068.

- 62- Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. MBio 2013; 4:00264–00213.
- 63- Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Olszewski MA, and Wormley FL Jr. STAT1 signaling is essential for protection against *Cryptococcus neoformans* infection in mice. J Immunol 2014; 193:4060–4071.
- 64- Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Olszewski MA, Mueller M, and Wormley FL Jr. STAT1 signaling with in macrophagesis required for anti-fungal activity against *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 2015; 83:4513–4527.
- 65- Huffnagle GB, Yates JL, and Lipscomb MF. Immunity to a Pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both Cd4+ and Cd8+ T-Cells. J Exp Med 1991; 173:793–800.
- 66- Aguirre K, Havell EA, Gibson GW, Johnson LL. Role of tumor necrosis factor and gamma interferon in acquired resistance to *Cryptococcus neoformans* in the central nervous system of mice. Infect Immun 1995; 63:1725–1731.
- 67- Huffnagle GB. Role of cytokines in T cell immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. Biol. Signals 1996; 5:215–222.
- 68- Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, and Saito A. IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. Clin Exp Immunol 1996; 104:208–214.
- 69- Kawakami K, Qureshi MH, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, and Saito A. IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN-gamma production. J Immunol 1997; 159:5528–5534.
- 70- Zhang T, Kawakami K, Qureshi MH, Okamura H, Kurimoto M, and Saito A. Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells. Infect. Immunol 1997; 65: 3594–3599.
- 71- Zhang, Y, Wang, F, Tompkins KC, McNamara A, Jain AV, Moore B B, et al. (2009). Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent

systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. Am J Pathol 2009; 175:2489–2500.

72- Huffnagle GB, and Lipscomb MF. Cells and cytokines in pulmonary cryptococcosis. Res. Immunol 1998; 149:387–396; 512–384.

73- Arora S, Hernandez Y, Erb-Downward JR, McDonald RA, Toews GB, and Huffnagle GB. Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic broncho pulmonary mycosis. J Immunol 2005; 174, 6346–6356.

74- Arora, S., Olszewski, M. A., Tsang, T. M., McDonald, R. A., Toews, G. B., and Huffnagle, G.B. Effect of cytokine in terplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2011. 79, 1915–1926.

75- Milam JE, Herring-Palmer AC, Pandrangi R, McDonald RA, Huffnagle GB, and Toews GB. Modulation of the pulmonary type 2 T-cell response to *Cryptococcus neoformans* by intratracheal delivery of a tumor necrosis factor alpha-express in gadenoviral vector. Infect Immunol 2007; 75:4951–4958.

76- Muller U, Stenzel W, Kohler G, Werner C, Polte T, Hansen G, et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. J Immunol 2007; 179:5367–5377.

77- Chen GH, McNamara DA, Hernandez Y, Huffnagle GB, Toews GB, and Olszewski MA. Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model. Infect Immun 2008; 76:2379–2391.

78- Jain AV, Zhang Y, Fields WB, McNamara DA, Choe MY, Chen GH, et al. Th2 but not Th1 immune bias results in altered lung functions in a murine model of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. Infect Immun 2009; 77:5389–5399.

79- Osterholzer JJ, Milam JE, Chen GH, Toews GB, Huffnagle GB, and Olszewski MA. Role of dendritic cells and alveolar macrophage in regulating early host defense

against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun 2009a; 77:3749–3758.

80- Mosser DM, and Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat. Rev. Immunol 2008; 8:958–969.

81- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, and Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. J Pathol 2013; 229:176–185.

82- Van Dyken SJ, and Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13 mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. Annu. Rev Immunol 2013; 31:317–343.

83- Bogdan C, Rollinghoff M, and Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Curr Opin Immunol 2000; 12:64–76.

84- Takeda K, Kamanaka M, Tanaka T, Kishimoto T, and Akira S. Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. J Immunol 1996; 157:3220–3222.

85- Eastman AJ, He X, Qiu Y, Davis MJ, Vedula P, Lyons DM, et al. Cryptococcal heat shock protein 70 homolog Ssa1 contributes to pulmonary expansion of *Cryptococcus neoformans* during the afferent phase of the immune response by promoting macrophage M2 polarization. J Immunol 2015; 194:5999–6010.

86- Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, et al. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. Nature 2007; 447:92–96.

87- Van Dyken SJ, Mohapatra A, Nussbaum JC, Molofsky AB, Thornton EE, Ziegler SF, et al. Chitin activates parallel immune modules that direct distinct inflammatory responses via innate lymphoid type 2 and gamma/delta T cells. Immunity 2014; 40:414–424.

88- Korn T, Oukka M, Kuchroo V, and Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. Semin Immunol 2007; 19:362–371.

89- Korn T, Bettelli E, Oukka M, and Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol 2009; 27:485–517.132710.

- 90- Onishi RM, and Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010; 129:311–321.
- 91- Murdock BJ, Teitz-Tennenbaum S, Chen GH, Dils AJ, Malachowski AN, Curtis JL, et al. Early or late IL-10 blockade enhances Th1 and th17 effector responses and promotes fungal clearance in mice with cryptococcal lung infection. *J.Immunol* 2014; 193:4107–4116.
- 92- Wozniak KL, Hardison SE, Kolls JK, Wormley FL. Role of IL-17A on resolution of pulmonary *C. neoformans* infection. *PLoS One*. 2011; 6(2):17204.
- 93- Rakebrandt N, Littringer K, Joller N.Regulatory T cells: balancing protection versus pathology. *Swiss Med Wkly*. 2016; 146:14343.
- 94- Romani L.Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol*. 2008;46(6):515-29.
- 95- Schulze B, Piehler D, Eschke M, Von Buttlar H, Kohler G, Sparwasser T, Alber G. CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells suppress fatal T helper 2 cell immunity during pulmonary fungal infection. *Eur J Immunol* 2014; 44(12):3596-604.
- 96- Bauman SK, Nichols KL, and Murphy JW. Dendritic cells in the induction of protective and nonprotective anticryptococcal cell-mediated immune responses. *J. Immunol* 2000; 165, 158–167.
- 97- Bauman SK, Huffnagle GB, and Murphy J W. Effects of tumor necrosis factor alpha on dendritic cell accumulation in lymph nodes draining the immunization site and the impact on the anti cryptococcal cell mediated immune response. *Infect Immun* 2003; 71:68–74.
- 98- Wozniak KL, Vyas JM, Levitz SM. In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. *Infect Immun* 2006; 74:3817–3824.
- 99- Wozniak KL, and Levitz SM. *Cryptococcus neoformans* enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. *Infect. Immun* 2008; 76:4764–4771.

- 100- Mansour MK, Schlesinger LS, and Levitz SM. Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans* mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. J Immunol 2002; 168:2872–2879.
- 101- Dan JM, Kelly RM, Lee CK, and Levitz, SM. Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. Infect Immun 2008; 76: 2362–2367.
- 102- Pietrella D, Corbucci C, Perito S, Bistoni G, and Vecchiarelli, A. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. Infect Immunol 2005; 73:820–827.
- 103- Vecchiarelli A, Pietrella D, Lupo P, Bistoni F, McFadden DC, and Casadevall A. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. J Leukoc Biol 2003; 74:370–378.
- 104- Lupo P, Chang YC, Kelsall BL, Farber JM, Pietrella D, Vecchiarelli A, et al. The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. Infect Immunol 2008; 76:1581–1589.
- 105- Grijpstra J, Tefsen B, Van Die I, and de Cock H. The *Cryptococcus neoformans* cap10 and cap59 mutants strains, affected in glucuronoxylomannan synthesis, differentially activate human dendritic cells. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 57:142–150.
- 106- Osterholzer JJ, Surana R, Milam JE, Montano GT, Chen GH, Sonstein J, et al. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. Am J Pathol 2009b; 174:932–943.
- 107- Wiesner DL, Specht CA, Lee CK, Smith KD, Mukaremera L, Lee ST, et al. Chitin recognition via chitotriosidase promotes pathologic type 2 helper T cell responses to cryptococcal infection. PLoS Pathog 2015; 11:e1004701.
- 108- Huston SM, Li SS, Stack D, Timm-McCann M, Jones GJ, Islam A, et al. *Cryptococcus gattii* is killed by dendritic cells, but evades adaptive immunity by failing to induce dendritic cell maturation. J Immunol 2013; 191:249–261.

