**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito

**A atividade imunomoduladora de ArtinM sobre o curso da
infecção por *Cryptococcus gattii***

Ribeirão Preto

2018

Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito

**A atividade imunomoduladora de ArtinM sobre o curso da
infecção por *Cryptococcus gattii***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e
Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina
Roque Antunes Barreira

Co-Orientador: Dr. Thiago Aparecido da
Silva

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira-Brito, Patrícia Kellen Martins

A atividade imunomoduladora de ArtinM sobre o curso da infecção por *Cryptococcus gattii*. Ribeirão Preto, 2018.

147 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Roque-Barreira, Maria Cristina

Co-orientador: da Silva, Thiago Aparecido

1. Lectinas. 2. ArtinM. 3. *Cryptococcus gattii*. 4. Imunomodulação. 5. Reconhecimento de carboidrato.

Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito

A atividade imunomoduladora de ArtinM sobre o curso da infecção por *Cryptococcus gattii*

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque Antunes Barreira.

Co-orientador: Dr. Thiago Aparecido da Silva

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a). _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof(a).Dr(a). _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof(a).Dr(a). _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível. Aos meus pais Pedro Humberto e Eli Aparecida, meus exemplos de vida, presentearam-me com a riqueza dos estudos, e fizeram de mim não apenas uma profissional, mas um ser humano. E ao meu namorado Rubens Miguel, por continuamente me incentivar, acreditar no meu potencial, e mesmo que por vezes longe fisicamente, sempre se demonstrar presente.

“E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como ao Senhor, e não aos homens.”

(Colossenses 3:23)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela sua presença em minha vida, pela sabedoria, direção, sustento e coragem para conduzir minha caminhada, e por tornar tudo possível.

Aos meus pais Pedro Humberto e Eli Aparecida, exemplos de trabalho e dedicação nos quais sempre me inspirei e tenho orgulho de tê-los como meus pais. Por me ensinarem a nunca desistir dos meus sonhos, entenderem minha ausência, e por sempre me incentivarem e apoiarem minhas decisões, almejando o melhor para mim e para meu irmão.

Ao meu irmão, Pedro Henrique, por todo carinho, paciência, disposição e amizade.

Ao meu namorado, Rubens Miguel por sempre apoiar e incentivar meus sonhos, compreender minhas ausências, e por me dar sempre palavras de ânimo e encorajamento. Agradeço também por todo amor, carinho, paciência, e companheirismo.

À minha orientadora, Prof^{ra}. Dr^a. Maria Cristina Roque Barreira pela confiança em meu trabalho, por me incentivar a sempre ir em frente, por toda atenção, carinho e inúmeros ensinamentos.

Ao meu co-orientador e amigo Dr. Thiago Aparecido da Silva pela confiança em mim depositada, por ter acreditado no meu potencial e por todas as oportunidades que me deu. Agradeço também por toda paciência, incentivo, por sempre estar presente, e por sua imensurável ajuda durante toda essa jornada. Exemplo de profissional e pessoa que tenho como referência.

À minha querida amiga Caroline Rezende, pela constante ajuda e disposição na execução deste trabalho. Por sua ótima companhia dentro e fora do laboratório, tornando essa trajetória mais agradável e descontraída.

Às amigas Érica e Patrícia Vendrusculo, por todo carinho, disposição, e auxílio para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Fabrício, Nayla, Livia, Fausto e Marcel, pelo constante apoio durante a realização deste trabalho, sempre dispostos ajudar com sugestões para aprimorá-lo.

Aos amigos de laboratório Sandra, Relber, Rafael, Flávia, e Sandro por contribuírem direta ou indiretamente nas discussões dos ensaios experimentais e pela convivência diária.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular, em especial a Gabriela, Joana, Maria Helena e ao sr. Domingos.

Aos órgãos financiadores FAPESP e CAPES, facilitadores da implantação e fechamento do estudo.

Aos examinadores do trabalho pela contribuição no aperfeiçoamento dessa dissertação.

Aos meus queridos amigos que embora não participaram diretamente deste trabalho, foram essenciais durante essa jornada, representando uma segunda família para mim: Rebeca, Dona Valéria; D. Adriana, Pr. Daniel Rodrigo e sua esposa D. Priscila, D. Duda, Sr. Paulo, D. Maria Santana, D. Graça, D. Selma, D. Natalina, Wiliam, D. Bel, Sr. Ivan, D. Cláudia e a todo pessoal do Grupo da Saúde.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

OLIVEIRA-BRITO, P. K. M. **A atividade imunomoduladora de ArtinM sobre o curso da infecção por *Cryptococcus gattii***. 2018. 147p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As infecções fúngicas invasivas são um problema global em saúde pública que acometem milhões de vidas anualmente. Entre os principais gêneros causadores dessas doenças, a espécie *Cryptococcus gattii* destaca-se por acometer indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos. Esse patógeno atua no bloqueio da diferenciação das células T *helper* (Th) 1 (Th1) e 17 (Th17) através da atenuação da resposta pró-inflamatória no tecido pulmonar. Em vista da capacidade imunomoduladora de ArtinM em induzir uma resposta imunológica Th1 e Th17 através da indução da produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos (APCs), e pelo efeito da lectina em células T CD4⁺, esse efeito imunomodulador de ArtinM promoveu o controle da infecção por *P. brasiliensis* e *C. albicans*. Dessa forma, investigamos os efeitos da administração profilática ou terapêutica de ArtinM no controle da infecção experimental por *C. gattii*. Constatamos que a infecção por *C. gattii* rapidamente progride no tecido pulmonar, assim como há uma disseminação completa para o coração, fígado, rim, baço, cérebro e sangue após 21 dias de infecção. Na análise do pulmão, o perfil citocínico apresentou baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias, e observamos um aumento na expressão relativa dos marcadores de polarização para o perfil M2 (Arginase-1 e YM-1), em todo período analisado. Visto a capacidade reguladora do *C. gattii* sobre o sistema imunitário do hospedeiro, avaliamos o efeito da administração profilática de ArtinM sobre o curso dessa infecção. Ao longo de 42 dias de infecção, o grupo tratado com ArtinM apresentou uma redução da carga fúngica pulmonar nos dias 28 e 35 pós-infecção, e os níveis de IFN- γ , IL-17 e TNF- α aumentaram significativamente no grupo ArtinM. Esse efeito imunomodulador da administração profilática de ArtinM sobre o modelo de infecção experimental por *C. gattii* levou-nos a avaliar o efeito da administração terapêutica de ArtinM no curso dessa infecção. Essa nova proposta de aplicação de ArtinM resultou na redução da carga fúngica pulmonar de *C. gattii* após 21 dias de infecção, comparado com o grupo controle. A administração terapêutica de ArtinM foi capaz de elevar o número absoluto de neutrófilos e linfócitos no sangue periférico dos animais infectados, porém os níveis de citocinas não diferiram entre os grupos ArtinM e controle. Além disso, o grupo tratado com ArtinM apresentou menor frequência de células T CD4⁺ no baço. Diante do efeito imunomodulador a administração profilática ou terapêutica de ArtinM que promoveu um controle parcial da infecção por *C. gattii*, partimos para a associação desse agente imunomodulador com o antifúngico

Fluconazol. Verificamos que os animais tratados com ArtinM em associação com fluconazol também apresentaram uma redução da carga fúngica pulmonar em comparação ao grupo controle, indicando que ArtinM é passível de ser associada com a terapia convencional antifúngica. Portanto, nossos dados evidenciaram que a atividade imunomodulatória de ArtinM, através da administração profilática ou terapêutica, foi evidenciada no curso da infecção por *C. gattii* e favoreceu a imunidade do hospedeiro promovendo uma redução parcial da carga fúngica pulmonar.

Palavras-chave: Lectinas; ArtinM; *Cryptococcus gattii*; Imunomodulação; Reconhecimento de carboidrato.

ABSTRACT

OLIVEIRA-BRITO, P. K. M. **The immunomodulatory activity of ArtinM on the course of *Cryptococcus gattii* infection.** 2018. 147p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Invasive fungal diseases are a global public health problem, that affects millions of individuals each year. Among the species that cause these diseases, *Cryptococcus gattii* is a major because affects immunosuppressed and immunocompetent individuals. *C. gattii* regulates the differentiation of helper (Th) T cells 1 (Th1) and 17 (Th17) by attenuating the proinflammatory response in the lungs. We know that the immunomodulatory capacity of ArtinM to induce the Th1 and Th17 immune response through IL-12 production by antigen presenting cells (APCs) and the CD4⁺ T cells activation by direct effect of ArtinM, these activities of ArtinM promoted the control of *P. brasiliensis* and *C. albicans* infection. Thus, we investigated the effects of prophylactic or therapeutic administration of ArtinM in the control of *C. gattii* infection. We found that *C. gattii* infection rapidly increase in the lungs and disseminate to the heart, liver, kidney, spleen, brain and blood after 21 days of infection. In the lung analysis, the cytokine profile showed low levels of proinflammatory cytokines and we observed an increase in the relative expression of the polarization markers for the M2 macrophages (Arginase-1 and YM-1) for all period. Given the regulatory ability of *C. gattii* on the host immune response, we evaluated the effect of prophylactic administration of ArtinM on the course of *C. gattii* infection. During 42 days of infection, the ArtinM-treated group had a reduction in the pulmonary fungal burden on days 28 and 35 post-infection, and levels of IFN- γ , IL-17 and TNF- α were significantly increased in the ArtinM group. This immunomodulatory effect of prophylactic administration of ArtinM on the *C. gattii* infection led us to evaluate the effect of the therapeutic administration of ArtinM on the course of this infection. This new strategy for the ArtinM administration promoted a reduction in the lung fungal burden of *C. gattii* after 21 days of infection compared to control group. Therapeutic administration of ArtinM was able to increase the absolute number of neutrophils and lymphocytes in the peripheral blood of infected mice, but the cytokine levels did not differ between the ArtinM and control groups. In addition, the ArtinM-treated group showed decrease of the CD4⁺ T cell frequency in the spleen. Considering the immunomodulatory effect, the prophylactic or therapeutic administration of ArtinM promoted a partial control of *C. gattii* infection, and instigate us to investigate the association of ArtinM and Fluconazole. We found that the treatment with ArtinM in combination with fluconazole also promoted a reduction in the pulmonary fungal burden, which suggested that ArtinM works well in

association with antifungal drugs. Therefore, our data showed that the immunomodulatory activity of ArtinM, via prophylactic or therapeutic administration, was evidenced in the course of *C. gattii* infection and contributed the host immune response to reduce the lung fungal burden.

Keywords: Lectin; ArtinM; *Cryptococcus gattii*; Immunomodulation; Carbohydrate recognition.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	15
1. Impacto epidemiológico das doenças fúngicas e os principais gêneros causadores dessas doenças no mundo.....	16
2. Aspectos gerais do gênero <i>Cryptococcus</i>	17
3. Descrição morfológica, epidemiológica e do genótipo de <i>Cryptococcus gattii</i>	18
4. Fatores de virulência mais relevantes do <i>C. gattii</i>	20
5. Resposta imunológica efetora frente a infecções fúngicas invasivas	21
6. Principais perfis da resposta imunológica efetora do hospedeiro frente a infecção por <i>C. gattii</i>	22
7. Tratamento convencional frente às infecções fúngicas invasivas.....	25
8. Recentes abordagens imunoterápicas no combate da infecções por <i>C. gattii</i>	27
9. Utilização de ArtinM no contexto de novas estratégias terapêuticas frente a infecção por <i>C. gattii</i>	28
OBJETIVOS	32
1. Objetivo geral	33
2. Objetivos específicos	33
MATERIAIS E MÉTODOS	34
1. Animais	35
2. Purificação da lectina ArtinM.....	35
3. Infecção com <i>Cryptococcus gattii</i>	35
4. Protocolo de administração profilática de ArtinM	36
5. Protocolo do tratamento terapêutico com ArtinM	36
6. Protocolo de tratamento terapêutico com ArtinM em associação com antifúngico convencional	37

7.	Avaliação da curva de sobrevida na infecção por <i>C. gattii</i>	37
8.	Quantificação da carga fúngica.....	38
9.	Dosagem das citocinas	38
10.	Mensuração dos níveis de atividade de mieloperoxidase (MPO).....	38
11.	Leucograma	39
12.	Citometria	39
13.	Quantificação dos fatores de transcrição por qRT-PCR.....	40
14.	Análise estatística	40
	RESULTADOS	41
1.	Capítulo I	42
1.1.	Determinação da curva de sobrevida e mensuração da carga fúngica pulmonar causada pela infecção por <i>C. gattii</i>	43
1.2.	Quantificação dos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias no tecido pulmonar durante o curso da infecção por <i>C. gattii</i>	44
1.3.	Mensuração dos níveis de expressão relativa de marcadores associados à polarização de macrófagos alveolares	45
2.	Capítulo II	47
2.1.	Avaliação da carga fúngica pulmonar e cerebral dos animais tratados profilaticamente com ArtinM e infectados com <i>C. gattii</i>	48
2.2.	Leucograma do sangue periférico, atividade de MPO e níveis citocínicos no tecido pulmonar	49
3.	Capítulo III.....	51
	Título: Efeitos da administração terapêutica de ArtinM no curso da	51
3.1.	Avaliação no tecido pulmonar e cerebral da carga fúngica de <i>C. gattii</i> após o tratamento terapêutico com ArtinM	52
3.2.	Análise do perfil leucocitário, quantificação da atividade de MPO e mensuração dos níveis citocínicos.....	52
3.3.	Determinação da frequência de células T na suspensão de células esplênicas e pulmonares nos animais infectados com <i>C. gattii</i> e tratados com ArtinM.....	54

3.4. Avaliação da carga fúngica dos camundongos tratados de forma terapêutica com ArtinM em associação com Fluconazol após a infecção com <i>C. gattii</i>	55
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
APÊNDICES	87
1. Apêndice I	88
2. Apêndice II	108
ANEXOS	144
1. Anexo I	145

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Impacto epidemiológico das doenças fúngicas e os principais gêneros causadores dessas doenças no mundo

As doenças infecciosas continuam sendo um importante problema global em saúde pública (Cohen, 2000). Mesmo diante dos esforços para controle e prevenção, em 2016 essas doenças foram responsáveis por mais de 4,3 milhões de mortes (Who, 2018). Entre os determinantes globais dessas doenças, as infecções fúngicas acometeram entre os anos de 2014 a 2017 mais de 5,7 bilhões de pessoas, o que corresponde a mais de 80% da população mundial (Bongomin *et al.*, 2017). Anualmente, cerca de 1,6 milhões de vidas são comprometidas por infecções fúngicas graves, índice superior à malária e semelhante ao número de mortes por tuberculose (Editorial, 2017).