- 109- Angkasekwinai P, Sringkarin N, Supasorn O, Fungkrajai M, Wang YH, Chayakulkeeree M, et al. *Cryptococcus gattii* Infection Dampens Th1 and Th17 responses by attenuating dendritic cell function and pulmonary chemokine expression in the immunocompetent hosts. *Infect Immunol* 2014; 82:3880–3890.
- 110- Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, Urai M, Kaneko Y, et al. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun* 2015; 83:1577–1586.
- 111- Gregor MC. Carcinogenicity and genotoxic carcinogens. *General and applied toxicology* 2000; 1099-1117.
- 112- Golpa Rao VVN, Venkatarama EV, Thomas IM. Chromosome damage in untreated tuberculosis patients. *Tubercle* 1990; 71:169-72.
- 113- Ribeiro DA, Calvi SA, Picka MM, Persi E, de Carvalho TB, Caetano PK, Nagoshi LR, Lima CR, Machado JM, Salvadori DM. DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2007 Jul;116(3):296-301.
- 114- Creusy C, Certad G, Guyot, Dei-Cas E. Parasites and Oncogenesis with a Special Reference to Gastro-Intestinal Neoplasia Induced by *Cryptosporidium parvum*. *Chemistry and Biology* 2010; 381:388 2010.
- 115- Oliveira LRC, Cezário GAG, Lima CRG, Nicolette VC, Peresi E, Sívio MT, Picka MCM, Calvi SA. DNA damage and nitric oxide production in mice following infection with *L. chagasi*. *Mut Res* 2011; 723:177-81.
- 116- Ribeiro-Vieira RA, Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques SA. Paracoccidioidomycosis: no genetic damage in human peripheral blood cells of patients assessed by single-cell gel (comet) assay. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(4):476-8.
- 117- Kocyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H, Erel O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutations research* 2005; 585:71-78.

118- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37–56

119- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175:184–191.



Capítulo I

DNA damage and nitric oxide production by human peripheral blood mononuclear cells challenged with *Cryptococcus* species *neoformans* and *gattii*

Short title : DNA damage and *Cryptococcus*

Jéssica Cristina Bilizario Nogueiro Andrade^{1*}, Mariana Gatto¹, Daniela Ramos Rodrigues², Ângela Maria Victoriano de Campos Soares², Sueli Aparecida Calvi¹

1. Faculdade de Medicina , UNESP- Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, Deapratamento de , Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais, São Paulo , Brasil
2. Instituto de Biociências, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Microbiologia e Imunologia , Laboratório de Imunologia da Paracoccidiodomicose , São Paulo, Brasil

ABSTRACT

Cryptococcosis, a systemic mycosis capable of disseminating to the central nervous system with frequent lethal effects, is caused by the species *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Several infectious agents such as virus, bacteria and parasites may be associated to DNA damage and carcinogenesis in humans. Products of the oxidative metabolism, such as NO, produced during the response triggered as a host defence strategy to destroy these pathogens, have been implicated in this damage process, due to excessive production related to a established chronic inflammatory response. Here, we asked whether *Cryptococcus neoformans* and/or *C. gattii* can cause DNA damage in human peripheral blood cells (PBMCs) and whether this process is related to NO levels produced by these cells. We found that both species equally are able to inducing genotoxicity in PBMCs. However an association between DNA damage and high NO levels were only detected in relation to *C. gattii*. The results point to the possibility that patients with cryptococcosis are more susceptible to the development of other diseases.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, DNA damage, NO, peripheral blood mononuclear cells.

Artigo submetido para a revista *Medical Mycology*

INTRODUCTION

Cryptococcosis, a systemic mycosis whose incidence has increased drastically in last decades, is caused by capsulated yeasts of the fungus belonging to genus *Cryptococcus*. Despite *Cryptococcus* contain several species, infection in humans are only associated to two of them: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* that present important differences in relation to the affected populations.⁽¹⁾ While *C. neoformans* infects individuals in the urban area and with a profound impairment of the immune response, as those with AIDS, in whom cryptococcosis is listed as one of the most important causes of death, *C. gattii* is able to infect immunocompetent individuals in both, rural and urban areas.⁽²⁻⁴⁾ To understanding the mechanisms involved in these differences have been a challenge for researchers. Infection of brain and meninges by *C. neoformans* is the most important clinical form related to deaths.⁽⁵⁾ Worldwide, *C. neoformans* causes approximately 1 million of cases of meningitis per year among people with HIV/AIDS, resulting in approximately 625,000 deaths.⁽⁶⁾ In the immunocompetent patient, *C. gattii* infection is clinically characterized by pulmonary complications and pneumonia, with or without meningitis. Symptoms may also occur in the skeletal muscles, with a tendency to present lesions with lung and/or cerebral mass, and hydrocephalus.⁽⁵⁾

Studies have been strongly suggested that several infectious agents such as virus, bacteria and parasites may be associated to genotoxicity in humans.⁽⁷⁾ Despite this, it has been very difficult to identify pathogens as causative agents of cancers.

Host protection against *Cryptococcus* is closely associated to M1 or classically activated macrophages.⁽⁸⁾ This mechanism, in turn, depends on immune cells, including natural killer (NK) cells, CD8⁺ T cells, and CD4⁺ T-helper 1 (Th1)-type cells⁽⁹⁾ that respond to the pathogen secreting inflammatory cytokines, such as IFN- γ which signals macrophages to polarize toward a M1 phenotype.⁽⁹⁻¹²⁾ These macrophages destroy pathogens mainly via the activation of the oxidative metabolism.⁽¹³⁾ Specifically in the relation to *Cryptococcus*, the enzyme iNOS acts on the substrate L-arginine to produce nitric oxide (NO), which has anti-fungal properties.⁽¹⁴⁻¹⁷⁾ However, the metabolite produced primarily to attack the pathogen by nitration, oxidation or chlorination⁽¹⁸⁾ can cause, when in excess, injury to host cells inducing DNA damage leading to mutagenesis and other diseases.⁽¹⁹⁾

Studies making this association in fungal diseases are rare. This study aimed to evaluate whether *Cryptococcus neoformans* and/or *C. gattii* can cause DNA damage

in human peripheral blood cells and whether this process is related to NO levels produced by these cells .

METHODS

Subjects

Peripheral blood from healthy donors from University Hospital of the School of Medicine Botucatu, São Paulo State University, UNESP was used after signature of informed consent form. This study was approved by the Ethics in Research of the Faculty of Medicine of Botucatu, protocol nº 38381014.2.0000.5411.

Fungi

C. neoformans and *C. gattii* strains were provided by the Mycology Service from the Department of Microbiology and Immunology of the Institute of Biosciences - I.B.B., UNESP, Botucatu. Yeasts were cultured in 20 x 200 mm tubes containing Sabouraud culture medium (Difco) with yeast extract, at 25 ° C for 5 days.

Obtention of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by Ficoll-Hypaque density gradient (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (centrifugation at 405 g for 30 minutes). The ring rich in lymphocytes and monocytes was removed and washed with RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and then centrifuged at 450 g for 15 minutes. The cells were subsequently resuspended in complete culture medium (RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 40 mg/mL gentamicin and 10% inactivated fetal bovine serum). Identification of the cells and assessment of their viability were performed using Trypan Blue staining. The cells were seeded in 96-well tissue culture plates (1×10^7 /mL) and stimulated with *C. neoformans* or *C. gattii* (10^6 yeasts/mL) during 7 days. After this period, culture supernatants were collected and evaluated for NO concentrations and cells were analysed for DNA damage .

NO quantification

NO concentrations were evaluated by measuring the accumulation of nitrite in PBMCs supernatants using the standard Griess assay. Aliquots (100 μ l) of the supernatants were added to equal volumes of Griess reagent constituted of 1% sulfanilamide diluted in 5% H₃PO₄ and 0.1% naphthylenediamine (all of Sigma - Aldrich) in 96-well tissue culture plates. Absorbance at 540nm of the resultant reaction was determined by using an Elisa reader. Conversion of absorbance to NO concentrations was performed according to a standard curve (NaNO₂) and the results were expressed in μ M.

DNA damage

This evaluation was performed by the comet assay as described by Singh et al⁽²⁰⁾ with some modifications. Three types of lesions were analysed: the general lesions, the oxidized purines by using the enzyme formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FPG) and the oxidized pyrimidines by using the enzyme endonuclease III (endolIII). Aliquots of 10 μ l of PBMCs were added to 120 μ l of 0.5% low – melting point agarose. This mixture was layered onto a slide pre-coated with a 1.5% normal – melting point agarose and covered with a cover slip and placed at 4 ° C for 10 minutes to allow agarose to solidify. After this period, the coverslip was removed and the slide submerged in freshly prepared cold lysis solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH 10, 1% Triton X100 and 10% DMSO) followed by washing in PBS (Ca₂ + and Mg₂ + free) for 5 m and treatment with FPG and endolIII enzymes (1:1000 dilution) at 37 ° C for 30 minutes. Slides were then transferred to horizontal electrophoresis buffer, which was filled with freshly prepared alkaline buffer (1 mM EDTA and 300 mM NaOH, pH > 13). After 40 m, electrophoresis was performed (25 V for 30 minutes). The slides were placed for 15 minutes in neutralization solution (0.4 M Tris, pH 7.5), fixed with absolute ethanol, dried at room temperature and stored at 4 °C. At the time of analysis, the slides were stained with 50 μ l Syber Gold solution, covered with coverslips and 100 nucleoids per slide were examined under a immunofluorescence microscope (400X magnification) coupled to the Comet Assay II (Perceptive Instruments, Havervill, Suffolk, UK). The test was performed in duplicate, with slides coded and analyzed by blind test. DNA damage was measured by analyzing tail intensity (% of migrated DNA) and tail moment [the product of tail length (DNA migration) and fraction of DNA in the comet tail, i.e % of DNA in the tail].⁽²¹⁾

Statistical analysis

Analyses were performed by using the GraphPad Prism 5.0 software. Results concerning to NO evaluation were analysed by ANOVA for independent samples followed by Tukey Kramer test. Differences among the results of DNA damage evaluation were calculated by the gamma distribution test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

DNA damage induced by *C. gattii* and *C. neoformans* in PBMCs cultures

The results regarding general lesions triggered by both fungus species and referring to tail moment, that identifies the presence or absence of lesions, and those of tail intensity indicating the lesions intensity, are shown in Figure 1A. We found that the values after challenge with *C. gattii* were significantly higher ("tail moment" and "tail intensity") as compared to control cultures. The same did not occur in cultures challenged with *C. neoformans*, in which the values were similar to the controls. In figure 1B, the lesions detected specifically in purines, by using the enzyme formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FPG), are shown. Values higher than those obtained in the control cultures were detected after challenge with *C. gattii* and *C. neoformans* ("tail moment" and "tail intensity"). However, the results were statistically significant only after challenge with *C. neoformans*. In Figure 1C the lesions occurring specifically in the pyrimidines (enzyme ENDO III) can be analysed. We detected values significantly higher than control cultures for both species (tail moment and tail intensity). Together, our results indicate that both, *C. neoformans* and *C. gattii* are able to induce damage in the DNA of the evaluated cells, without no important differences between them. Images revealing the DNA damage in the analysed laminas are shown in the Figure 2. Cells with slight and more advanced lesions can be visualized. All degree of lesions were considered for our analysis.

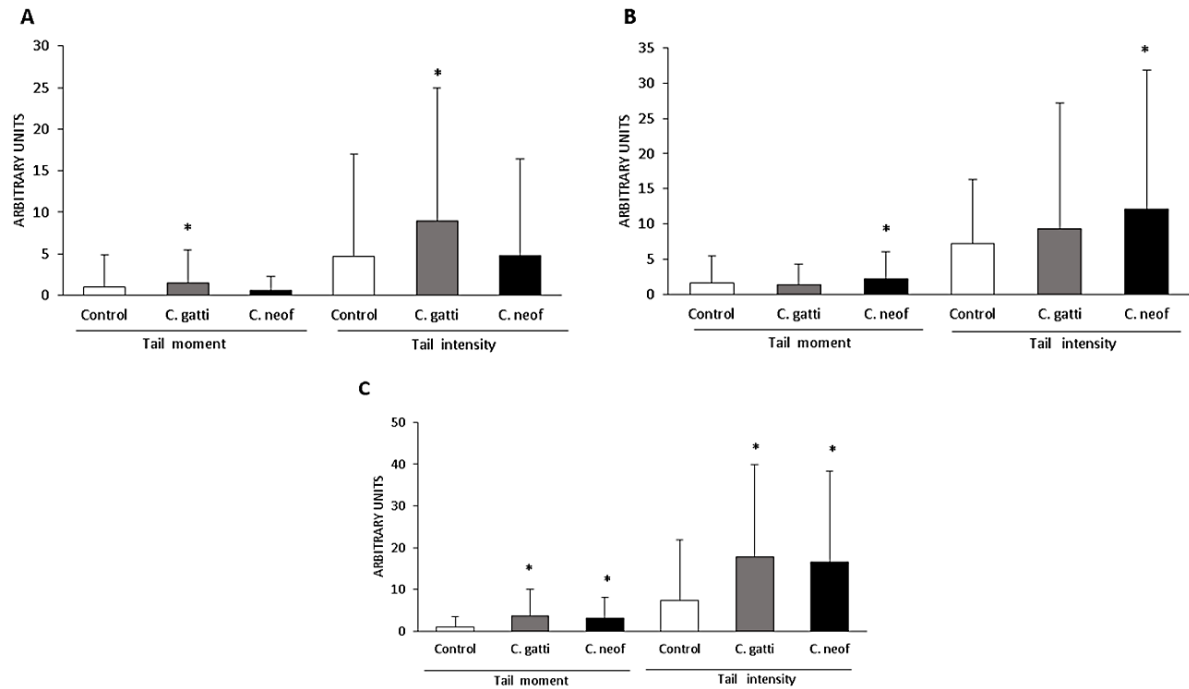


Figure 1 . DNA damage detected by Comet Test and expressed as tail moment and tail intensity in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) challenged with *C. neoformans* and *C. gattii* . A: Basal damage. B: lesions detected specifically in purines, by using the enzyme formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FPG). C: lesions occurring specifically in the pyrimidines (enzyme ENDO III). The results are expressed as mean + SD of experiments performed with cells obtained from 10 subjects. Statistically significant differences between groups are indicated: * $p < 0.05$ versus control.

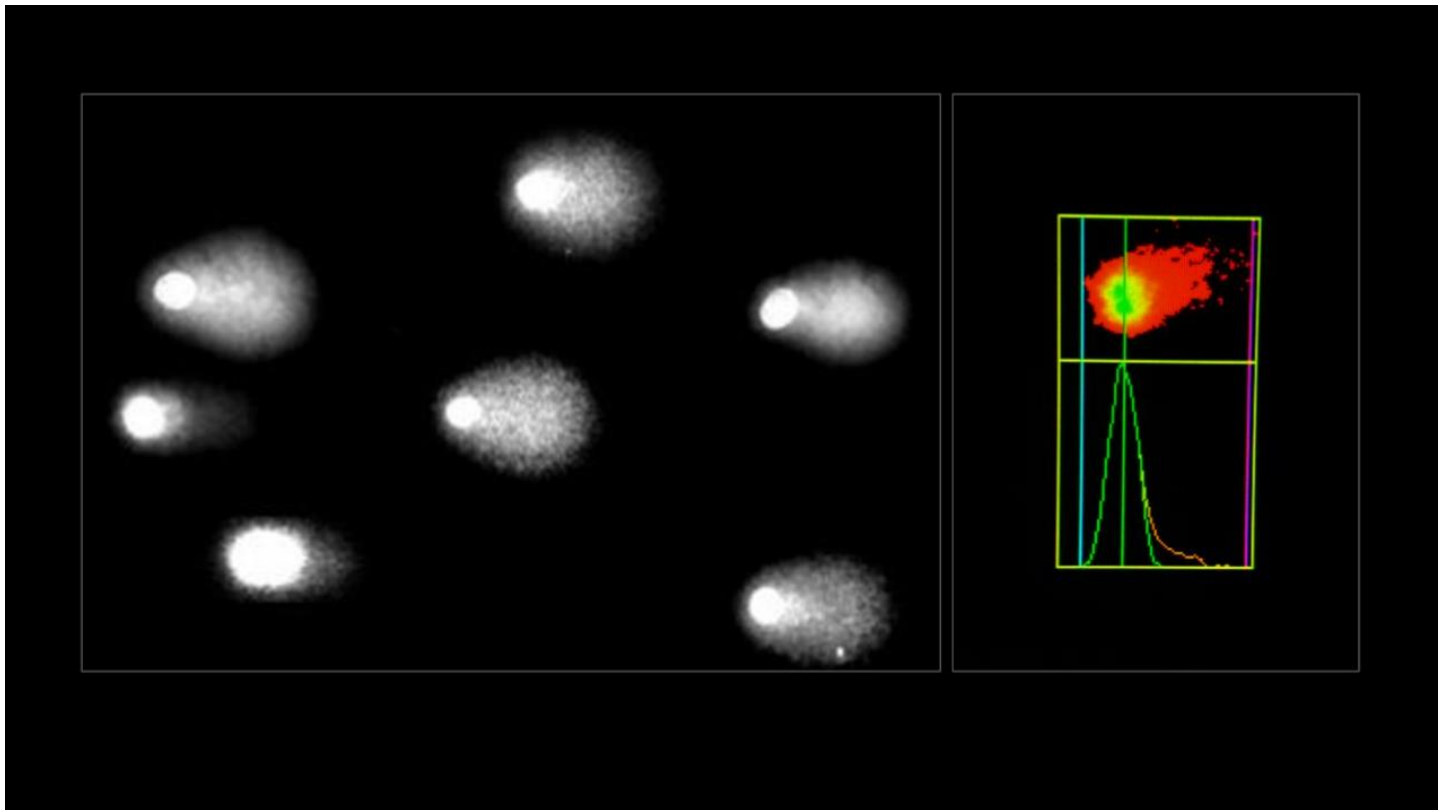


Figure 2. Images representatives of typical DNA damages detected by Comet test. Slight and more advanced lesions (comet like) can be observed .

NO production

In order to evaluate whether the detected DNA damage is associated to NO production, levels of this metabolite were quantified in the supernatants of PBMCs challenged with the two species of *Cryptococcus*. Unstimulated PBMCs produced low NO levels, that were significantly increased only after challenge with *C.gatti* (Figure 3).