No ano de 2014, segundo relatório do Fundo Global de Inovação para Doenças Negligenciadas (G-FINDER), US\$ 3.377.000.000 foram investidos em pesquisa e desenvolvimento para 35 doenças negligenciadas (Moran *et al.*, 2015; Rodrigues, 2016). Entre as doenças com maiores índices de investimentos estavam a malária e a tuberculose, com 35,5% do investimento total, enquanto a criptococose, causada pelo fungo *Cryptococcus* spp e com alto impacto na saúde pública global, recebeu menos de 0,5% (US\$ 5,8 milhões) do financiamento global em pesquisa e desenvolvimento (Moran *et al.*, 2015; Rodrigues, 2016). No entanto, mesmo as infecções fúngicas representando uma das principais causas de morbidade e mortalidade mundial, ainda hoje permanecem mundialmente negligenciadas pelas políticas públicas de saúde (Byrnes, E. J. *et al.*, 2011; Stop neglecting fungi, 2017; Editorial, 2017; Hadrich e Ayadi, 2018).

Outro fator que coopera no aumento de infecções fúngicas é o crescente número de indivíduos imunocomprometidos devido a contaminação pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o quadro de imunossupressão em pacientes transplantados e com câncer, e o alargamento do topo da pirâmide etária mundial (Dixit, Ashwin *et al.*, 2009). Além disso, indivíduos saudáveis também têm sofrido com surtos contínuos causados por fungos patogênicos, pois há um aumento no deslocamento de pessoas entre os continentes e as mudanças climáticas no globo têm sido drásticas (Gow e Netea, 2016; Vallabhaneni *et al.*, 2016).

Segundo pesquisas realizadas pelo GAFFI (*Global Action Fund for Fungal Infections*), os principais gêneros ou espécies de fungos com importância na saúde pública global referente às últimas décadas, foram: *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis jirovecii*, e *Histoplasma capsulatum* (Bongomin *et al.*, 2017; Denning, 2017). Destaca-se os gêneros *Candida* e *Aspergillus* como os maiores causadores de doenças fúngicas entre os pacientes imunossuprimidos (Dixit, Ashwin *et al.*, 2009; Bongomin *et al.*, 2017), e o gênero *Cryptococcus* com frequente acometimento de pacientes infectados pelo vírus HIV. No ano de 2006, foram relatados globalmente cerca de um milhão de casos de meningite criptocócica, sendo que 625.000 mortes ocorreram em pacientes HIV positivo (Park *et al.*, 2009; O'halloran *et al.*, 2017) e 73% dessas mortes ocorreram na África Subsaariana. No entanto, algumas espécies de *Cryptococcus*, em especial *C. gattii*, têm acometido de maneira crescente os indivíduos saudáveis (O'halloran *et al.*, 2017).

2. Aspectos gerais do gênero *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus*, pertencente ao filo Basidiomycota de fungos filamentosos, foi descrito pela primeira vez em 1894 por Otto Busse como um patógeno humano (Busse, 1894; May *et al.*, 2015; Campuzano e Wormley, 2018), e posteriormente caracterizado como causador da infecção fúngica sistêmica denominada criptococose. Atualmente, 100 espécies do gênero *Cryptococcus* são conhecidas (Illnait-Zaragozi *et al.*, 2014) e, duas delas, *Cryptococcus neoformans* abrangendo var. *grubii* (sorotipo A) e var. *neoformans* (sorotipo D); e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C) são os principais causadores de criptococose em humanos e animais (J. e Ashok, 2006). Essas variantes do gênero *Cryptococcus* foram posteriormente categorizadas nas espécies *C. neoformans* e *C. gattii* de acordo com a caracterização bioquímica, ecológica, epidemiológica e aspectos clínicos. Outra classificação variacional adotada para *C. neoformans* e *C. gattii* baseou-se na distinção por genótipo molecular, o que permitiu a genotipagem de *C. neoformans* em oito grupos (VNI, VNB, VNII e VNIV) e de *C. gattii* em outros quatro genótipos (VGI, VGII, VGIII e VGIV), sendo baseado em múltiplos fragmentos de genes (Bovers *et al.*, 2008; Chaturvedi e Chaturvedi, 2011). Deve-se ressaltar que a distinção entre essas espécies pelo genótipo molecular é reflexo da influência de fatores ambientais, climáticos e da relação patógeno-hospedeiro que permitiram a dispersão dessas espécies (Kwon-Chung e Bennett, 1984; Boekhout *et al.*, 2001; Chaturvedi e Chaturvedi, 2011).

C. neoformans caracteriza-se como um patógeno oportunista, cosmopolita, causando infecções potencialmente fatais no sistema nervoso central (SNC) em indivíduos imunocomprometidos, sendo considerado o principal agente causador da meningite fúngica relatada em adultos portadores do vírus HIV no mundo e na África Subsaariana (Rajasingham *et al.*, 2017; Skolnik *et al.*, 2017). Em relação ao *C. gattii*, este é caracterizado como um patógeno emergente, endêmico e com elevada probabilidade de acometer indivíduos imunocompetentes (Skolnik *et al.*, 2017). A distribuição geográfica de *C. gattii* abrange as áreas tropicais, subtropicais e zonas temperadas do mundo (Dixit, Ashwin *et al.*, 2009).

3. Descrição morfológica, epidemiológica e do genótipo de *Cryptococcus gattii*

A espécie *Cryptococcus gattii* encontra-se normalmente na forma leveduriforme, exibindo formato esférico ou oval, parede celular com duplo contorno e diâmetro que varia de 5 a 12 µm (Chayakulkeeree e Perfect, 2006). Sua reprodução ocorre de forma assexuada, através de brotamentos, ou sexuada, induzida pela alteração nas condições ambientais ou manipulação laboratorial, podendo observar diferentes formas morfológicas como clamidósporos, hifas e pseudo-hifas (Illnait-Zaragozi *et al.*, 2014). Essas formas variantes de *C. gattii* não são capazes de infectar seres humanos (Neilson *et al.*, 1981; May *et al.*, 2015).

Diversos estudos demonstram que a presença de *C. gatti* associa-se estritamente à vegetação, como as árvores de eucalipto, particularmente *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus tereticornis* (Chaturvedi *et al.*, 2005), além de árvores de outras espécies, como *Prunus dulcis*, *Cassia fistula* e *Pseudotsuga menziesii* (Severo *et al.*, 1999; Koh *et al.*, 2010). *C. gattii* tem predileção pela superfície de plantas ricas em myo-inositol (Xue *et al.*, 2007) e há evidências de que esse fungo persista por longos períodos em tecidos de plantas (Huerfano *et al.*, 2001) e madeira envelhecida, fato propiciado pela sua capacidade de produzir lacase que favorece essa colonização (Grover *et al.*, 2007; Baltazar e Ribeiro, 2008). Contudo, mesmo sendo encontrado majoritariamente na vegetação, diversos estudos relatam a presença de isolados de *C. gattii* em fezes de aves (Abegg *et al.*, 2006) e também em outros sítios ambientais (Kidd *et al.*, 2004).

O primeiro relato do isolamento de *C. gattii* como causador da criptococose em humanos foi descrito em 1970, sendo um paciente leucêmico de origem Africano com relato de infecção por um variante da espécie *C. neoformans*, denominado *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Vanbreuseghem e Takashio, 1970). Os subsequentes relatos sobre *C.*

gattii atingiram as zonas climáticas tropical e subtropical (Kwon-Chung e Bennett, 1984) e, em seguida, essa espécie foi encontrada em zonas temperadas. A expansão da infecção por *C. gatti* para novas áreas geográficas foi estabelecida em 1999, quando um crescente número de casos de criptococose foi observado em British Columbia, no Canadá, relacionados ao genótipo VGII (Stephen *et al.*, 2002; Kidd *et al.*, 2004; Fyfe *et al.*, 2008; Eleni *et al.*, 2010). Paralelamente, uma incidência alarmante de infecção por *C. gattii* foi verificada no período de 1999 a 2007 nos Estados Unidos da América, com destaque para os estados de Washington e Oregon (Macdougall e Fyfe, 2006; Upton *et al.*, 2007). Dentre as diversas regiões afetadas pelos vários grupos de *C. gattii*, Austrália e Papua Nova Guiné são áreas endêmicas com prevalência do genótipo VGI (Campbell *et al.*, 2005). Já a incidência de *C. gattii* na América do Sul tem se mostrado alta e, no caso do Brasil, há o predomínio do grupo VGII que corresponde à metade dos isolados. Além disso, há relatos de criptococose causado por *C. gattii* em diversos países da Ásia e África, bem como de casos esporádicos na Europa (Harris *et al.*, 2012).

A infecção por *C. gattii* é considerada primária, uma vez que o patógeno tem predileção por indivíduos imunocompetentes e saudáveis (Sorrell, 2001; Basnayake *et al.*, 2018). Os tipos moleculares VGI e VGII de *C. gattii* são responsáveis pela maioria dos episódios de infecção primária (Chan *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014), enquanto os tipos moleculares VGIII e VGIV têm sido isolados principalmente em pacientes imunocomprometidos (Sorrell *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2000; Chaturvedi *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2010; Byrnes, E. J., 3rd *et al.*, 2011). A infecção humana por *C. gattii* ocorre principalmente via inalação de propágulos, esporos e/ou leveduras desidratadas, que apresentam um tamanho aproximado de 3 µm permitindo a deposição nos alvéolos pulmonares. Além do pulmão ser o órgão de entrada, o *C. gattii* tem alta predileção pelo tecido pulmonar que propicia a formação de criptococomas (Chen *et al.*, 2000; Eleni *et al.*, 2010; Byrnes e Marr, 2011; Basnayake *et al.*, 2018). No entanto, *C. gattii* pode disseminar para outros órgãos, como a pele, olhos, próstata e, principalmente, o sistema nervoso central (SNC) (Ruma-Haynes *et al.*, 2000; Sorrell, 2001; Perfect e Casadevall, 2002). Além disso, a infecção por *C. gattii* pode ocorrer ainda pela inoculação direta no trato gastrointestinal, transplante de tecidos infectados (Chayakulkeeree e Perfect, 2006) e inoculação direta na pele, em casos mais raros (Lingegowda *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2015). As manifestações clínicas iniciais da criptococose não são específicas e são dependentes da carga do inóculo infectante, do estado imunológico do hospedeiro e da virulência da cepa.

Para auxiliar na distinção entre a criptococose promovida pela espécie *C. gattii* ou *C. neoformans*, inicialmente é averiguado se o indivíduo acometido apresenta um quadro de imunossupressão, situação que favorece a infecção por *C. neoformans*. Em outra etapa, as amostras clínicas são rotineiramente plaqueadas em ágar padrão que permite o crescimento do *Cryptococcus* e, finalmente, a distinção segura entre *C. gattii* e *C. neoformans* é realizada através do inóculo em meio seletivo denominado Canavanina–glicina–azul de bromotimol. Nesse meio de cultivo, as colônias de *C. gattii* se tornam azuis enquanto o *C. neoformans* não altera a coloração do meio, uma vez que a mudança de cor do meio é baseada na assimilação de glicina e susceptibilidade à canavanina (Klein *et al.*, 2009). Na prática clínica a sorotipagem de *C. gattii* é pouco explorada, porém essa caracterização é preconizada para os estudos epidemiológicos (Mcmullan *et al.*, 2013).

4. Fatores de virulência mais relevantes do *C. gattii*

Dentre os principais fatores de virulência identificados em *Cryptococcus sp.*, a cápsula polissacarídica associada à parede fúngica atua como um fator chave de virulência (Li e Mody, 2010), uma vez que é capaz de prevenir a fagocitose e permitir que o organismo contorne a resposta imune inata do hospedeiro (Del Poeta, 2004). Essa estrutura compõe-se primariamente de glucuronoxilomanana (GXM), que pode interferir diretamente na função dos linfócitos T (Syme *et al.*, 2002), induzir a expressão de FasL em macrófagos causando a morte nas células T próximas (Monari *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2014), além de afetar a proliferação celular de macrófagos e desencadear apoptose (Ben-Abdallah *et al.*, 2012; Coelho *et al.*, 2014); proporções menores de glucuronoxilomanogalactana (GXMGal), que podem induzir a desregulação de citocinas e apoptose de linfócitos T (Eva *et al.*, 2006), além de regular negativamente a resposta de células T (N. *et al.*, 2008; Vecchiarelli *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2014); e manoproteínas que correspondem a menos de 1% do peso capsular, e além de apresentar função imunogênica (Cherniak e Sundstrom, 1994; Teixeira *et al.*, 2014), podem desencadear respostas imunes protetoras em camundongos (Mansour *et al.*, 2004), estão envolvidas na ativação de células T (Huang *et al.*, 2002) e também na adesão do patógeno com células epiteliais pulmonares (Teixeira *et al.*, 2014). A espessura e a composição da cápsula polissacarídica pode variar entre as cepas de *C. gattii* em um processo denominado “*phenotypic switching*”, fato que interfere na resposta imune do hospedeiro (Jain *et al.*, 2006; Lupo *et al.*, 2008).

Outros fatores de virulência são os produtos oriundos da sinalização de lacase, como: a melanina, que apresenta capacidade em se ligar a antibióticos, conferindo resistência antifúngica (D. e Arturo, 2003), além absorver a radiação eletromagnética fornecendo proteção ao microorganismo contra radiação solar (Dadachova *et al.*, 2008); a fosfolipase B (Pb1) com capacidade de desestabilização da membrana celular (Ghannoum, 2000; Chrisman *et al.*, 2011); a urease, capaz de alterar o pH microambiental, protegendo contra o estresse oxidativo e conferindo sobrevivência dentro do fagolisossomo (Coelho *et al.*, 2014); e as metaloproteinases, com atuação na degradação das proteínas do hospedeiro (O. *et al.*, 2016), entre outros fatores que atuam na invasão do tecido hospedeiro. Em contribuição a esses fatores, a superóxido dismutase (Sod), manitol e trealose atuam como antioxidantes, neutralizando moléculas imunes inatas do hospedeiro e prevenindo o dano oxidativo à célula (Kwon-Chung e Rhodes, 1986; Ma *et al.*, 2009; Ma e May, 2009; Seider *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2014). A sobrevivência e a persistência no hospedeiro são facilitadas pelo fato de *C. gattii* proliferar a 37°C (Sorrell, 2001; Kraus *et al.*, 2004) e tolerar baixos pHs e altos níveis salinos (Kidd *et al.*, 2007). Além disso, *C. gattii* provavelmente apresenta fatores de virulência adicionais que permitem a infecção em hospedeiros saudáveis; no entanto, a natureza exata desses fatores ainda está sendo estudada. (Skolnik *et al.*, 2017)

5. Resposta imunológica efetora frente a infecções fúngicas invasivas

A fim de preservar a integridade epitelial pulmonar e prevenir a colonização fúngica, o hospedeiro desenvolveu uma série de mecanismos imunológicos no tecido pulmonar para impedir o estabelecimento de infecções (Wiesner e Klein, 2017). As células epiteliais em conjunto com a secreção de muco e peptídeos antimicrobianos atuam como importante barreira física e química contra a invasão do tecido por partículas inaladas, sendo um mecanismo inicial crítico no impedimento da propagação e colonização por diversos microorganismos (Wiesner e Klein, 2017). Porém, esses fatores podem ser insuficientes e a infecção fúngica pode se estabelecer no órgão alvo desencadeando a resposta imunitária do hospedeiro para conter o crescimento fúngico. Nesse contexto, as células que compõem a resposta imune inata do hospedeiro atuam como a primeira linha de defesa contra as infecções fúngicas invasivas (J. e S.; Brown, 2011; Jiang, 2016). A resposta imune inata é composta essencialmente por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DC), que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) específicos de fungos por meio de

receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (Romani, 2004; Brown, 2011; Jiang, 2016). Outro importante artifício na defesa contra infecções fúngicas invasivas é a produção pelo hospedeiro de fatores quimiotáticos como peptídeos derivados da ativação da via do complemento, leucotrienos, quimiocinas e citocinas, todos esses elementos visam o recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção. Ainda nos mecanismos utilizados pela resposta imune inata, os macrófagos têm papel fundamental na contenção da proliferação fúngica e no recrutamento de outros tipos celulares para o sítio da infecção (Feldman *et al.*, 2018). Além disso, os macrófagos polarizados para a via clássica, denominados de perfil M1, têm elevada atividade microbicida e fagocítica que atuam no controle de infecções por patógenos intracelulares. Os macrófagos M1 secretam elevados níveis de mediadores pró-inflamatórios que induzem a produção da citocina pró-inflamatória IFN- γ pelas células T, um dos tipos celulares da resposta imune adaptativa (Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994; Locati *et al.*, 2013; Elsegeiny *et al.*, 2018).

As células T CD4⁺ são outra frente da imunidade que desempenham um papel fundamental no controle das infecções fúngicas invasivas, em resposta aos fatores quimiotáticos e mediadores pró-inflamatórios (Blanco e Garcia, 2008). As células T CD4⁺ se diferenciam nos perfis T *helper* (Th) do tipo 1 (Th1) e 17 (Th17) que apresentem papel efetor essencial na montagem de uma resposta antifúngica protetora (Mencacci *et al.*, 2001; Romani, 2004; Dostert e Tschopp, 2007; Chai *et al.*, 2010; Elsegeiny *et al.*, 2018). Por outro lado, a persistência de uma resposta de perfil Th2, marcado pela presença de IL-4 e IL-10, compromete drasticamente a resposta imune celular do hospedeiro contra as infecções fúngicas invasivas, predispondo o hospedeiro a co-infecções graves (Mencacci *et al.*, 2001; Romani, 2004; Romani, 2011; Pikman e Ben-Ami, 2012; O'dea *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). Em adição a resposta imune celular, a participação de células B na produção de anticorpos opsonizantes frente às infecções fúngicas invasivas favorece a atividade fagocítica de células da imunidade inata (Bottazzi *et al.*, 2010; Romani, 2011; Casadevall e Pirofski, 2012; Conti *et al.*, 2018; Lenhard-Vidal *et al.*, 2018).

6. Principais perfis da resposta imunológica efetora do hospedeiro frente a infecção por *C. gattii*

No processo de infecção por *Cryptococcus* spp, a inalação da levedura ou de propágulos desidratados desse fungo podem ser detectados por macrófagos alveolares e

macrófagos infiltrantes, que são as primeiras células do sistema imunitário que reconhecem, englobam e iniciam a resposta imune anti-criptococcócica (Chayakulkeeree e Perfect, 2006; Campuzano e Wormley, 2018). Vários estudos demonstraram no modelo de infecção com *C. neoformans* que os PRRs, através dos macrófagos, além de serem sensores da etapa de infecção (Tanaka *et al.*, 2012) também desempenham um papel crucial no balanço entre o *clearance* e a disseminação fúngica (Campuzano e Wormley, 2018). Esse aumento na atividade microbicida dos macrófagos via PRRs está relacionada com a formação da plataforma do inflamossomo e com a produção de mediadores pró-inflamatórios (Nakamura *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015). A formação do fagossomo expõe o fungo a espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio, com destaque para a síntese de NO, que favorece na proteção contra a criptococose experimental (Aguirre e Gibson, 2000; Rivera *et al.*, 2002; Leopold Wager *et al.*, 2015; Sa *et al.*, 2017; Campuzano e Wormley, 2018). Além do papel protetor dos macrófagos, os neutrófilos e células dendríticas (DC) também podem promover o *killing* de *C. neoformans* opsonizado via mecanismos oxidativos e não oxidativos (Mambula *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2005; Wozniak e Levitz, 2008; Hole *et al.*, 2012; Campuzano e Wormley, 2018).

Em contraste ao *C. neoformans*, *C. gattii* é capaz de infectar indivíduos imunocompetentes o que sugere haver consideráveis diferenças na resposta imune frente a tais infecções, exigindo de *C. gattii* processos adicionais para subverter a atuação das células da imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (Gibson e Johnston, 2015). Células mononucleares do sangue periférico humano foram capazes de produzir altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-22, em resposta a infecção (Schoffelen *et al.*, 2013; Bielska e May, 2016), enquanto que no tecido pulmonar a resposta inflamatória é reduzida (Hoang *et al.*, 2004; Dixit, A. *et al.*, 2009; Okubo, Wakayama, *et al.*, 2013). O controle da resposta inflamatória pulmonar pode resultar do bloqueio das respostas Th1 e Th17, como verificado na infecção por *C. gattii*, por meio da atenuação funcional de DC e da expressão reduzida de quimiocinas pulmonares em hospedeiros imunocompetentes (Angkasekwina *et al.*, 2014). Esse efeito atenuador da resposta pró-inflamatória, está relacionado com um discreto infiltrado neutrofílico no pulmão dos hospedeiros infectados (Cheng *et al.*, 2009). O fato de *C. gattii* atenuar a função de DC pulmonares decorre do comprometimento de sua maturação que, por sua vez, é causada pelo bloqueio da liberação de TNF- α e quimiocinas (Huston *et al.*, 2013; Angkasekwina *et al.*, 2014). Esse ambiente favorece a evasão por *C. gattii* da resposta imune adaptativa, fato observado durante a infecção pelas cepas R265 e R272 (Huston *et al.*, 2013).

Outro componente que influencia na produção de citocinas específicas da imunidade inata refere-se aos diferentes PAMPs existentes na superfície de *C. gattii*. Dentre esses, os receptores Toll-like (TLR) 4 e 9 estão engajados na resposta citocínica do hospedeiro para *C. gattii*, enquanto TLR2 não tem envolvimento na indução de citocinas pelo hospedeiro, como já descrito para *C. neoformans* (Schoffelen *et al.*, 2013). Além disso, Costa e colaboradores também relataram a importância da microbiota do hospedeiro em resposta à infecção por *C. gattii*, pelo fato de camundongos *germ-free* apresentarem um atraso na resposta imunológica efetora, situação caracterizada pelos níveis reduzidos de mediadores pró-inflamatórios e baixo recrutamento de células para o pulmão (Costa *et al.*, 2016). Os estudos da resposta imune inata do hospedeiro na criptococose causada por *C. gattii* tem descrito a importância de outros tipos celulares, como o efeito citotóxico direto sobre esse patógeno pelas células natural killer (NK), através da exocitose de grânulos líticos contendo perforina (Islam *et al.*, 2013). Nesse sentido, estudos demonstraram que camundongos C57BL/6, infectados com a cepa R265 de *C. gattii*, tiveram marcante proliferação das leveduras de localização intra-alveolar, devido a resposta reduzida de macrófagos (Okubo, Tochigi, *et al.*, 2013; Okubo, Wakayama, *et al.*, 2013).

Há uma peculiaridade entre as espécies *C. gattii* e *C. neoformans* relacionada ao maior crescimento de *C. neoformans* no interior de macrófagos comparado ao *C. gattii* (Voelz *et al.*, 2014), com exceção dos genótipos hiperproliferativos de *C. gattii* isolados do surto da Ilha de Vancouver (Ma *et al.*, 2009) e de lugares específicos da América do Norte (Byrnes *et al.*, 2010; Springer *et al.*, 2014). A taxa de proliferação intracelular dessas espécies de *Cryptococcus* é dependente dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos macrófagos (Voelz *et al.*, 2014), uma vez que a inibição de ROS em macrófagos bloqueou o aumento da proliferação intracelular da cepa VGIIa (isolado do surto da Ilha de Vancouver) (Gibson e Johnston, 2015). O mecanismo pelo qual a taxa de proliferação do patógeno depende da presença de ROS ainda necessita de maior abordagem, mas supõe-se que esteja associado na modulação do fagossomo e nas alterações da morfologia e expressão gênica relacionada a atividade mitocondrial do patógeno (Ma *et al.*, 2009; Voelz *et al.*, 2014; Gibson e Johnston, 2015). Tais alterações repercutem na proteção de *C. gattii* contra as espécies reativas de oxigênio oriundas das células fagocíticas (Ma *et al.*, 2009; Ma e May, 2009; 2010; Voelz *et al.*, 2014). Esses fatores envolvendo as alterações mitocondriais de *C. gatti* trata-se de uma forma de escape frente a resposta imunitária do hospedeiro, com o envolvimento do mecanismo “*division of labour*”. Nessa linha, considera-se que uma certa proporção de células fúngicas adapta-se a um estado quiescente, que resiste a um nicho intracelular,

enquanto a população remanescente de células fúngicas, ainda que vulnerável, prolifera rapidamente, favorecendo a supressão da imunidade do hospedeiro e a ampliação da população de *C. gattii* (Voelz et al., 2014).

O sistema complemento apresenta um importante papel no controle da carga fúngica de *C. gattii*, fato evidenciado por camundongos deficientes de C1q, C3 ou depleção completa do sistema complemento, que apresentaram uma exacerbação da carga fúngica (Mershon *et al.*, 2009). Outro componente que interfere na proteção do hospedeiro frente a infecção por *C. gattii*, relaciona-se com os títulos de autoanticorpos específicos para GM-CSF que atuam como um fator de risco para o hospedeiro após a infecção por *C. gattii* (Saijo *et al.*, 2014). A molécula GM-CSF desempenha um papel crítico na resposta imunológica do hospedeiro por regular a função dos fagócitos, macrófagos pulmonares e DC, porém essas funções são interrompidas pelos autoanticorpos específicos para GM-CSF. Em adição a esse achado, os níveis reduzidos de GM-CSF e TNF- α podem prejudicar a montagem da resposta imune celular contra a infecção por *C. gattii* (Huston *et al.*, 2013; Saijo *et al.*, 2014). Recentemente, tem-se discutido a capacidade de *C. neoformans* e *C. gattii* em induzir a genotoxicidade em PBMCs, com danos ao DNA e, no caso da infecção por *C. gattii*, a indução de altos níveis de NO e danos ao DNA promoveram um estresse oxidativo ao hospedeiro (Andrade *et al.*, 2018).