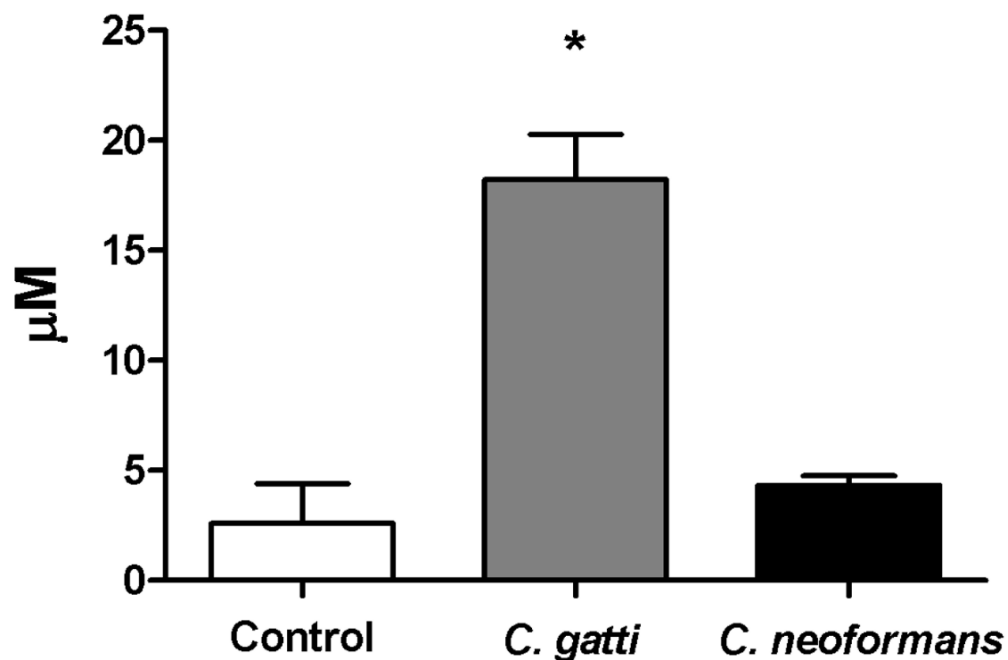


Figure 3. NO production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) challenged with *C. neoformans* or *C. gattii*. The results are expressed as mean + SD of experiments performed with cells obtained from 10 subjects. Statistically significant differences between groups are indicated: * $p < 0.05$ versus control and *C. neoformans*.

DISCUSSION

Although studies have demonstrated that some pathogens are able to induce DNA damage,⁽⁷⁾ data about fungi genotoxicity are rare. Peripheral blood leukocytes have been used to study DNA damage caused by some factors such as infectious agents, as they can represent the lesions induced in other cells. Another advantage is the feasibility of using such cells in human studies. In turn, comet assay is a relative simple, sensitive and powerful method to determining genotoxicity.⁽²⁰⁾ Thus, in this study the capacity of *Cryptococcus neoformans* and *C.gattii* in inducing DNA damage was tested by using human peripheral blood mononuclear cells and the comet assay. To our knowledge, this is the first report aiming to evaluate this process associated to *Cryptococcus*.

In the experiments in which the general lesions were evaluated, we found that only *C. gattii* induced significant DNA damage. However, when lesions on specific bases (purines and pyrimidines) were analysed, we concluded that both species are able to inducing genotoxicity. Based on these results we can suggest that differences in pathogenicity among these two species may be not associated to differences in the capacity to inducing DNA damage.

This finding allow us to include the two species of *Cryptococcus* among the infectious agents that can cause cells genotoxicity such as *Mycobacterium tuberculosis*,⁽²²⁾ *Trypanosoma cruzi*,⁽²³⁾ *Leishmania chagasi*,^(24,25) *Klebsiella pneumoniae*⁽²⁶⁾ and others.

The mechanisms involved in the association carcinogenesis/infection are not totally elucidated. Two main mechanisms are proposed: direct action of the pathogen on DNA or an indirect effect by activating a strong inflammatory response that induces cells to an excessive oxidative metabolism. Oxidative damage to DNA has been recognized as the main factor that promote carcinogenesis.^(27, 28) This second mechanism has already been proven in infections whose resistance requires the generation of an important inflammatory response that culminates with the activation of the oxidative metabolism for the destruction of the pathogen, as in the case of infection with *leishmania*^(24,25) and *T.cruzi*.⁽²³⁾ These data imply that this mechanism can also be suggested by infection with *Cryptococcus*, as host resistance to this fungus is associated with M1 macrophages which, for activation, requires the production of proinflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α . The main product of activated

M1 macrophages is NO that is able to destroy *Cryptococcus*⁸ but that in excess can lead to oxidative stress.

Here, in an attempt to determinate the association DNA damage /high NO production, the levels of this metabolite were evaluated in the supernatants of PBMCs challenged with *C.neoformans* and *C. gatti*. Surprisingly, we detected that only *C.gatti* was able to induce high NO production. Thus, an association between DNA damage and high NO levels were only detected in relation to this *Cryptococcus* species. Further studies are need to bether understanding these unexpected results. Independent of these differences, the results show the potential capacity of both fungus species in inducing carcinogenesis and point to the possibility that patients with cryptococcosis are more susceptible to the development of other diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (scholarship for student).

DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

There are no conflicts of interest. The authors are responsible for the content of the manuscript.

REFERENCES

1. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4(7):1–27.
2. Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 2001;39(2):155–68.
3. Andama AO, Den Boon S, Meya D, *et al.* Prevalence and outcomes of cryptococcal antigenemia in HIV-seropositive patients hospitalized for suspected tuberculosis in Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013;63(2):189–94.

4. Jarvis JN, Harrison TS, Govender N, *et al.* Routine cryptococcal antigen screening for HIV-infected patients with low CD4⁺ T-lymphocyte counts – time to implement in South Africa? *S Afr Med J* 2011;101(4):232–4.

5. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical of Microbiology Review* 1995; 8 (4) : 515-48.

6. Brandão AFM, Lima AS, Rodrigues ABN, *et al.* Meningoencefalite criptocócica: estudo clínico- epidemiológico de 59 pacientes. 2004. [Internet]. Available in <http://www.maymone.com.br/espaco>. Access in: 18 dez 2016.

7. Vainio H. Social Responsibility in Cancer Prevention Research: IARC as a 'Global Science Force'. *Asian Pac J Cancer Prev* 2002;3(3):267-72.

8. Leopold Wager C M, Hole C R, Wozniak K L, Wormley Jr, F L. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. *Front Microbiol* 2016; 7: 105.

9. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008 ;8(12):958-69.

10. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004 ;25(12):677-86.

11. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol* 2009 ; 27: 451–483.

12. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* 2014 ;14(2):81-93.

13. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of

activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988 ;141(7):2407-12.

14. Alspaugh JA, Granger DL. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. *Infect Immun* 1991 ;59(7):2291-6.

15. Arora S, Olszewski MA, Tsang TM, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2011;79(5):1915-26.

16. Hardison SE, Herrera G, Young ML, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL Jr. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. *J Immunol* 2012;189(8):4060-8.

17. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio* 2013 ;4(3):e00264-13.

18. Saran M, Beck-Speier I, Fellerhoff B, Bauer G. Phagocytic killing of microorganisms by radical processes: consequences of the reaction of hydroxyl radicals with chloride yielding chlorine atoms. *Free Radic Biol Med* 1999 ;26(3-4):482-90.

19. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004 ; 266(1-2):37-56.

20. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175 (1):184-91.

21. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 2003 ;18(1):45-51.

22. Rao VV, Gupta EV, Thomas IM. Chromosome damage in untreated tuberculosis patients. *Tubercle* 1990 ;71(3):169-72.

23. Ribeiro DA, Calvi SA, Picka MM, *et al.* DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2007;116(3):296-301.

24. Kocyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H, Erel O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat Res* 2005 ;585(1-2):71-8.

25. Oliveira LR, Cezário GA, de Lima CR, *et al.* DNA damage and nitric oxide production in mice following infection with *L. chagasi*. *Mutat Res* 2011 ;723(2):177-81.

26. Lai YC, Lin AC, Chiang MK, *et al.* Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS One*. 2014; 9(5):e96292.

27. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 ; 92(12):5258-65.

28. Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science* 1999; 286(5446):1897-905.



Capítulo II

Differentiation of CD4 cell subsets from human peripheral blood mononuclear cells challenged *in vitro* with *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii*.

Short title: CD4 cells subsets and *Cryptococcus neoformans/gattii*

Jéssica Cristina Bilizario Nogueira^{1*}, Mariana Gatto¹, Mariana Miziara de Abreu Teodoro¹, Daniela Ramos Rodrigues², Carolina Mendonça Gorgulho³, Ângela Maria Victoriano de Campos Soares², Sueli Aparecida Calvi¹

1. Faculdade de Medicina, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de, Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais, São Paulo, Brasil.

2. Instituto de Biociências, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Laboratório de Imunologia da Paracoccidioidomicose, São Paulo, Brasil.