Dessa forma, o entendimento da imunopatologia da criptococose causada pela infecção por *C. gattii* de indivíduos saudáveis é necessário a fim de avançar no campo de diagnóstico, desenvolvimento de drogas e imunoterapias eficientes.

7. Tratamento convencional frente às infecções fúngicas invasivas

No contexto da utilização de drogas antifúngicas, os compostos mais comumente utilizados para infecções fúngicas invasivas englobam três principais classes: os polienos, os azoles, e as equinocandinas. Na classe dos polienos, as drogas mais utilizadas são a nistatina, pimaricina e a anfotericina B. Elas abrangem um amplo espectro de atividade fungicida tanto contra fungos leveduriformes quanto filamentosos, atuando na formação de poros na parede celular fúngica a partir da extração do ergosterol da membrana lipídica, essencial na composição da membrana plasmática (Enoch *et al.*, 2006; Mohr *et al.*, 2008; Robbins *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2017). Outros estudos propõem um mecanismo de ação adicional, baseado na ligação ao ergosterol levando à transferência de elétrons na membrana celular, geração de

espécies reativas de oxigênio, e levando a célula fúngica a um estresse oxidativo (Gray *et al.*, 2012; Kovacic e Cooksy, 2012; Chang *et al.*, 2017).

Na classe dos azoles temos o fluconazol, o itraconazol, o cetoconazol, o posaconazol e o sulfato de isavuconazonio, este último aprovado em 2015 pelo FDA. Essa classe atua na inibição de enzimas envolvidas na biossíntese de ergosterol dependentes do citocromo P450, uma vez que a membrana celular fúngica é rica em ergosterol, diferente da membrana celular dos mamíferos, rica em colesterol, favorecendo assim a seletividade frente a fungos, e impedindo o crescimento e a divisão celular. (Enoch *et al.*, 2006; Shapiro *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2017).

Já as equinocandinas, a mais nova classe de agentes antifúngicos, abrangem a anidulafungina, micafungina e caspofungina. Esses compostos inibem a síntese de β -1,3-D-glucano, constituinte estrutural da parede celular de fungos, dessa forma atuam em uma estrutura única de fungos, sendo atualmente os antifúngicos mais seguros disponíveis (Kofla e Ruhnke, 2011; Shapiro *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2014; Patil e Majumdar, 2017).

Há também drogas antifúngicas que bloqueiam a síntese de DNA e RNA, tendo somente a 5-fluorocitosina aprovação para uso clínico (Enoch *et al.*, 2006; Shapiro *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2014; Nett e Andes, 2016). No caso de meningite criptocócica, o uso de 5-fluorocitosina tem sido associado com anfotericina B (Mohr *et al.*, 2008; Nett e Andes, 2016), ou caso a 5-fluorocitosina não estiver disponível ou não for tolerada pelo paciente, tem-se associado anfotericina B com fluconazol. Essas associações têm apresentados efeitos positivos frente a infecção (Perfect *et al.*, 2010; Krysan, 2015; Chang *et al.*, 2017). Todavia, a utilização isolada de drogas antifúngicas apresenta inúmeras limitações e efeitos colaterais ao hospedeiro. A maioria dos agentes tóxicos aos fungos também apresentam certa toxicidade ao hospedeiro em decorrência das semelhanças na organização celular, podendo causar desde febres, calafrios, náuseas, diarreia, vômitos e hipotensão, até efeitos colaterais mais graves como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (Enoch *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2017).

Além do uso de drogas antifúngicas, tem-se adotado o tratamento com citocinas recombinantes, como interferon-gama (IFN- γ) (Kullberg *et al.*, 1993; Lutz *et al.*, 2000; Jarvis *et al.*, 2012; Delsing *et al.*, 2014; Kullberg *et al.*, 2014); e IL-12 que contribuem na indução de uma resposta efetora do tipo Th1 (Clemons *et al.*, 1994; Roilides *et al.*, 1998; Flores-Garcia *et al.*, 2015). A aplicação de fatores estimuladores de colônias, como o G-CSF e GM-CSF, mostraram-se eficaz na prevenção de infecções fúngicas em imunocomprometidos, além disso, essa estratégia apresenta potencial na utilização como adjuvantes no delineamento de terapias antifúngicas (Gellin *et al.*, 2001; Kullberg *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2015; Goldman *et*

al., 2016). No entanto, o tratamento com GM-CSF pode ocasionar um efeito tóxico devido a indução exacerbada de mediadores pró-inflamatórios (Bodey *et al.*, 1993). Nesse sentido, a administração de IL-12 também pode acarretar efeitos deletérios na resposta imunitária do hospedeiro frente as infecções fúngicas invasivas (Toren *et al.*, 1997; Gellin *et al.*, 2001).

Em decorrência das limitações envolvendo o tratamento com drogas antifúngicas e a administração das formas recombinantes de citocinas e fatores de crescimento, diversas abordagens genômicas e transcriptômicas têm buscado o desenvolvimento e compreensão de novas terapias antifúngicas (Monk e Cannon, 2002; Brown *et al.*, 2007; Romani, 2011).

8. Recentes abordagens imunoterápicas no combate da infecções por *C. gattii*

Tendo em vista alguns efeitos indesejáveis observados mediante abordagens terapêuticas com a utilização de citocinas, fatores de crescimento ou a administração isolada de drogas antifúngicas, novas propostas baseadas em tratamentos imunoterápicos têm sido avaliadas em modelos de infecções fúngicas invasivas, como no caso da paracoccidioidomicose (PCM). Nesse sentido, estudos têm demonstrado que a administração de adjuvantes, como a solução completa de Freund ou monofosforil lipídeo A (MPLA), induzem uma resposta efetora Th1 contra a PCM (De Oliveira *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2016; Landgraf *et al.*, 2017). Outra importante estratégia imunoterápica frente a PCM considerou a aplicação de vacinas de DNA para codificar a glicoproteína P10 de *P. brasiliensis*, estratégia terapêutica que promoveu uma significativa redução da carga fúngica pulmonar, tanto no protocolo de tratamento profilático como no terapêutico (Rittner *et al.*, 2012).

Em relação a criptococose, há poucos relatos na literatura que conseguiram estabelecer um protocolo imunoterápico eficiente. Para o modelo de infecção experimental por *C. neoformans*, desenvolveu-se um protocolo vacinal para a indução da produção de anticorpos específicos para componentes fúngicos que resultou em uma resposta imunitária parcialmente protetora contra a criptococose (Devi, 1996; Chow e Casadevall, 2011). Em 2014, Chaturvedi e colaboradores realizaram a imunização dos animais com proteínas da parede celular do *C. gattii* associadas às proteínas da cápsula do fungo, essa situação promoveu uma redução significativa da carga fúngica pulmonar e aumento da sobrevivência de animais após a infecção por *C. gattii* (Chaturvedi *et al.*, 2014). Em outro estudo, Ueno e colaboradores desenvolveram um protocolo de imunoterapia contra a infecção por *C. gatii*

baseada na transferência adotiva de DC pulsadas com uma cepa acapsular de *C. gattii* (Δ cap60), essa estratégia terapêutica resultou na redução abrupta da carga fúngica pulmonar após 14 dias de infecção (Ueno *et al.*, 2015; Ueno *et al.*, 2017). Estudo mais recente, verificaram que partículas de glucano (GP) carreando as proteínas recombinantes Cda1 e Cda2 de *Cryptococcus neoformans* foram utilizadas como ferramenta de vacinação de camundongos C57BL/6. Nessa proposta de tratamento, os autores verificaram uma redução da carga fúngica pulmonar e prolongamento da sobrevivência dos animais submetidos ao tratamento e infectados com *C. neoformans* ou *C. gattii* (Specht *et al.*, 2017).

Em outras abordagens imunoterápicas, a associação de terapias convencionais antifúngicas com outras propostas tem resultado em maior eficácia comparado a terapias isoladas (Rinaldi, 1997; Hamad, 2008; B. *et al.*, 2015; Pippi *et al.*, 2015), minimizando as recidivas de infecções fúngicas invasivas após meses ou anos de tratamento com terapias convencionais (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Neste contexto, Jandú e colaboradores verificaram que o efeito imunomodulador desencadeado pela administração da lectina pCramoll em associação com o fluconazol resultou na redução da carga fúngica nos pulmões e cérebro e no aumento da sobrevivência dos camundongos infectados com *C. gattii* (Jandú, J. J. *et al.*, 2017). Em vista disso, há esforços para acoplar a imunoterapia com os antifúngicos convencionais, pois esse método pode permitir a diminuição da quantidade de drogas antifúngicas além de reduzir o tempo de tratamento (Rinaldi, 1997; Hamad, 2008; Fuentesfria *et al.*, 2017).

9. Utilização de ArtinM no contexto de novas estratégias terapêuticas frente a infecção por *C. gattii*

As lectinas referem-se a proteínas que interagem com mono ou oligossacarídeo de maneira específica, reversível e não-covalente, com o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) não contendo atividade catalítica (Sharon e Lis, 2004). Elas estão presentes na natureza de forma ubíqua, sendo encontradas desde os organismos menos complexos até aqueles mais especializados como as proteínas de reconhecimento celular e molecular (Sharon e Lis, 2004). Atualmente, as lectinas de plantas estão entre as mais estudadas (Ottensouper *et al.*, 1974; Gilboa-Garber *et al.*, 1977; Goldstein *et al.*, 1980; Sharon e Lis, 2004; Carneiro *et al.*, 2013), sendo conhecidas como importantes agentes imunomoduladores que apresentam um papel considerável na resposta frente a tumores e a

diversos patógenos intracelulares (Souza *et al.*, 2013; Da Silva e Correia, 2014; Jandú, J. J. B. *et al.*, 2017).

A capacidade de ligação das lectinas a carboidratos específicos é oriunda do CRD (Sharon e Lis, 2004) e da estrutura tridimensional dos seus sítios de ligação que são conservados dentro de famílias de lectinas (Drickamer e Mamon, 1982; Peumans e Damme, 1998). Ao considerar o reconhecimento de glicanas por lectinas na superfície de leucócitos, verifica-se o desencadeamento de transdução de sinal que resulta na ativação celular, migração celular e/ou uma produção de citocinas envolvidas na resposta imunitária efetora (Van Damme, *et al.*, 1998; Van Damme, *et al.*, 2008; Souza, *et al.*, 2013). Assim, o reconhecimento de carboidrato na superfície celular é capaz de desencadear uma atividade imunomoduladora, situação extensamente abordada por nosso grupo no contexto de infecções por patógenos intracelulares (Souza *et al.*, 2013).

Para exemplificar a atividade imunomoduladora promovida por lectinas, baseada na ativação de células da imunidade inata e/ou adaptativa, que visam o controle de infecções fúngicas invasivas, as lectinas Paracoccina, pCramoll, e ArtinM podem ser consideradas. Sendo assim, os efeitos biológicos dessas lectinas estão delineados a seguir:

(a) A lectina paracoccina, ligante de N-acetil-D-glucosamina, é obtida do extrato de leveduras de *Paracoccidiodes brasiliensis*, e apresenta a capacidade de induzir um perfil pró-inflamatório em células da imunidade inata (Coltri, *et al.*, 2006; Ganiko, *et al.*, 2007; Dos Reis Almeida, *et al.*, 2010). Em vista disso, a forma recombinante de paracoccina foi expressa em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, e constatou que a administração profilática ou terapêutica de paracoccina conferem um efeito imunomodulador protetor contra a PCM experimental (Alegre *et al.*, 2014; Alegre-Maller *et al.*, 2014). Essa atividade imunomoduladora induzida por paracoccina está associada ao reconhecimento de glicanas presentes em receptores TLR2 e/ou TLR4, mecanismo que repercutiu no direcionamento de uma resposta imunitária efetora de perfil Th1 (Alegre *et al.*, 2014; Alegre-Maller *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2016).

(b) A lectina pCramoll foi purificada a partir de sementes da *Cratylia mollis*. Essa lectina apresenta o reconhecimento por resíduos de manose e glicose, sendo capaz de induzir a produção de IFN- γ por esplenócitos (De Melo Cristiane Moutinho *et al.*, 2010) (Maciel *et al.*, 2004; De Melo *et al.*, 2011; Luis *et al.*, 2014). Além disso, pCramoll induz células do exudato peritoneal a liberarem mediadores pró-inflamatórios para combater a infecção por *Staphylococcus aureus* (Da Silva *et al.*, 2015). Outra importante atividade biológica de pCramoll, refere-se a capacidade de ativar macrófagos derivados da medula óssea em induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e elevar a atividade microbicida dessas células,

no contexto da infecção por *C. gattii* (Jandú, J. J. *et al.*, 2017). Em uma abordagem mais recente sobre pCramoll, verificou-se que a administração da lectina em associação com fluconazol foi capaz de prolongar a sobrevivência dos animais e melhorar alguns sinais clínicos no curso da infecção por *C. gattii* (Jandú, J. J. *et al.*, 2017).