3. Instituto de Biociências, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Laboratório de Citometria de Fluxo, São Paulo, Brasil.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are the etiological agents of human Cryptococcosis, a systemic mycosis whose incidence has increased drastically in last decades, particularly in immunosuppressed patients as those with AIDS. Of extreme importance for the study of the host's immune response to this infection is that these two fungus species cause disease in different populations and with different clinical forms. While *C. neoformans* is associated with disease in immunosuppressed patients, *C. gattii* is able to induce mycosis in immunocompetent ones. Here, in an attempt to better understanding these differences, we compared the ability of *C. neoformans* and *C. gattii* in inducing differentiation of the different CD4 cell subsets, with a focus on Treg and TH17 cells, as studies on the role of these two subsets are scarce in cryptococcosis. The experimental approach was to incubate *in vitro* human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with live yeasts of *C. neoformans* and *C. gattii* followed by evaluation of the intracellular expression of the cytokines IFN- γ (TH1), IL-4 (TH2), IL-17 (TH17) and the Foxp3 transcription factor (Treg cells) as well as mRNA expression for Foxp3 and ROR γ t (transcription factor for TH17). Overall, we found that *C. neoformans* is not able to induce TH1 and TH2 differentiation but induce Treg and TH 17 cells. By other hand, *C. gattii* induces only Treg cells. The contribution of these results for better understanding the differences in the relationship *C. neoformans* and *C. gattii* host is discussed.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, human peripheral blood mononuclear cells, CD4 cell subsets.

INTRODUCTION

Cryptococcosis is a life-threatening systemic mycosis caused by the species *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*.⁽¹⁾ These two species of the fungus affect different patients populations and with different disease manifestations. While *C. neoformans* infects individuals in the urban area and with a profound impairment of the immune response, as those with AIDS, *C. gattii* is able to infect immunocompetent individuals in both, rural and urban areas.⁽²⁻⁴⁾ To understanding the mechanisms involved in these differences have been a challenge for researchers. The infection of the brain and meninges by *C. neoformans* is the most important clinical form, as it is frequently associated to deaths.⁽⁵⁾ Worldwide, *C. neoformans* is responsible for approximately 1 million of cases of cryptococcal meningitis per year among people with HIV / AIDS, resulting in approximately 625,000 deaths.⁽⁶⁾ In the immunocompetent patient, *C. gattii* infection is clinically characterized by pulmonary lesions and pneumonia, with or without meningitis. Symptoms may also occur in the skeletal muscles, with a tendency to present lesions characterized by lung and/or cerebral mass, and hydrocephalus.⁽⁵⁾

The main host immune response against *Cryptococcus* correlates with macrophage polarization to a M1 phenotype.⁽⁷⁾ These cells mediate pathogens killing through generation of oxygen and nitrogen species.⁽⁸⁾ The NO synthase (iNOS) enzyme that is a marker of this type of macrophage acts on the L-arginine substrate to produce nitric oxide (NO), which has anti-cryptococcal properties.^(9,14) M1 macrophages generation depends on a response mediated by a TH1 CD4 subpopulation, which is characterized by the production of IL-2, IL-12, IL-18, IFN- γ and TNF- α . In contrast, induction of anti-inflammatory TH2 CD4 immune response characterized by the release of IL-4, IL-5, IL-13 and IL-10 is associated with the generation of M2 macrophages. Thus, TH1 and TH2 responses are associated to resistance and susceptibility to infection to *Cryptococcus*, respectively.^(15,16) In addition to the TH1 and TH2 subpopulations, TH17 characterized by the production of IL-17A, IL-21, IL-22, IL-6, and TGF- β ^(17,19) can potentially participate in host defense mechanisms against this fungus.^(20,21) Naïve CD4⁺ cells, can also preferentially differentiate into regulatory T cells (Tregs), whose differentiation occurs in the presence of TGF- β and are characterized by expression of the Foxp3 transcription factor and IL-10 production. Tregs exhibit suppressive activity and play an important

role in the modulation of inflammatory responses. Thus, they may have an important protective role, limiting excessive and harmful inflammatory responses to the host, but at the same time may play a non-protective role by over-inhibiting this response.⁽²²⁾ Studies on role of TH17 and Tregs in cryptococcosis are scarce. Here, we compared the ability of *C. neoformans* and *C. gattii* in inducing differentiation of the different CD4 subpopulations, with a focus on Treg and TH17 cells.

METHODS

Subjects

Peripheral blood from healthy donors from University Hospital of the School of Medicine Botucatu, São Paulo State University, UNESP was used after signature of informed consent form. This study was approved by the Ethics in Research of the Faculty of Medicine of Botucatu, protocol nº 38381014.2.0000.5411.

Fungi

C. neoformans and *C. gattii* strains were provided by the Mycology Service from the Department of Microbiology and Immunology of the Institute of Biosciences - I.B.B., UNESP, Botucatu. Yeasts were cultured in 20 x 200 mm tubes containing Sabouraud culture medium (Difco) with yeast extract, at 25 ° C for 5 days.

Obtention of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by Ficoll-Hypaque density gradient (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (centrifugation at 405 g for 30 minutes). The ring rich in lymphocytes and monocytes was removed, washed with RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and then centrifuged at 450 g for 15 minutes. The cells were subsequently resuspended in complete culture medium (RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 40 mg/mL gentamicin and 10% inactivated fetal bovine serum). Identification of the cells and assessment of their viability were performed using Trypan Blue staining. The cells were seeded in 96-well tissue culture plates (1×10^7 /mL) and stimulated with *C. neoformans* or *C. gattii* (10^6 yeasts/mL) during 7 days.

Intracytoplasmic expression of IFN- γ , IL-4, and IL-17

Six h before the end of the culture (7 days) a solution of blebeldin (5 mg / mL) (BioLegend, San Diego, CA, USA) were added to the PBMCs cultures to prevent cytokines release from the cytoplasm. After this period, cells were collected from the 96-well plates, transferred to Eppendorf-type microfuge tubes and centrifuged at 10.000 rpm for 60 s. Supernatant was disposed and cells washed again with 200 μ L of 1% BSA. After cells were labeled with anti-CD4 monoclonal antibody conjugated to PE-Cy7 (phycoerythrin) (0.6 μ L), and anti-CD3 conjugated to FITC (Fluorescein) (2 μ L) (BD-Becton, Dickinson and Company, San Diego, CA, USA) and incubated for 20 min. At the end of this period cells were treated with 100 μ L of Reagent A fixing Fix & Perm kit (Nordic MUBio) for 20 min at room temperature, washed with 0.5% BSA, suspended in 100 μ L of Reagent B permeabilization Fix & Perm kit (Nordic MUBio), and incubated with antibodies anti-IFN- γ conjugated with PE (phycoerythrin), anti-IL-4 conjugated to PE and anti-IL17 conjugated with Alexa 488 (5 μ L) for 20 min at room temperature. Finally, cells were washed with 500 μ L of PBS + 0.5% BSA, and suspended in cytometric buffer solution.

Intracitoplasmic expression of Foxp3 transcription factor

PBMCs were submitted to the same treatments described for intracytoplasmic expression of IFN- γ , IL-4, and IL-17 until the incubation with the surface marker antibodies. After, to the cellular suspension was added 300 μ L of wash (eBiosciense - San Diego, CA, USA), followed by centrifugation in a microcentrifuge at 10.000 rpm for 60 s, discard of the supernatant and incubation with 300 μ L of Perm reagent/FIX (eBiosciense), for 30 min in free light refrigerator. After this period, 500 μ L of wash buffer was added and the suspension was 2x centrifuged for 5 min at 405 g and 1x for 60 s at 9500 g. The supernatant was discarded by inversion, 3 μ L of Foxp3 antibody conjugated to PE (phycoerythrin) was added and the cells incubated for 30 min at room temperature. Finally, cells were resuspended in 1 mL wash buffer, centrifuged and resuspended in 300 μ L of electrolyte solution Isotonic + 1% BSA for analysis in flow cytometer.