(c) Em relação à lectina ArtinM, extraída da semente de *Artorcapus heterophyllus*, ela apresenta afinidade de ligação com Mana 1-3 (Mana 1-6) Man, estrutura presente no core de N-glicanas. ArtinM organiza-se como um homotetrâmero constituído por subunidades de 16 kDa, cada uma delas contendo um CRD específico para manose (Santos-De-Oliveira *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2015). As propriedades biológicas desempenhadas por ArtinM resultam em importantes efeitos nas células da imunidade, como: indução da ativação e migração de neutrófilos humanos (Santos-De-Oliveira *et al.*, 1994; Ganiko *et al.*, 1998; Pereira-Da-Silva *et al.*, 2006; Ricci-Azevedo *et al.*, 2016), desgranulação de mastócitos (Moreno *et al.*, 2003; Barbosa-Lorenzi *et al.*, 2011), ativação de células T CD4⁺ e TCD8⁺ murinas (Da Silva, Thiago Aparecido *et al.*, 2014; Da Silva, Mariano, *et al.*, 2016a; Da Silva, Thiago Aparecido *et al.*, 2017), indução da produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos (APCs) (Coltri *et al.*, 2008; Mariano *et al.*, 2014). Com destaque para os efeitos exercidos por ArtinM diretamente em células T CD4⁺ e APCs, constatou-se o envolvimento desses tipos celulares na imunomodulação promovida pela lectina que é caracterizada pela indução da resposta celular Th1 e Th17 (Da Silva, Mariano, *et al.*, 2016a). No caso da atuação de ArtinM em células T CD4⁺ e T CD8⁺, a interação com glicanas do receptor CD3 é essencial (Da Silva, Mariano, *et al.*, 2016a; Da Silva, Thiago Aparecido *et al.*, 2017). Em relação ao efeito de ArtinM em APCs, o reconhecimento de glicanas em TLR2 e CD14 pela lectina é o mecanismo responsável pela ativação de APCs e que favorece no controle da infecção por *P. brasiliensis* (Coltri *et al.*, 2008; Mariano *et al.*, 2014; Da Silva, Thiago Aparecido *et al.*, 2017). O padrão de resposta imunológica efetora induzido pela administração profilática ou terapêutica de ArtinM é capaz de conferir proteção em modelo experimental de infecção com *Paracoccidioides brasiliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, *Neospora caninum* e *Candida albicans* (Panunto-Castelo *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2006; Coltri *et al.*, 2008; Coltri *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2011; Custodio *et al.*, 2011).

Sumarizando, a atividade imunomoduladora induzidas por essas lectinas corrobora com as recentes abordagens imunoterapêuticas aplicadas no combate de infecções fúngicas invasivas, pois evidencia a capacidade do reconhecimento de carboidratos em gerar uma resposta de perfil Th1 e Th17, e também de polarizar células da imunidade inata para um perfil pró-inflamatório. Nesse contexto, ressalta-se a capacidade de ArtinM em atuar sobre

células da imunidade inata e adaptativa, resultando em um perfil de resposta imunológica desejada no controle de infecções fúngicas invasivas. Como principal mecanismo imunomodulador induzido por ArtinM, destaca-se a ativação de macrófagos e células dendríticas, via reconhecimento de TLR2/CD14, seguido pela produção de altos níveis de IL-12 com subsequente secreção de IFN- γ por linfócitos, (Coltri *et al.*, 2008; Coltri *et al.*, 2010; Mariano *et al.*, 2014; Da Silva, Thiago Aparecido *et al.*, 2017). Todos esses fatores acerca da atividade imunomodulatória de ArtinM justificam a aplicação dessa lectina no controle da infecção por *C. gattii*, conforme avaliado na corrente dissertação. Além disso, *C. gattii* utiliza de mecanismos de subversão da resposta imunitária do hospedeiro que podem ser contornados pelo efeito de agentes imunomoduladores. Essas moléculas moduladoras da resposta imunológica são capazes de induzirem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (NO), as quais apresentam uma ação direta sobre *C. gattii* (Aguirre e Gibson, 2000; Rivera *et al.*, 2002). Em adição a isso, a infecção por *C. gattii* pode promover o controle da resposta inflamatória pulmonar devido ao bloqueio das respostas Th1 e Th17, que ocorre, como consequência da atenuação funcional de células dendríticas e da expressão reduzida de quimiocinas pulmonares em hospedeiros imunocompetentes (Angkasekwinai *et al.*, 2014) (Hoang *et al.*, 2004; Okubo, Wakayama, *et al.*, 2013). Esses mecanismos de evasão da resposta imune adaptativa são usualmente utilizados pelas cepas R265 e R272 de *C. gattii* (Huston *et al.*, 2013).

Portanto, a atividade imunomoduladora induzido pela administração da lectina ArtinM é um fator a ser avaliado no controle da criptococose, pois o perfil da modulação da resposta imunitária desencadeado por ArtinM é desejada no combate da infecção por *C. gattii*. Assim, a atual dissertação focou no delineamento de propostas profilática e terapêutica que considerem o uso de ArtinM como um agente imunoterápico contra esse modelo de infecção.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da administração profilática ou terapêutica de ArtinM frente a infecção experimental por *Cryptococcus gattii*, associada ou não à terapia antifúngica convencional.

2. Objetivos específicos

Avaliamos o efeito da atividade imunomoduladora da lectina ArtinM, nas estratégias de tratamentos profilático ou terapêutico, na resolução da infecção por *C. gattii*. Para isso, os tópicos a seguir foram utilizados como parâmetros gerais de avaliação:

- ❖ Determinação da curva de sobrevida e da carga fúngica no pulmão;
- ❖ Disseminação fúngica para outros sítios de infecção;
- ❖ Avaliação da polarização de macrófagos em resposta a infecção;
- ❖ Quantificação dos níveis de citocinas no tecido pulmonar;
- ❖ Mensuração no pulmão da atividade de mieloperoxidase (MPO).
- ❖ Mensuração dos tipos celulares no sangue periférico dos grupos de animais;
- ❖ Determinação da frequência das células T CD4⁺ e T CD8⁺ no pulmão e baço;

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, machos, entre 6 e 8 semanas de idade, provenientes do biotério de criação de animais isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os animais foram utilizados para a infecção com *C. gattii*. Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com os princípios propostos pela Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA. O protocolo do comitê de ética, 204/2016, foi aprovado e encontra-se em anexos.

2. Purificação da lectina ArtinM

A lectina foi purificada de acordo com os procedimentos descritos previamente por Santos-de-Oliveira (Santos-de-Oliveira, 1994). Para avaliar a pureza da lectina ArtinM purificada, o gel de eletroforese apresentou marcador de peso molecular e amostra de jacalina que é o principal contaminante no processo de purificação de ArtinM. Após verificar a presença de uma única banda na altura de 16 kDa e a ausência de bandas na mesma posição da amostra de jacalina, foi confirmada a pureza da lectina ArtinM. Finalizada essa etapa, foi determinada a concentração de ArtinM através do método de BCA e realizado a remoção de endotoxinas da amostra através da aplicação em coluna de polimixina.

3. Infecção com *Cryptococcus gattii*

Os animais foram mantidos em microisoladores e infectados com leveduras do isolado da cepa R265 de *C. gattii*. O isolado de *C. gattii* foi cultivado em meio ágar Sabouraud dextrose a 30°C com agitação contínua de 190 rpm. Previamente à infecção por *C. gattii*, as leveduras foram cultivadas por 24-30 horas, em seguida foram centrifugadas e lavadas com PBS 1X (LGC Biotecnologia), e diluídas em china ink para a determinação da concentração de leveduras em câmara de Neubauer. Os camundongos foram anestesiados com quetamina (80 mg/Kg) e xilazina (7 mg/Kg) para a infecção com *C. gattii*, via intranasal (i.n.). Os inóculos de 1×10^2 ou 1×10^3 leveduras foram realizados nos protocolos de tratamento

profilático e terapêutico com ArtinM, abordado no capítulo II e III do tópico de resultados; enquanto os inóculos de 1×10^3 - 1×10^6 leveduras foram realizados na avaliação da infecção por *C. gattii*, abordado no capítulo I do tópico de resultados.

4. Protocolo de administração profilática de ArtinM

No tratamento profilático de administração de ArtinM, os camundongos BALB/C receberam duas injeções de ArtinM (0,5 µg/animal), via subcutânea (s.c.), com intervalo de 7 dias, conforme protocolo utilizado por Coltri *et al.* (Coltri *et al.*, 2008; (Alegre *et al.*, 2014)). Após 3 dias da última administração de ArtinM, os animais foram infectados via i.n. com 1×10^2 leveduras de *C. gattii*. Ao final de 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a infecção com *C. gattii*, os animais foram eutanasiados. A descrição do protocolo de administração profilática de ArtinM para o tratamento da infecção com *C. gattii* está delineada no esquema 1 a seguir:

Esquema 1 – Protocolo de tratamento profilático com ArtinM na infecção por *C. gattii*. BALB/c foram submetidos ou não a administração s.c. de ArtinM de forma profilática nos dias -10 e -3, e no dia 0 foram submetidos a infecção i.n. com 1×10^2 leveduras de *C. gattii*. Após os 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de infecção, os animais foram eutanasiados aleatoriamente para a realização das devidas análises.

5. Protocolo do tratamento terapêutico com ArtinM

No tratamento terapêutico com ArtinM, camundongos foram infectados com 1×10^3 leveduras de *C. gattii* pela via i.n. No primeiro dia após a infecção, os animais foram submetidos ou não a administração de ArtinM (0,5 µg/animal) pela via s.c., e as administrações da lectina foram repetidas por quatro vezes no intervalo de 4 dias, conforme delineado no esquema 2 abaixo. Ao final de 21 dias de infecção, os animais foram eutanasiados para realização das respectivas análises.

Esquema 2 – Protocolo de tratamento terapêutico com ArtinM. BALB/c foram infectados com 1×10^3 leveduras de *C. gattii*, e submetidos ou não a administração s.c. de ArtinM, iniciando um dia após a infecção, com repetições a cada 4 dias.

6. Protocolo de tratamento terapêutico com ArtinM em associação com antifúngico convencional

No protocolo terapêutico com ArtinM em associação com o antifúngico Fluconazol (FLZ), os camundongos foram infectados com leveduras de *C. gattii* (1×10^3) e submetidos, ou não, a administração de ArtinM (0,5 $\mu\text{g}/\text{animal}$) em associação, ou não, com fluconazol (20 mg/Kg). Os animais foram infectados pela via intranasal, a administração de ArtinM foi realizada pela via s.c no primeiro dia após a infecção, as repetidas administrações de ArtinM foram realizadas no intervalo de 4 dias. O tratamento com fluconazol foi iniciado no segundo dia após a infecção e as repetidas administrações do antifúngico ocorreu em dias alternados, pela via i.p.. Ao final de 21 dias de infecção, os animais foram eutanasiados para realização das devidas análises.

Esquema 3 - Protocolo de tratamento terapêutico com ArtinM associado ou não a antifúngico. BALB/c foram infectados com 1×10^3 leveduras de *C. gattii*, e submetidos ou não a administração s.c. de ArtinM, associada ou não ao FLZ (20 mg/Kg). O tratamento com ArtinM iniciou-se um dia após a infecção, com repetições a cada 4 dias, e o tratamento com FLZ (i.p.) foi realizado em dias alternados, iniciando 2 dias após a infecção.

7. Avaliação da curva de sobrevida na infecção por *C. gattii*

Para a curva de sobrevida foi considerado o protocolo de infecção especificado no item 3. Após a infecção, os animais foram acompanhados diariamente para determinar a

mortalidade, com o limite de 47 dias para o encerramento da curva de sobrevida. O resultado foi expresso em porcentagem de sobrevida.

8. Quantificação da carga fúngica

Ao final do período de infecção com *C. gattii*, conforme especificado em cada situação, os camundongos foram utilizados para a retirada asséptica do pulmão. Os órgãos foram pesados, e divulsionados em homogeneizador de tecidos (IKA® - Werke) em frascos contendo PBS 1X estéril (pH 7,2). Posteriormente, 50µL do macerado da solução homogeneizada de cada animal foi semeada, em duplicata, em placas de Petri contendo meio Sabouraud dextrose ágar (Oxoid). As placas foram incubadas a 30°C por até 48 horas e o crescimento das colônias de *C. gattii* foi avaliado a partir da contagem de unidades formadoras de colônia por mL (CFU/mL); e o resultado final da carga fúngica pulmonar foi expressa após normalização com a massa do órgão em miligrama (CFU/mL/mg).

9. Dosagem das citocinas

A dosagem de citocinas no homogeneizado do pulmão foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o Kit OptEIATM (Pharmingen, San Diego, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. As citocinas dosadas foram: IFN- γ , IL-12(p40), IL-10, IL-4, TNF- α , IL-17A. O cálculo dos valores em pg/mL foi realizado no programa Prisma 7.0 (GraphPad Software) tendo como parâmetro a leitura obtida com a curva padrão, e foram normalizados pela massa do órgão em miligramas (pg/mL/mg).

10. Mensuração dos níveis de atividade de mieloperoxidase (MPO)

O fragmento do pulmão obtido durante a necropsia foi homogeneizado separadamente em 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,5) contendo 0,5% de brometo de hexadecyltrimethylammonium (HTAB; 50 mM), e estocado a -80°C por 24 horas. Posteriormente as amostras foram descongeladas, centrifugadas por 10 minutos a 3000x g à 4°C, e 50 µL do sobrenadante do homogeneizado foi adicionado em microplaca de 96 poços e, em seguida, adicionado 50 µL de uma solução de O-dionisidine (3,51 mg de O-dionisidine em 5mL de tampão fosfato e 5 µL de H₂O₂ a 30%). A leitura da microplaca foi realizada em

espectrofotômetro (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) em comprimento de onda de 460 nm no início da reação e em intervalos de 10 minutos após incubação em estufa a 37°C. A atividade de mieloperoxidase foi mensurada pelo cálculo da área total sob a curva (AUC) nos diferentes tempos analisados. Os valores foram expressos em Atividade de MPO pelo peso do órgão em miligramas.

11. Leucograma

Para a contagem total de leucócitos no sangue periférico foi utilizado 5 µL de sangue em µL de solução de Turkey (diluição 1:20), em seguida a contagem foi realizada manualmente utilizando um microscópio de luz e uma câmara de Neubauer. O cálculo de leucócitos totais foi realizado e posteriormente efetuado as devidas correções de diluição.

Para realizar o diferencial de leucócitos, foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo para cada animal. Estas foram coradas por Panótico (NewProv - Produtos para Laboratório LTDA – Brasil) e realizada a leitura manual em microscópio de luz (Leica Dia Star - 420) com objetiva de 100X.

12. Citometria

Um fragmento do pulmão e baço dos camundongos BALB/c infectados com *C. gattii* e tratados terapeuticamente com ArtinM foram removidos assepticamente e individualmente macerados em peneira de nylon (40 µm) com PBS 1X para a obtenção de células pulmonares e células esplênicas. Essas células foram transferidas para eppendorfs de 2 mL, centrifugadas a 300g, 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante das células foi descartado. As células obtidas foram destituídas de hemácias pela adição de 300 µL de tampão de lise (constituído de 9 partes de cloreto de amônio a 0,16 M e 1 parte de Tris-HCl a 0,17 M), durante 10 minutos em gelo, e ao término do tempo, lavadas com PBS a 300g, 4°C por 10 minutos para eliminação do tampão de lise. Em seguida, as células foram fixadas com PBS-formaldeído 3% e, posteriormente, as suspensões celulares foram lavadas com PBS e centrifugadas a 300g por 10 minutos. As células foram ressuspensas em PBS e a concentração celular determinada por citômetro de fluxo. A quantidade de 5×10^5 células de cada animal foi utilizada para a etapa de incubação com os anticorpos específicos (20 µg/mL; BD Biosciences) para anti-CD4 PE, anti-CD3 FITC, anti-CD8 PECy5. As células foram incubadas por 20 minutos com 100 µL de PBS-soro fetal bovino (10%) e, posteriormente, foi realizada a incubação a 4°C com os

anticorpos específicos ou isotipos controle por 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em PBS para a análise por citometria de fluxo (GuavaeasyCyte, Guava Technologies, Millipore, Hayward, CA, USA).

13. Quantificação dos fatores de transcrição por qRT-PCR

O RNA total foi extraído das células pulmonares utilizando Trizol, conforme as instruções do fabricante. A conversão do RNA em cDNA foi realizada pelo kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Fitchburg, WI) com oligo (dT). A reação de qRT-PCR foi realizada em um volume final de 15 μ L utilizando SYBR Green (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para a leitura do qRT-PCR foi utilizado o equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) considerando as seguintes condições de reação: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 sec/60°C por 1 min. A expressão relativa do transcrito foi quantificada usando o método $\Delta\Delta C_t$ e normalizado para a expressão de β -actina. Os primers utilizados para a reação de PCR foram: β -actin (F-CCTAAGGCCAACCGTGAAAA; R GAGGCATACAGGGACAGCACA), iNOS (F-CCGAAGCAAACATCACATTCA; R-GGTCTAAAGGCTCCGGGCT), Arginase-1 (F-GTTCCCAGATGTACCAGGATTC; R-CGATGTCTTTGGCAGATATGC), STAT1 (F-CACGCTGCCTATGATGTC; R-CCTGGAGATTACGCTTGC) e Ym1 (F-TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG; R-ACTCCCTTCTATTGGCCTGTCC).

14. Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa Prisma 7.0 (GraphPad Software). Todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Confirmada a distribuição normal e variância homogênea, foi aplicado o teste T não pareado. Na ausência de normalidade na distribuição e variância heterogênea, foi aplicado o teste de Mann Whitney. Para a análise do protocolo de tratamento terapêutico associado a antifúngico foi realizado o teste de *One-Way* ANOVA para análise de variâncias, com teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SD (desvio padrão) ou média $\pm$ SEM (erro padrão da média), com as diferenças observadas sendo consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*). Todos os experimentos foram realizados três vezes e de forma independente.

RESULTADOS

1. Capítulo I

Título: Delineamento do curso da infecção por *C. gattii* em modelo experimental murino

1.1. Determinação da curva de sobrevida e mensuração da carga fúngica pulmonar causada pela infecção por *C. gattii*

A descrição de algumas características na progressão da infecção por *C. gattii* em modelo experimental murino pode auxiliar nos estudos do efeito imunomodulador de ArtinM frente a esse modelo de infecção. A fim de relacionarmos a progressão da infecção por *C. gattii* com o inóculo de leveduras, para posterior uso em estratégias de controle da criptococose, realizamos a infecção intranasal de 10^3 , 10^4 , 10^5 ou 10^6 leveduras de *C. gattii* em camundongos, e como controle negativo um grupo recebeu somente o veículo (PBS). A sobrevivência dos camundongos foi monitorada diariamente durante sete semanas após a infecção, e todos os camundongos infectados com os diferentes inóculos de *C. gattii* sobreviveram nas primeiras três semanas. Após este período de infecção, a curva de sobrevida dos grupos infectados decaiu de forma consistente com o inóculo. Os grupos de animais infectados com 10^5 ou 10^6 leveduras atingiram 100% mortalidade na quinta semanas após a infecção, enquanto essa taxa de mortalidade foi atingida pelo grupo inoculado com 10^4 leveduras na sexta semanas pós-infecção. Finalmente, o grupo inoculado com 10^3 leveduras de *C. gattii* atingiu cerca de 60% de mortalidade ao final do período de observação, sétima semana de infecção. O grupo controle negativo que recebeu somente veículo (PBS) apresentou 100% de sobrevida (Figura 1A).

Adotamos o inóculo de 10^3 - 10^4 leveduras por camundongo, em todo o estudo, e consideramos o período de três semanas para a infecção. Para os resultados do corrente capítulo, os animais foram infectados com 10^4 leveduras e no período de 21 dias os camundongos foram eutanasiados aleatoriamente, no intervalo de 7 dias, para a realização das devidas análises. Os pulmões dos animais infectados com *C. gattii* apresentaram um aumento progressivo da carga fúngica mensurada por CFU, cerca de uma ordem de grandeza a cada 7 dias, ao longo de todo período investigado (Figura 1B). Além disso, quantificamos a disseminação fúngica por CFU, semanalmente, para os tecidos cardíaco, hepático, renal, cerebral, esplênico e sanguíneo. No final da primeira semana, cerca de 20% dos animais exibiram a presença de leveduras no fígado, rim e cérebro; enquanto na segunda semana a presença de *C. gattii* variou de 27 a 48% dos camundongos, de acordo com o órgão. Após 21 dias de infecção a disseminação de *C. gattii* para o baço e cérebro atingiu 100% dos camundongos; enquanto o fungo foi detectado no coração, fígado e rim em 80 a 95% dos animais. No entanto, a presença de leveduras de *C. gattii* no sangue foi detectada apenas na

terceira semana, em 68% dos animais. Estes resultados relatam importantes fatores sobre a dinâmica da infecção por *C. gattii* em modelo murino. (Figura 1C)

Figura 1 - Curva de sobrevivência sobre vários inóculos de *C. gattii*, mensuração da carga fúngica pulmonar e disseminação tecidual em diversos períodos de infecção. (A) Sobrevivência dos camundongos BALB/c após inoculação por via intranasal (i.n.) de 10^3 , 10^4 , 10^5 ou 10^6 leveduras de *C. gattii* por camundongo. A taxa de mortalidade foi monitorada diariamente e a curva de sobrevivência foi expressa em porcentagem. (B e C) Camundongos BALB/c foram infectados com 10^4 leveduras *C. gattii* por via i.n. e os pulmões, coração, fígado, rins, cérebro, baço e sangue foram obtidos no 7º, 14º e 21º dias pós-infecção, e os respectivos homogeneizados foram utilizados para quantificar a carga fúngica. (B) O CFU do pulmão foi normalizado pelo volume do homogeneizado e pela massa do órgão, com o resultado sendo expresso em CFU/mL/mg. (C) A presença de *C. gattii* no homogeneizado dos órgãos e do sangue total após 7, 14 e 21 dias de infecção foi avaliada em ágar Sabouraud e os resultados expressos em porcentagem de tecidos infectados. Diferença significativa em comparação aos grupos quando $p < 0,05$ (*).

1.2. Quantificação dos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias no tecido pulmonar durante o curso da infecção por *C. gattii*

Nesse tópico avaliamos se as alterações pulmonares ocorridas em camundongos infectados com *C. gattii* poderiam estar relacionadas a um desequilíbrio de respostas pró- e anti-inflamatórias. Para isso, quantificamos por ELISA os níveis de IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10 e IL-4 no homogeneizado dos pulmões após 7, 14 e 21 dias de infecção. A análise das citocinas IL-12p40 e IFN- γ , perfil pró-inflamatório, mostrou valores semelhantes

entre os grupos infectados e não infectados (Figura 2A-B), enquanto os níveis de TNF- α e IL-17, também de perfil pró-inflamatório, foram significativamente menores nos camundongos infectados em comparação ao grupo controle (Figura 2C-D). No entanto, encontramos também uma redução nos níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, no tecido pulmonar de camundongos infectados com *C. gattii* em comparação ao grupo não infectado (Figura 2E-F). Esses dados demonstram que a infecção por *C. gattii* promove uma alteração significativa no equilíbrio das citocinas de perfil pró- e anti-inflamatório, favorecendo o curso da infecção.

Figura 2 - Níveis de citocinas no pulmão de camundongos infectados ou não com *C. gattii* em diferentes períodos de infecção. O sobrenadante do homogeneizado pulmonar dos camundongos infectados ou não com 10^4 leveduras de *C. gattii* foram utilizados para dosagem das citocinas IL-12p40 (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-17 (D), IL-10 (E) e IL-4 (F) por ELISA após 7, 14, e 21 dias de infecção. As concentrações de citocinas foram expressas em pg/mL/mg e normalizadas pela massa do órgão. Os valores foram expressos em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Diferença significativa em comparação ao grupo não infectado, quando $p < 0,05$ (*).

1.3. Mensuração dos níveis de expressão relativa de marcadores associados à polarização de macrófagos alveolares

A polarização de macrófagos nos perfis M1 e M2 é um fator determinante no equilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias no sítio das infecções fúngicas (Davis *et al.*, 2013). Dessa forma, investigamos a expressão relativa de transcritos específicos dos marcadores de polarização M1 (iNOS e STAT1) e M2 (Arginase-1 e Ym-1) no tecido pulmonar de camundongos infectados ou não com *C. gattii*. Observamos que a expressão relativa de iNOS reduziu no sétimo dia após a infecção e retornou a níveis próximos ao controle negativo no décimo quarto e vigésimo primeiro dia de infecção (Figura 3A),

enquanto a expressão relativa de STAT1 não alterou significativamente entre os grupos em todo o período analisado (Figura 3C). Em relação aos marcadores de polarização M2, a expressão relativa de Arginase-1 e YM-1 aumentou drasticamente aos 14 e 21 dias após a infecção por *C. gattii* (Figura 3B e D). Portanto, a indução de macrófagos M2, caracterizado pelo papel anti-inflamatório, foi promovida durante a infecção por *C. gattii* o que propicia o estabelecimento dessa infecção.

Figura 3 – Quantificação da expressão relativa dos marcadores de polarização de macrófagos no tecido pulmonar de camundongos infectados ou não com *C. gattii*. Os pulmões dos camundongos infectados com 10^4 leveduras de *C. gattii* foram obtidos após 7, 14 e 21 dias pós-infecção para extração de RNA. As amostras foram convertidas em cDNA e a expressão relativa de iNOS (A), Arginase-1 (B), STAT-1 (C) e Ym-1 (D) foi determinada por qRT-PCR. Os valores de Ct dos transcritos alvos foram normalizados para a expressão relativa de β -actina como controle endógeno. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM, e os níveis da expressão relativa foram comparados entre camundongos infectados e grupo controle (não infectado). As diferenças foram significativamente diferentes quando $p < 0,05$ (*).

2. Capítulo II

Título: Efeitos da administração profilática de ArtinM no controle da infecção por *C. gattii*

2.1. Avaliação da carga fúngica pulmonar e cerebral dos animais tratados profilaticamente com ArtinM e infectados com *C. gattii*

Tendo em vista que a atividade imunomodulatória de ArtinM favorece uma resposta imunológica de perfil pró-inflamatório e a infecção com *C. gattii* tende a regular esse tipo de resposta imunitária, optamos por avaliar o efeito da administração profilática de ArtinM no curso da infecção por esse patógeno. Assim, adotamos um protocolo de administração profilático com ArtinM, como descrito em Materiais e Métodos no item 4 (Esquema 1), e em seguida realizado a infecção com 10^3 leveduras de *C. gattii*. Ao final desse protocolo, os camundongos BALB/c foram eutanasiados em vários períodos de infecção e avaliado a carga fúngica nos tecidos pulmonar e cerebral. Após quantificarmos a carga fúngica de *C. gattii* por 42 dias de infecção, constatamos uma redução significativa da carga fúngica no pulmão após 28 e 35 dias de infecção no grupo que recebeu a administração profilática de ArtinM (Figura 4A). No cérebro, observamos uma disseminação fúngica relevante na maioria dos animais a partir do 28º dia, com uma expressiva redução da carga fúngica cerebral no grupo ArtinM após 35 dias de infecção, comparado ao grupo controle (Figura 4B). Esses resultados demonstram que o efeito imunomodulador de ArtinM, após sua administração profilática, foi capaz de reduzir a carga fúngica pulmonar e cerebral somente em alguns períodos tardios da infecção por *C. gattii*.