Foxp3 and Ror γ t mRNA expression

Total RNA was extracted from PBMCs by the TRIzol method (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm; all

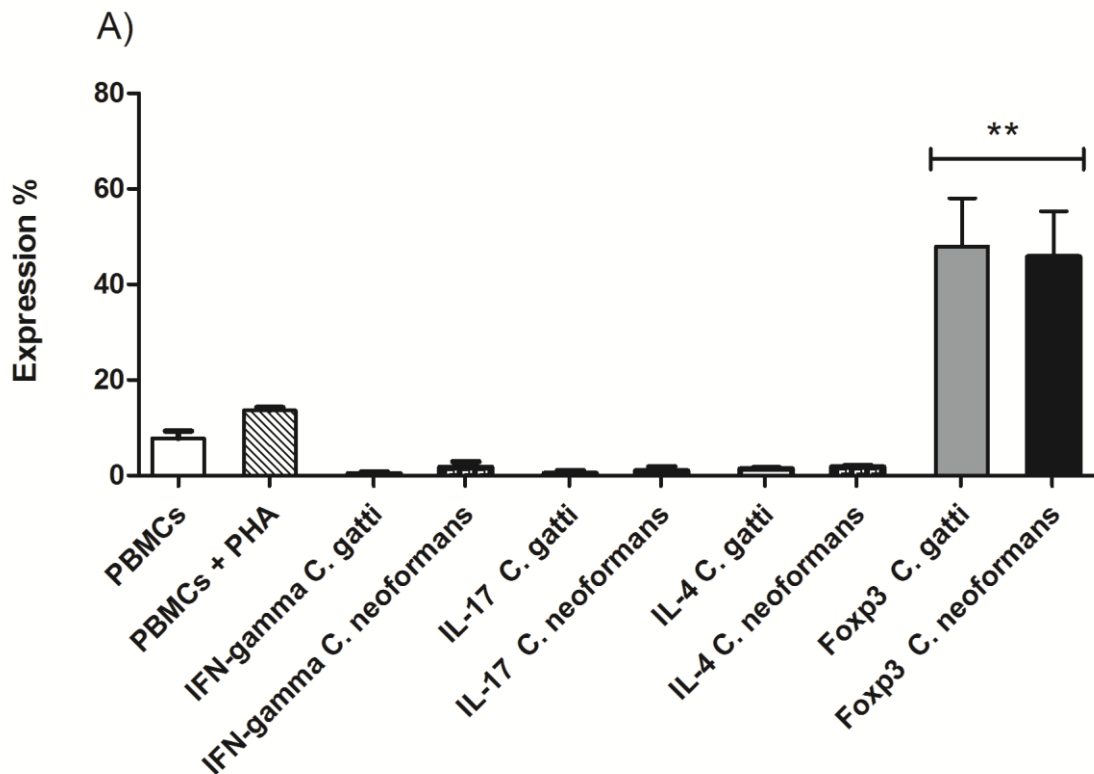
samples showed an absorbance value of approximately 2.0. One microgram of RNA was used for the synthesis of 20 µL of complementary DNA (cDNA) by ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Brazil). Foxp3 and Rorγt mRNA levels were determined by real-time PCR. Primer sequences are shown in Table 1. The β-actin gene was used as an internal control. Relative quantification of each target mRNA was performed using a standard curve-based method for relative real-time PCR data processing with a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and Power SYBR Green PCR Master Mix. The real-time PCR cycling conditions were 95°C for 10 minutes, followed by 40 annealing cycles at 95°C for 15 seconds and extension at 60°C for 1 minute. Fluorescence signals were collected during the annealing and extension cycle of amplification (60°C for 1 minute). Amplification of specific transcripts was confirmed based on the melting curve profiles generated at the end of each run. The control samples' mean expression was assigned a relative value of 1.0, and concentrations in all other samples were normalized proportionately.

Table 1. Primers

Gene	Primers sequence
Ror-γT	F- 5'TGAGAAGGACAGGGAGCCAA-3' R- 5'CCACAGATTTTGCAAGGGATCA-3'
Foxp3	F- 5'ACAGTCTCTGGAGCAGCAGC-3' R- 5'CCACAGATGAAGCCTTGGTC-3'
B-actina	F-5'AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA-3' R- 5'CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'

RESULTS

To determine the profile of CD4 cells that is induced by both fungus species, the expression of typical cytokines produced by each subpopulation was analysed (Figure 1). We observed that CD4⁺ cells do not express intracytoplasmic cytokines associated with the subpopulations TH1 (IFN- γ), TH2 (IL-4), TH17 (IL-17). However, Foxp3 transcription factor was significantly and equally expressed in response to *C. neoformans* and *gattii*, which reveal that Treg cells are the CD4 subpopulation preferentially induced by both species (Figure 1A). Representative *dotplots* of CD4⁺ intracytoplasmic cytokines of the subpopulation IFN- γ (TH1), IL-17 (TH17), IL-14 (TH2) and Foxp3 (Treg) (B).



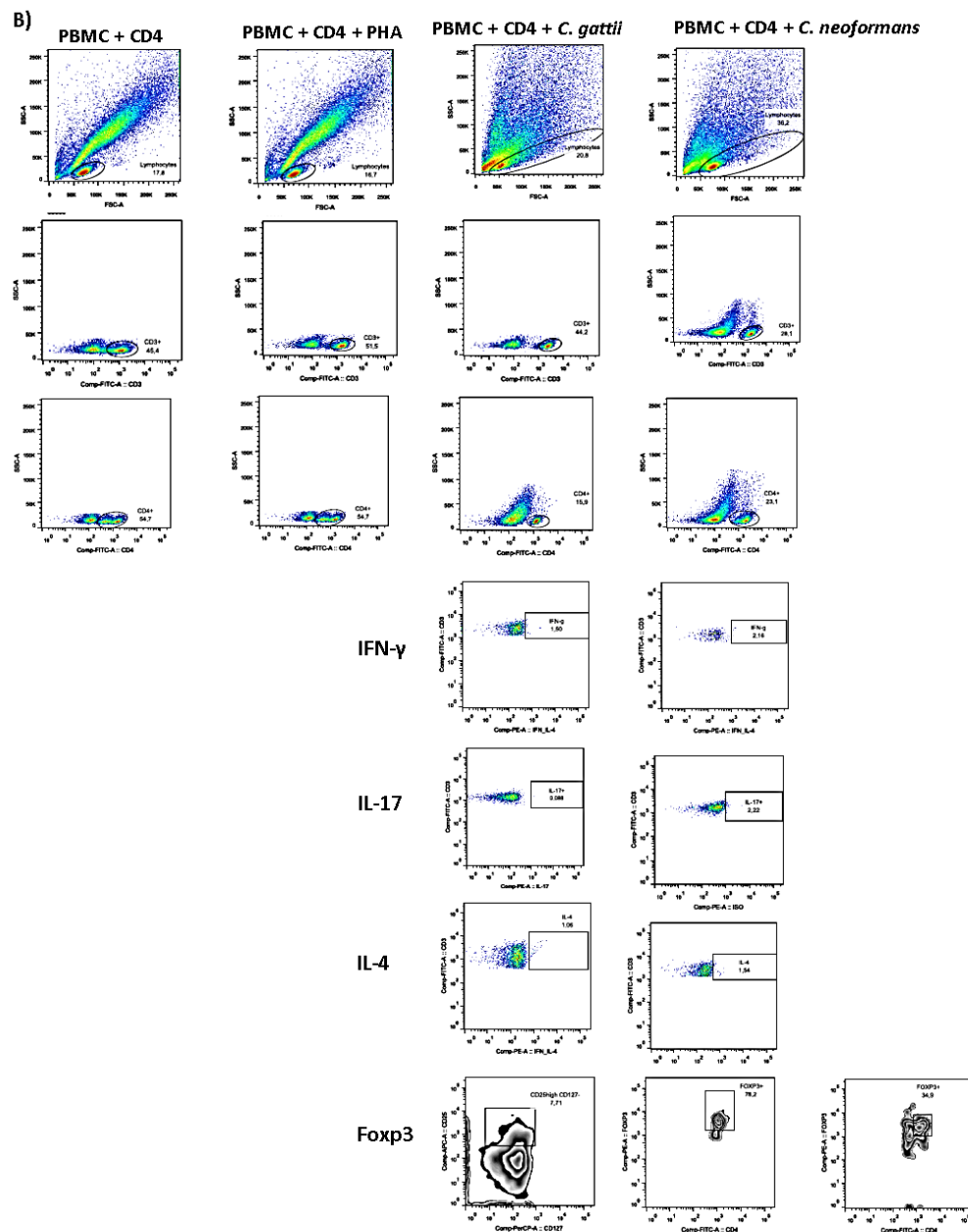


Figure 1. Expression of intracytoplasmic cytokines IFN- γ , IL-17, IL-4, and the transcription factor Foxp3 by PBMCs (1x10⁷/mL) stimulated with *C. neoformans* or *C. gattii* (10⁶ yeasts/mL) during 7 days **(A)**. Representative *dotplots* of CD4⁺ intracytoplasmic cytokines of the subpopulation IFN- γ (TH1), IL-17 (TH17), IL-14 (TH2) and Foxp3 (Treg) **(B)**. The results obtained with cells from 5 individuals are expressed as mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ compared with other groups.

As we were focusing on Treg and TH17 cells, to confirm the results, we performed experiments in which the mRNA expression for Foxp3 (Figure 2A) and also for ROR γ t (Figure 2B) the transcription factor for TH17, was quantified. A significant expression of mRNA for Foxp3 was detected in response to *C. neoformans*. This result confirms the capacity of this fungus to induce this factor, as it was detected at both: mRNA and protein phases (intracytoplasmic expression). Differently, *C. gattii* did not induce a significant expression of mRNA for Foxp3. However, a significant expression of this factor was detected at protein phase (intracytoplasmic expression), which lead us to consider that despite fail in detect mRNA for this factor, the protein was produced. Thus, our interpretation for the results is that both *C. neoformans* and *C. gattii* are able to induce Foxp3 expression, and consequently Treg differentiation.

Significant expression of mRNA for the ROR γ t factor (Figure 2B) was detected for *C. neoformans*, which allow us to consider the ability of this fungus to induce TH17 response, regardless IL-17 is not detected in the cytoplasm of the cell (Figure 1). Similar response was not obtained for *C. gattii*, as both ROR γ T mRNA and cytokine were not expressed.