Figura 4 - Mensuração da carga fúngica pulmonar e cerebral dos camundongos tratados profilaticamente com ArtinM e infectados com *C. gattii*. Camundongos BALB/c foram tratados profilaticamente com ArtinM ou PBS como grupo controle e infectados com *C. gattii*. Nos dias 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 de infecção, os animais foram eutanasiados, e o pulmão e cérebro foram coletados para quantificação da carga fúngica. O homogeneizado do pulmão e cérebro foi semeado em meio de cultura Sabouraud Dextrose a contagem de colônias (CFU) foi realizada e normalizada pela massa do órgão (CFU/mL/mg) (A e B). Os valores são expressos em média $\pm$ SD. Diferença significativa em comparação ao grupo controle, quando $p < 0,05$ (*).

2.2. Leucograma do sangue periférico, atividade de MPO e níveis citocínicos no tecido pulmonar

A fim de avaliarmos os efeitos sistêmicos da administração profilática da lectina, realizamos a contagem diferencial absoluta dos leucócitos no sangue periférico e mensuramos a atividade de MPO e o perfil citocínico no pulmão, em distintos dias de infecção com *C. gattii* (Figura 5 e 6). Não observamos alterações significativas no número absoluto de neutrófilos, linfócitos e monócitos nos diferentes dias avaliados pós-infecção (Figura 5A-C). Em busca de avaliarmos a presença de neutrófilos no tecido pulmonar, realizamos a quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO) nos animais em ambos os grupos. Observamos nos animais tratados profilaticamente com ArtinM uma redução significativa nos níveis de MPO somente após 14 dias de infecção por *C. gattii*, quando comparado ao grupo controle (Figura 5D).

Figura 5 - Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico e atividade de mieloperoxidase dos camundongos infectados com *C. gattii* após o tratamento profilático ou não com ArtinM. Após 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de infecção, o sangue periférico dos animais tratados profilaticamente com ArtinM ou com o veículo PBS (Controle), conforme descrito em M&M, foi coletado pelo plexo oftálmico. As contagens do número total e diferencial de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e os valores foram expressos em número absoluto/mm³. Uma fração do pulmão foi reservada para determinação da atividade de MPO por ensaio colorimétrico usando O-dianisidina. Os resultados estão expressos em média $\pm$ SD. Diferença significativa em comparação ao grupo controle quando $p < 0,05$ (*).

A quantificação dos níveis de IL-12p40, no sobrenadante do homogeneizado do tecido pulmonar, não apresentou diferenças significativas entre os grupos em todo período

observado (Figura 6A). No entanto, os níveis de IFN- γ e IL-17 no 21º dia de infecção foram reduzidos significativamente nos animais tratados com ArtinM (Figura 6B-C); enquanto no 35º dia de infecção os níveis de IFN- γ , IL-17 e TNF- α apresentaram um aumento significativo nos animais que receberam a administração de ArtinM (Figura 6B-D). Além disso, os níveis de IL-10 mostraram-se significativamente reduzidos no grupo ArtinM em comparação ao grupo PBS após 28 e 35 dias de infecção (Figura 6E). Portanto, os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em períodos tardios da infecção por *C. gattii* nos grupos tratados com ArtinM corroboram com a redução da carga fúngica nesse mesmo período de infecção. Esse fato criou a perspectiva de investigar o efeito da administração de ArtinM, através de um protocolo terapêutico, no controle da infecção por *C. gattii*.

Figura 6 - Níveis de citocinas no pulmão de camundongos infectados com *C.gattii* e tratados profilaticamente ou não com ArtinM. Os animais tratados profilaticamente com ArtinM ou PBS, conforme descrito em M&M, foram eutasiados após 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de infecção. Os pulmões foram retirados e homogeneizados, em seguida o sobrenadante foi utilizado na dosagem das citocinas IL-12p40, IL-10, TNF- α e IFN- γ por ELISA. Os valores foram expressos em média $\pm$ SD. Diferença significativa em comparação ao grupo controle quando $p < 0,05$ (*).

3. Capítulo III

Título: Efeitos da administração terapêutica de ArtinM no curso da infecção por *C. gattii*

3.1. Avaliação no tecido pulmonar e cerebral da carga fúngica de *C. gattii* após o tratamento terapêutico com ArtinM

A evidência do efeito mais tardio no controle da infecção por *C. gattii* verificado no protocolo de administração profilática de ArtinM, instigou a avaliação do efeito imunomodulador de ArtinM no tratamento terapêutico dessa infecção fúngica. Para essa investigação, camundongos BALB/c foram infectados via i.n com 10^3 leveduras/animal e realizamos a administração de ArtinM a partir do primeiro dia de infecção seguido por repetidas injeções da lectina com intervalo de 4 dias, conforme demonstrado no item 5 em M&M no esquema 2. Após 21 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e realizado a retirada dos pulmões e cérebro para a determinação da carga fúngica de *C. gattii* nesses tecidos. Constatamos uma significativa redução da carga fúngica no pulmão dos animais tratados com ArtinM em relação ao grupo controle não tratado (Figura 7A). Ao observarmos a carga fúngica cerebral, nenhuma diferença significativa entre os grupos foi detectada (Figura 7B). Esses dados reforçam a capacidade imunomoduladora de ArtinM em atuar no curso da infecção por *C. gattii*, também no protocolo de administração terapêutica da lectina.

Figura 7 – Quantificação da carga fúngica do pulmão e cérebro dos camundongos infectados com *C. gattii* e tratados terapeuticamente com ArtinM. Camundongos BALB/c infectados com *C. gattii* foram tratados terapeuticamente com ArtinM ou PBS, como descrito em M&M. No vigésimo primeiro dia de infecção, os animais foram eutanasiados e o pulmão e cérebro foram coletados para a quantificação da carga fúngica. O homogeneizado do pulmão (A) e cérebro (B) foi semeado em meio de cultura Sabouraud Dextrose e o CFU foi determinado e normalizado pela massa do órgão, com os valores sendo expressos em CFU/mL/mg. A quantificação da carga fúngica no pulmão e cérebro foi expressa em média $\pm$ SEM. Diferença significativa em comparação ao grupo controle quando $p < 0,05$ (*).

3.2. Análise do perfil leucocitário, quantificação da atividade de MPO e mensuração dos níveis citocínicos

Verificado o efeito da administração terapêutica de ArtinM na redução da carga fúngica pulmonar de *C. gattii*, avaliamos o perfil leucocitário no sangue periférico, juntamente com a atividade de MPO e os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatória no tecido pulmonar. Verificamos que os animais tratados com ArtinM apresentaram um aumento significativo no número absoluto de neutrófilos e linfócitos, após 21 dias de infecção com *C. gattii*, quando comparado aos valores referentes ao grupo controle (Figura 8A - B). Por outro lado, a contagem absoluta de monócitos e a atividade de MPO não apresentaram diferenças significativas entre os animais tratados com ArtinM e o grupo controle (Figura 8C e D).

Figura 8 - Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico e atividade de mieloperoxidase dos camundongos infectados com *C. gattii* e tratados terapêuticamente com ArtinM. (A-C) O sangue periférico dos animais foi coletado pelo plexo oftálmico após 21 dias de infecção por *C. gattii*. A contagem do número total de leucócitos foi determinada em câmara de Neubauer e os valores utilizados na determinação do número absoluto de neutrófilos (A), linfócitos (B) e monócitos (C) através da análise de esfregaço sanguíneo. (D) Uma fração do pulmão foi reservada para determinação da atividade de MPO por ensaio colorimétrico usando O-dianisidina. Os animais infectados com *C. gattii* foram tratados terapêuticamente com ArtinM ou PBS, como descrito em M&M. Os valores foram expressos em média ± SD. Diferença significativa em comparação ao grupo controle quando $p < 0,05$ (*).

Em seguida, avaliamos a dosagem de citocinas relacionadas ao perfil pró- e anti-inflamatório após a aplicação terapêutica de ArtinM. Dentre as citocinas avaliadas, como IL-12p40, IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-6 e IL-17, os níveis mensurados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos tratados com ArtinM ou somente com o veículo PBS - controle (Figura 9A-F). Esse conjunto de dados demonstram que administração terapêutica de ArtinM foi capaz de induzir uma maior celularidade de neutrófilos e linfócitos no sangue periférico dos animais infectados com *C. gattii*, porém as

citocinas avaliadas não demonstram claramente a modulação da resposta imunológica no tecido pulmonar do grupo tratado com ArtinM nesse modelo de infecção.

Figura 9 - Níveis de citocinas no pulmão de camundongos infectados com *C. gattii* e tratados terapeuticamente com ArtinM. Camundongos BALB/c infectados com *C. gattii* foram tratados terapeuticamente com ArtinM ou PBS - grupo controle, com o protocolo descrito em M&M e especificado no esquema 2. Após 21 dias de infecção com *C. gattii*, os pulmões foram retirados e homogeneizados para utilizar o sobrenadante na dosagem das citocinas IL-12p40 (A), IFN- γ (B), IL-10 (C), TNF- α (D), IL-6 (E) e IL-17 (F) por ELISA. Os resultados expressos em pg/mL/mg do grupo ArtinM foram relacionados com a média do valor obtido no grupo Controle para determinar o “fold change” do grupo ArtinM em relação ao grupo Controle. Os valores foram expressos em média $\pm$ SD, e as diferenças significativas em comparação ao grupo PBS foram consideradas quando $p < 0,05$ (*).

3.3.Determinação da frequência de células T na suspensão de células esplênicas e pulmonares nos animais infectados com *C. gattii* e tratados com ArtinM

Visto que o protocolo de administração terapêutica de ArtinM no curso da infecção por *C. gattii* não resultou no predomínio da resposta imunitária de perfil Th1 no pulmão após 21 dias de infecção, buscamos investigar a frequência relativa das populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ por citometria de fluxo. Para isso, o baço e o pulmão dos animais submetidos

ou não ao tratamento terapêutico com ArtinM foram utilizados na preparação da suspensão celular para a quantificação dos linfócitos T nesses sítios. A frequência das células T CD4⁺ no baço apresentou níveis reduzidos no grupo tratado com ArtinM em comparação ao grupo Controle, porém o mesmo não foi detectado na frequência das células T CD8⁺ esplênicas (Figura 10A – B). Além disso, a frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ presente no tecido pulmonar apresentou patamares próximos entre os grupos ArtinM e Controle (Figura 10C – D). Podemos concluir que a administração de ArtinM não promoveu maior celularidade de linfócitos T no pulmão no vigésimo primeiro dia de infecção, porém a menor celularidade de células T CD4⁺ esplênica é um indicativo de migração para outros sítios.

Figura 10 – Frequência relativa de linfócitos T do baço e do pulmão de camundongos BALB/c infectados com *C. gattii* e tratados terapêuticamente com ArtinM. O baço e pulmão dos camundongos infectados com *C. gattii* foram retirados 21 dias após a infecção com *C. gattii*, e as suspensões celulares desses tecidos foram utilizadas na determinação da frequência dos linfócitos T através da citometria de fluxo. As células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 FITC, anti-CD8 Cy5 e anti-CD3 PE, para a quantificação dos perfis de células T CD4⁺ (A e C) e T CD8⁺ (B e D). A frequência dessas células foi determinada nas amostras de baço e pulmão. Os resultados são expressos em porcentagem e são representados como média $\pm$ SD. Diferença significativa em comparação ao grupo controle quando $p < 0,05$ (*).

3.4.Avaliação da carga fúngica dos camundongos tratados de forma terapêutica com ArtinM em associação com Fluconazol após a infecção com *C. gattii*

O protocolo de tratamento com a administração profilática e terapêutica com ArtinM resultou na redução da carga fúngica em determinados períodos da infecção por *C. gattii*, com isso optamos por acoplar ao protocolo de administração terapêutica de ArtinM o uso do

antifúngico Fluconazol (FLZ) visando uma maior redução da carga fúngica de *C. gattii* no modelo experimental. A administração de FLZ foi realizada a partir do segundo dia de infecção e repetidas injeções com intervalo de 1 dia. Esse protocolo de tratamento com antifúngico foi associado ao uso de ArtinM conforme delimitado no esquema 3 do item 6 em M&M. Após a aplicação dessa nova proposta terapêutica, verificamos após 21 dias de infecção por *C. gattii* que o grupo de animais submetidos ao tratamento com ArtinM ou a associação de ArtinM com FLZ apresentou uma diminuição significativa da carga fúngica no pulmão (Figura 11A). Porém, a análise estatística entre os grupos ArtinM e ArtinM associado a FLZ não repercutiu em uma diferença significativa (Figura 11A). A análise da carga fúngica no cérebro não diferiu entre os grupos tratados com ArtinM e/ou FLZ em comparação ao grupo Controle (Figura 11B). Esses dados evidenciam que a atividade imunomoduladora de ArtinM auxilia no controle da carga fúngica de *C. gattii* mesmo em associação com o antifúngico fluconazol, no entanto ainda não comprovamos que esse tipo de associação (ArtinM + FLZ) foi capaz de intensificar a redução da carga fúngica.