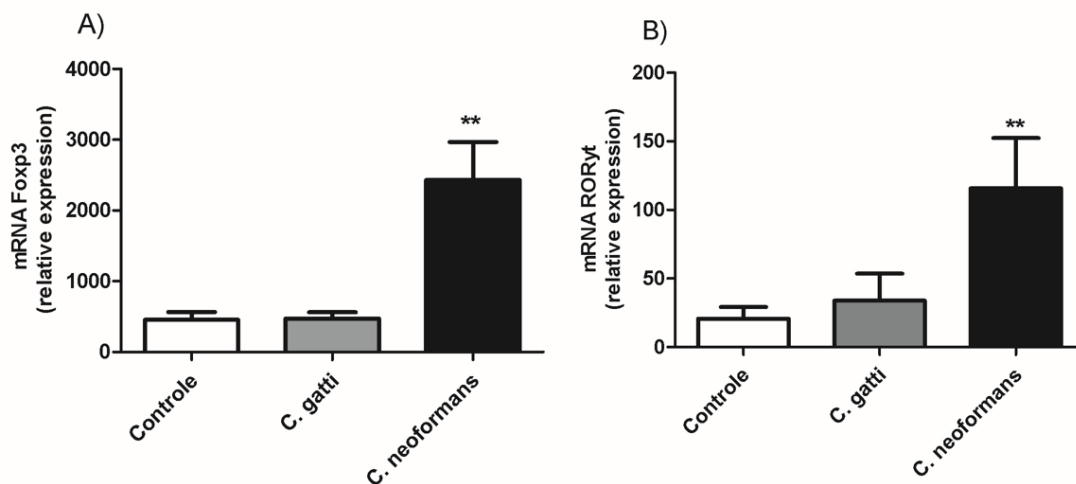


Figure 2. Relative quantification of mRNA expression for Foxp3 **(A)** and ROR γ T **(B)** by PBMCs cultures, without stimulation (control) or stimulated with *C.gattii* or *C. neoformans*. The results are expressed as mean + standard deviation. ** $p < 0.05$ x control and x *C.gattii*.

DISCUSSION

Here we aimed to compare the profile of CD4 cell subsets induced by *C. neoformans* and *C. gattii*. Studies comparing the host response to these two species can help to understanding why they affect different patients populations and with different disease manifestations. Despite we also tested TH1 and TH2 subsets, the focus of our study was TH17 and Treg, as studies on these subpopulations in cryptococcosis are scarce. The experimental approach was to incubate PBMCs with live yeasts of *C. neoformans* and *C. gattii* and to detect the intracellular expression of the cytokines IFN- γ (TH1), IL-4 (TH2), IL-17 (TH17) and the Foxp3 transcription factor (Treg cells) as well as mRNA expression for Foxp3 and ROR γ t (transcription factor for TH17). Overall, we found that *C. neoformans* is not able to induce TH1 and TH2 differentiation but induces Treg and TH17 cells. By other hand, *C. gattii* induces only Treg cells. Our results differs from a similar study in the literature showing that PBMCs incubation with *C. gattii*, induces high concentrations of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 and the Th17/22 cytokines IL-17 and IL-22 while *Cryptococcus neoformans* species complex seems to induce mainly a IL-22 response, with low IL-17 production. ⁽²³⁾ One of the explanations for these differences is the use of heat killed cryptococcus in this study and live yeasts in ours. Factors released by live *Cryptococcus* may interfere significantly in cells response to this pathogen.

The experimental approach used for us in vitro, may represent the in vivo situation, in which immunocompetent individuals is infected with live yeasts of *C. neoformans* or *C. gattii*. Following this reasoning, the finding that *C. gattii* is able to induce only Treg response may at least partially explain how this specie can induce disease in immunocompetent individuals. Studies have shown that Tregs exhibit suppressive activity and play an important role in the modulation of inflammatory responses. Thus, they may have an important protective role, limiting excessive and harmful inflammatory responses to the host, but at the same time may play a non-protective role, unnecessarily inhibiting these responses. ⁽²²⁾ Thus, it is crucial that there is a balance between the induction of effector CD4 + subpopulations and Treg cell activation during an infection. ^(24,25) Thus, our study suggests that Treg response is involved in an excessive inhibition of effector cells important for fungus destruction which enable *C. gattii* to induce disease in immunocompetent host. This interpretation agrees with studies showing that low numbers of TH1/TH17 lymphocytes are found in the lungs of *C. gattii* infected mice.⁽²⁶⁾ To our knowledge this is the first report on

induction of Treg cells by both *Cryptococcus* species. A different interpretation can be given by infection with *C. neoformans*. Despite this species induce Treg response, a concomitant important effector response mediated by TH17 is also present, which at least partially can assure protection in immunocompetent individuals. This highlights the role of this CD4 subset in protection against *Cryptococcus*, that is yet undefined. Some studies have shown that TH17 can participate in host defense mechanisms against the fungus.^(20,21) However, other studies have shown that IL-17 mediated response is only important for optimizing the response to *Cryptococcus* pulmonary infection since TH1 response is sufficient to confer protection.⁽²⁷⁾ Overall our results contribute to a better understanding of host immune mechanisms to infection with these two fungus species that result in disease in different populations and with different clinical forms.

REFERENCES

1. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of Cryptococcosis. Cold Spring Harb Perspect Med 2014; 4(7):1–27.
2. Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. Med Mycol 2001; 39(2):155–68.
3. Andama AO, Den Boon S, Meya D, et al. Prevalence and outcomes of cryptococcal antigenemia in HIV-seropositive patients hospitalized for suspected tuberculosis in Uganda. J Acquir Immune Defic Syndr. 2013; 63(2):189–94.
4. Jarvis JN, Harrison TS, Govender N, et al. Routine cryptococcal antigen screening for HIV-infected patients with low CD4⁺ T-lymphocyte counts – time to implement in South Africa? S Afr Med J 2011; 101(4):232–4.
5. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clinical of Microbiology Review 1995;8 (4): 515-48.

6. Brandão AFM, Lima AS, Rodrigues ABN, et al. Meningoencefalite criptocócica: estudo clínico- epidemiológico de 59 pacientes. 2004. Net. Available in <http://www.maymone.com.br/espaco>. Access in: 18 dez. 2016.

7. Leopold Wager C M, Hole C R, Wozniak K L, Wormley Jr, F L. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. *Front Microbiol* 2016; 7: 105.

8. Ding A H, Nathan C F, Stuehr D J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141(7):2407-12.

9. Alspaugh JA, Granger DL. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. *Infect Immun*. 1991; 59(7):2291-6.

10. Arora S, Olszewski MA, Tsang TM, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2011; 79(5):1915-26.

11. Hardison SE, Herrera G, Young ML, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL Jr. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. *J Immunol* 2012; 189(8):4060-8.

12. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski MA. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio* 2013; 4(3):e00264-13.

13. Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Olszewski MA, Wormley FL Jr. STAT1 signaling is essential for protection against *Cryptococcus neoformans* infection in mice. *J Immunol* 2014; 193(8):4060-71.

14. Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Olszewski MA, Mueller M, Wormley FL Jr .STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 2015; 83(12):4513-27.
15. Rohatgi S, Pirofski LA. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. Future Microbiol 2015; 10 (4):565-81.
16. Gibson JF, Johnston SA. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. Fungal Genet Biol 2015; 78:76-86.
17. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. Semin Immunol 2007; 19(6):362-71.
18. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol. 2009; 27:485-517.
19. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. Immunology 2010; 129(3):311-21.
20. Zhang Y, Wang F, Tompkins KC, et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. Am J Pathol 2009; 175(6):2489-500.
21. Murdock BJ, Huffnagle GB, Olszewski MA, Osterholzer JJ. Interleukin-17A enhances host defense against cryptococcal lung infection through effects mediated by leukocyte recruitment, activation, and gamma interferon production. Infect Immun 2014;82(3):937-48.
22. Rakebrandt N, Littringer K, Joller N. Regulatory T cells: balancing protection versus pathology. Swiss Med Wkly 2016; 146: w14343.
23. Schoffelen T, Illnait-Zaragozi MT, Joosten LAB, Netea MG, Boekhout T, et al. *Cryptococcus gattii* Induces a Cytokine Pattern That Is Distinct from Other Cryptococcal Species. PLoS One 2013; 8(1): e55579.

24. Romani L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol* 2008; 46(6):515-29.

25. Schulze B, Piehler D, Eschke M, von Buttlar H, Kohler G, Sparwasser T, Alber G. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells suppress fatal T helper 2 cell immunity during pulmonary fungal infection. *Eur J Immunol* 2014 ;44(12):3596-604.

26. Angkasekwinai P, Sringkarin N, Supasorn O, et al. *Cryptococcus gattii* infection dampens Th1 and Th17 responses by attenuating dendritic cell function and pulmonary chemokine expression in the immunocompetent hosts. *Infect Immun* 2014 82(9):3880-90.

27. Wozniak KL, Hardison SE, Kolls JK, Wormley FL. Role of IL-17A on resolution of pulmonary *C. neoformans* infection. *PLoS One* 2011;6(2):e17204



Conclusões

Os resultados referentes ao primeiro objetivo do presente estudo permitiram concluir que o *C.neoformans* não é capaz de induzir a diferenciação de TH1 e TH2, mas sim de células Treg e TH17. Por outro lado, o *C.gattii* induz apenas a diferenciação de células Treg.

Quanto ao segundo objetivo os resultados mostraram que ambas as espécies são igualmente capazes de induzir genotoxicidade em PBMCs. No entanto, uma associação entre danos no DNA e altos níveis de NO foi detectada apenas em relação a *C. gattii*.



Anexos

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM TRABALHO CIENTÍFICO

O sr(a)

está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada , “**Análise de células T regulatórias e avaliação genotóxica na infecção *in vitro* por diferentes espécies de fungos do gênero *Cryptococcus spp***”. A doença Criptococose é uma micose, causada pelo fungo das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A espécie *C. neoformans* geralmente acomete pessoas em que as células do sistema de defesa não funcionam bem e vivem em área urbana e *C. gattii* acomete pessoas no geral em áreas urbanas e rurais. A infecção acontece quando o fungo que está no ambiente entra através da respiração e chega aos pulmões e na corrente sanguínea, podendo também invadir o cérebro e atingir outros órgãos. Não se sabe a razão de cada espécie de fungo atingir diferentes tipos de pessoas, com isso pretendemos estudar o papel de algumas células e substâncias presentes no sangue para tentar entender melhor como ocorre a infecção. Convidamos o senhor (a), doador de sangue e saudável, pois precisamos de células de defesa que estejam funcionando normalmente para observar seu comportamento quando infectada com o fungo, simulando a infecção.

Este trabalho é desenvolvido sob a responsabilidade da Farmacêutica Jéssica Cristina Bilizario Nogueira Andrade e da Bióloga Prof^a. Dr^a Sueli Aparecida Calvi, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem. Sendo assim, estando devidamente informado do trabalho a cima exposto, o Sr(a) está sendo convidado a participar da pesquisa, conforme os termos abaixo:

Fui devidamente informado sobre os objetivos e técnicas envolvidas que consistem em: coleta de 30 mL de sangue através da veia do braço em um único momento do estudo. Fui informado que os técnicas realizados não trás nenhum risco para minha saúde e o único desconforto será a coleta de sangue para o estudo, que pode causar dor durante e manchas roxas após.

Declaro que concordo em participar do projeto de pesquisa. Estou ciente de que os resultados dos exames serão utilizados somente pelas pesquisadoras, que manterão sigilo

sobre minha identidade, e que as mesmas estão disponíveis para responder a quaisquer perguntas. Declaro que não receberei nenhum benefício financeiro em participar da pesquisa. Sei ainda, que **poderei retirar este consentimento a qualquer tempo, sem que isso resulte em prejuízo para meu seguimento, atual ou futuro, em qualquer dependência do Hospital das Clínicas da UNESP.** Em caso de dúvida adicional, sei que poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, através do fone: 3880-1608, ou com as pesquisadoras responsáveis pelo trabalho, nos contatos mencionados no fim deste documento.

Este documento após aprovação do CEP será elaborado em 2 vias, sendo uma entregue ao sujeito da pesquisa e outra será mantida em arquivo pelo pesquisador.

Botucatu, ____ de _____ 20____.

Assinatura do paciente

Assinatura da pesquisadora

Sueli Aparecida Calvi

End: Rua Fausto Lyra Brandão, 211 Vila Nogueira, Botucatu

[Tel:14-38821395;](tel:14-38821395)

Email: sacalvi@fmb.unesp.br

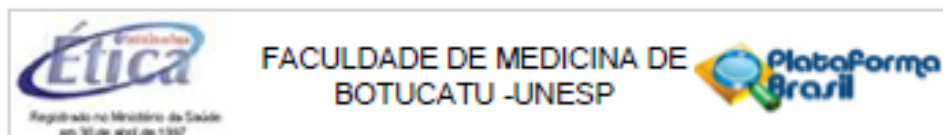
Lab. Doenças Tropicais 14-3880-1641

Jéssica Cristina Bilizario Nogueira Andrade

End: Agenor Nogueira, 496 Vila São Lucio, Botucatu

[Tel:14-99124-0397:](tel:14-99124-0397)

Anexo 2



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de células Tregulatórias e avaliação genotóxica na infecção in vitro por diferentes espécies de fungos do gênero *Cryptococcus* spp

Pesquisador: JÉSSICA CRISTINA BILIZARIO NOGUEIRA ANDRADE

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 38381014.2.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 916.780

Data da Relatoria: 14/12/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto pendente em reunião do CEP realizada no dia 01/12/2014. Retoma para análise.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Avaliar a genotoxicidade e analisar as células Tregs em PBMCs de indivíduos saudáveis estimuladas in vitro com *C. gattii* e *C. neoformans*.

Objetivos específicos: Avaliar:

- a frequência de células Tregs em culturas de PBMCs estimuladas com *C. gattii*, *C. neoformans*, LPS ou sem estímulo;
- a expressão gênica do Foxp3 em culturas de PBMCs estimuladas com *C. gattii*, *C. neoformans*, LPS ou sem estímulo, por RT-PCR;
- a produção das citocinas IL-2, IL-10, IL-35 e TGF- do sobrenadante de culturas de PBMCs estimuladas com *C. gattii*, *C. neoformans*, LPS ou sem estímulo;
- as alterações genotóxicas em culturas de PBMCs estimuladas com *C. gattii*, *C. neoformans*, ou sem estímulo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: biológico, segundo os autores.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

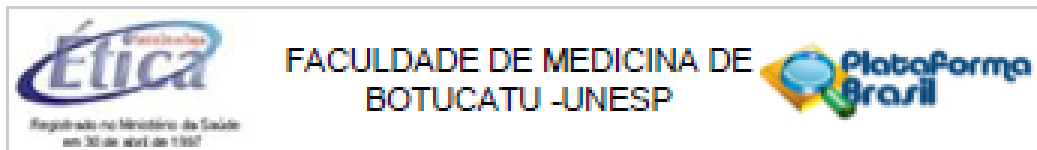
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1808

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 918.700

Benefícios: Os resultados podem ser benéficos para futuros pacientes infectados com *C. gatti* e *C. neoformans*.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão coletados 30 ml de sangue periférico de 20 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, entre 18 e 40 anos, doadores de sangue do Hemocentro do HC FMB, após obtenção do TCLE. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) serão obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Histopaque; Para o cultivo do *C. neoformans* e *C. gatti* e estimulação das PBMCs serão utilizadas cepas de *C. neoformans* e *C. gatti*, fornecidas pelo Depto Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. A avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de PBMCs será feita pela dosagem das citocinas IL-2, IL-10, IL-35 e TGF- por citometria de fluxo. Para a quantificação da expressão gênica do fator de transcrição Foxp3 pela PCR em Tempo Real (qPCR) será realizado a extração de RNA total, síntese de cDNA. A quantificação relativa da expressão gênica (RT-PCR) será feita por análise da amplificação dos genes Foxp3 e -actina pelo método da quantificação relativa. A avaliação das células Treg será feita por citometria de fluxo e dos danos no DNA por protocolo específico. Metodologia e análise estatística foram detalhadas no projeto. Cronograma adequado. Orçamento estimado em 25.000,00. TCLE para os doadores de sangue, escrito em linguagem muito técnica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pendências:

- TCLE em linguagem mais informal e explicativa: Pendência atendida.
- na Plataforma Brasil, ser mais direto com relação aos riscos biológicos e acrescentar os riscos da venopunção (dor, hematoma). Pendência não atendida, porém os autores foram explicativos no TCLE, e portanto do ponto de vista ético, considero as colocações do TCLE suficientes.
- Anexar autorização do Chefe de Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências: Pendência atendida.

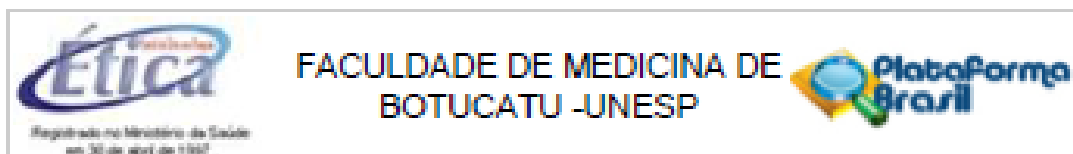
Recomendações:

Sugiro aprovação do projeto, sem necessidade de envio a CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1808	E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP

Continuação do Parecer: 918.700

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO em reunião EXTRAORDINÁRIA de 16/12/2014, sem necessidade de envio à CONEP.

Os pesquisadores deverão enviar "Relatório Final de Atividades" tão logo o presente projeto esteja concluído.

BOTUCATU, 16 de Dezembro de 2014

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
Bairro: Rubião Junior CEP: 13.615-970
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3580-1608 E-mail: cep@fmb.unesp.br

Página 02 de 02