Figura 11 - Quantificação da carga fúngica no pulmão e cérebro de camundongos infectados com *C. gattii* e tratados de forma terapêutica com ArtinM e/ou fluconazol. Camundongos BALB/c infectados com *C. gattii* foram tratados com ArtinM, FLZ, ArtinM associada a FLZ ou somente PBS no grupo controle, a forma de tratamento está especificado no item 6 de M&M. No vigésimo primeiro dia de infecção os animais foram eutanasiados e o pulmão e cérebro foram retirados para a quantificação da carga fúngica desses órgãos por CFU. O homogeneizado do pulmão e cérebro foi semeado em meio de cultura Sabouraud Dextrose, e a determinação do CFU foi normalizada para o volume do homogeneizado e pela massa do órgão (CFU/mL/mg). A quantificação da carga fúngica no pulmão e cérebro foi expressa em média $\pm$ SEM. As diferenças significativas comparadas ao grupo controle foram consideradas significativas com $p < 0,05$ (*).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Diante da constante elevação dos índices globais de infecções fúngicas invasivas e da utilização de drogas antifúngicas desencadearem no hospedeiro diversos efeitos colaterais em consequência do tempo de tratamento, a busca pelo desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas tem se destacado no cenário mundial. Com esse intuito, a polarização de macrófagos para a via clássica (M1) e o direcionamento de respostas do tipo Th1 e Th17 são frequentemente almejados em virtude do papel essencial na resposta antifúngica protetora (Mencacci *et al.*, 2001; Romani, 2004; Dostert e Tschopp, 2007; Chai *et al.*, 2010; Elsegeiny *et al.*, 2018). Assim, o emprego de agentes imunomoduladores, como as citocinas recombinantes IFN- γ e IL-12 (Kullberg *et al.*, 1993; Lutz *et al.*, 2000; Jarvis *et al.*, 2012; Delsing *et al.*, 2014; Kullberg *et al.*, 2014) e os fatores de crescimento G-CSF e GM-CSF (Gellin *et al.*, 2001; Kullberg *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2015; Goldman *et al.*, 2016), mostraram-se potencialmente eficazes na prevenção de infecções fúngicas invasivas através da indução de uma resposta efetora Th1 (Clemons *et al.*, 1994; Roilides *et al.*, 1998; Flores-Garcia *et al.*, 2015). Nessa mesma linha, estudos evidenciaram que a infecção por *C. gattii* evade da resposta imunológica de hospedeiros saudáveis através da atenuação da resposta pró-inflamatória pulmonar, baseada no bloqueio das respostas efetoras Th1 e Th17 e no comprometimento da liberação de citocinas e quimiocinas (Cheng *et al.*, 2009). Portanto, a atividade imunomoduladora de ArtinM instigou-nos a avaliar o efeito da administração dessa lectina no curso da infecção por *C. gattii*, pois dados prévios demonstraram a capacidade protetora de ArtinM em controlar a infecção por *P. brasiliensis* e *Candida albicans* (Coltri *et al.*, 2008; Coltri *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2011; Custodio *et al.*, 2011; Da Silva, *et al.*, 2017). A administração profilática e terapêutica de ArtinM frente à infecção por *P. brasiliensis* foi capaz de induzir uma resposta protetora do tipo Th1 com destaque para os níveis de IL-12, IFN- γ e TNF- α (Coltri *et al.*, 2008; Coltri *et al.*, 2010; Ruas *et al.*, 2018). Ainda no modelo de infecção fúngica, a administração de ArtinM foi capaz de induzir uma resposta celular Th1 e Th17 efetora, capaz de proteger o hospedeiro na infecção por *C. albicans* (Custodio *et al.*, 2011). Nesse sentido, optamos por avaliar a capacidade de ArtinM em promover o controle da infecção por *C. gattii*, após a administração profilática ou terapêutica da lectina.

A avaliação de alguns fatores na relação patógeno-hospedeiro foi considerada no presente estudo para embasar a execução das estratégias de administração profilática e terapêutica de ArtinM. Para isso, inicialmente buscamos esclarecer o efeito de diferentes inóculos de *C. gattii* na sobrevida dos camundongos, a progressão da carga fúngica no tecido

pulmonar e sua disseminação para outros sítios durante o curso da infecção, o perfil de citocinas no pulmão, e a prevalência dos macrófagos M1 ou M2 durante a infecção. A padronização do inóculo de *C. gattii* foi baseada no número de leveduras que mantivesse alta a sobrevivência dos animais durante nosso período de avaliação da infecção, com isso estabelecemos o período de três semanas de infecção para os ensaios iniciais e para o protocolo de administração terapêutica de ArtinM. Assim como na infecção por *C. neoformans*, em que alguns modelos experimentais há uma rápida progressão da carga fúngica pulmonar (Almeida *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2018), também constatamos na infecção experimental por *C. gattii* um aumento constante da carga fúngica pulmonar. De forma concomitante a esse achado, observamos que os animais apresentaram uma crescente taxa de disseminação de *C. gatti* para vários órgãos, após um intervalo de 7 dias. Com o intuito de determinar o perfil citocínico no principal órgão alvo do *C. gattii* e relacionar com a progressão da infecção, mensuramos os níveis de IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10 e IL-4 no homogeneizado do pulmão, após diferentes períodos de infecção. Essa análise constatou uma redução dos níveis de TNF- α e IL-17, em diferentes períodos da infecção por *C. gattii*, os quais já foram avaliados principalmente no contexto da infecção por *C. neoformans*. Sabe-se que a redução dos níveis de TNF- α gera uma deficiência no recrutamento inicial de neutrófilos para o sítio da infecção e compromete a resposta imune celular do hospedeiro, fatos que reduzem o *clearance* de *C. neoformans* (Herring *et al.*, 2005) e de *C. gattii* (Huston *et al.*, 2013). Em relação à citocina IL-17, vários trabalhos mostraram que sua presença tem extrema importância no combate a diversas infecções fúngicas invasivas (Wüthrich *et al.*, 2011; Gladiator *et al.*, 2013; Bar *et al.*, 2014; Conti e Gaffen, 2015), inclusive na infecção por *C. neoformans* (Wozniak *et al.*, 2011; Murdock *et al.*, 2014). Por fim, verificamos a prevalência de macrófagos M2, caracterizados pela alta expressão relativa de Arginase-1 e YM-1, em todos os períodos analisados após a infecção por *C. gattii*. Esse tipo de macrófago polarizado apresenta grande potencial de abrigar, replicar e disseminar o *C. neoformans* no hospedeiro (Chretien *et al.*, 2002; Charlier *et al.*, 2009; Nicola *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012). Os baixos níveis de macrófagos M1 que detectamos na primeira semana de infecção por *C. gattii*, e perpetuou ao longo da infecção, destacam pela redução dos níveis de iNOS. Esses resultados evidenciam que o perfil de resposta imunológica induzida por *C. gattii* é um fator limitador da resposta imunitária do hospedeiro no sítio da infecção, como já descrito na infecção por *C. neoformans* que induz o predomínio de macrófagos M2 favorecendo a progressão dessa infecção (Davis *et al.*, 2013).

Nosso grupo relatou recentemente que a administração de ArtinM em camundongos *naïves*, de forma similar ao protocolo de tratamento profilático adotado no presente estudo, foi capaz de induzir um aumento na proporção de células T CD4⁺ e de células B no baço dos animais que receberam a administração de 0,5 µg da lectina. Ainda nesse trabalho, observamos que as injeções repetidas de ArtinM somente causaram efeito deletério ao hospedeiro quando administrado a lectina em altas concentrações (Oliveira-Brito *et al.*, 2017). Com isso, além desse efeito de ArtinM sobre a população de células esplênicas também devemos lembrar da capacidade de ArtinM em promover a ativação e migração de neutrófilos (Ganiko *et al.* 1998; Pereira-da-Silva *et al.* 2006; Santos-de-Oliveira *et al.* 1994). Esses indicadores reforçam a estratégia de administração profilática de ArtinM para induzir a ativação e migração de tipos celulares efetores na criptococose. Esses indícios somados ao pressuposto de que a biodistribuição de ArtinM tem o pulmão como um dos primeiros órgãos de passagem (Oliveira-Brito *et al.* 2017) e, sabendo que o pulmão é o órgão alvo de *C. gatii*, suportam fortemente nosso protocolo de administração profilática de ArtinM frente a esse patógeno. Nossos resultados demonstraram uma redução da carga fúngica pulmonar de *C. gatii* nos dias 28 e 35 pós-infecção no grupo tratado com ArtinM, sugerindo que o protocolo profilático de tratamento com ArtinM apresenta um efeito desejável somente em períodos tardios nesse modelo de infecção. Similar ao pulmão, a carga fúngica no cérebro do grupo tratado com ArtinM apresentou-se menor em relação ao grupo controle também em períodos tardios da infecção, no trigésimo quinto dia. O aumento significativo dos níveis de IFN-γ, IL-17, e TNF-α, e a redução dos níveis de IL-10, no grupo tratado com ArtinM, acompanhou os mesmos períodos em que detectamos uma relevante redução da carga fúngica. Esses dados evidenciam que o efeito imunomodulador da administração profilática de ArtinM contribuiu no controle parcial da infecção por *C. gattii*, e podemos destacar que a capacidade de ArtinM em atuar sobre as células T CD4⁺ e APCs é o principal desencadeador dos altos níveis IFN-γ e IL-17 detectados (Da Silva, Mariano, *et al.*, 2016a; Da Silva, T. A., Oliveira-Brito, P. K. M., *et al.*, 2017b). No momento, também podemos sugerir que as células B podem contribuir nos níveis de IL-17 encontrados no grupo tratado com ArtinM, pois observamos que ArtinM atua diretamente em células B induzindo a produção de IL-17, mas de maneira independente do reconhecimento de TLR2 e CD14 (*under review* – manuscrito em apêndices).

Trabalhos prévios do grupo demonstraram que a administração terapêutica de agentes imunomoduladores, que utilizam do reconhecimento de carboidrato, foram eficazes na indução de um perfil de resposta imunológica efetor na infecção por *P. brasiliensis* (Alegre-Maller *et al.*, 2014). Além disso, nosso grupo também evidenciou que injeções repetidas da

lectina paracoccina, como protocolo terapêutico, apresentou um efeito importante no controle da PCM (dados não publicados). Esses fatos nos motivaram a investigar a capacidade de ArtinM em induzir a imunomodulação no modelo de infecção com *C. gattii*, através do protocolo de administração terapêutica da lectina. Nosso delineamento terapêutico com ArtinM adotou repetidas injeções da lectina, com intervalo de 4 dias, tendo início a partir do primeiro dia de infecção. Para o caso de ArtinM, nosso grupo demonstrou que o efeito deletério para o hospedeiro advindo da administração da lectina foi possível com altas concentrações da lectina; além disso, a dose de ArtinM adotada no presente estudo não apresentou nenhum efeito danoso ao hospedeiro mesmo com repetidas injeções no intervalo de 7 dias (Oliveira-Brito *et al.*, 2017). Após embasarmos nosso protocolo de administração terapêutica de ArtinM, estipulamos o inóculo de leveduras de *C. gattii* (10^3 leveduras) e o tempo de infecção (21 dias) com base nos dados encontrados no capítulo I dessa dissertação. Interessantemente, o efeito imunomodulador de ArtinM também repercutiu na redução da carga fúngica pulmonar de *C. gattii* através da administração terapêutica de ArtinM, no entanto os níveis de citocinas mensurados no pulmão ao final de 21 dias de infecção não permitiram a categorização do perfil de resposta imunitária associada a atividade moduladora de ArtinM. Pressupomos que em períodos anteriores ao final do protocolo experimental, neste caso 21 dias, há uma prevalência de citocinas associadas a resposta imune celular Th1 e/ou Th17 no pulmão, porém esse questionamento será esclarecido posteriormente. Um importante parâmetro que sugeriu a modulação da imunidade do hospedeiro por ArtinM foi a análise diferencial de leucócitos no sangue periférico dos camundongos, na qual identificamos um aumento no número de neutrófilos e linfócitos circulantes no grupo tratado com ArtinM. Esse aumento de celularidade no sangue periférico indica que esses tipos celulares podem estar migrando para outros sítios acometidos pelo patógeno, ou pode sugerir um estado de ativação dessas populações celulares. Essas evidências foram suportadas, claramente, por meio da análise de citometria de fluxo das células esplênicas dos animais tratados com ArtinM em comparação ao grupo não tratado. Ao final de 21 dias de infecção por *C. gattii*, a frequência de células T $CD4^+$ no baço, principal órgão linfóide secundário, foram reduzidas consideravelmente no grupo tratado com ArtinM, enquanto no pulmão a frequência desse tipo celular não alterou entre os grupos. Esses dados levaram-nos a supor que a administração de ArtinM favoreceu a ativação e possível migração de linfócitos para outros sítios acometidos além do pulmão. Sendo assim, esse conjunto de dados sobre a administração terapêutica de ArtinM permitiu inferir que o efeito imunomodulador da lectina ocorreu nesse contexto da infecção por *C. gattii*, porém a redução da carga fúngica pulmonar no vigésimo primeiro dia

de infecção não está estritamente relacionada com alguns indicadores do perfil modulador desencadeado por ArtinM.

Com o intuito de abordar diferentes delineamentos terapêuticos em modelos experimentais de criptococose, renomados grupos buscam uma estratégia vacinal e até mesmo de terapia celular para conter essa infecção fúngica. Há estudos que tentam estabelecer protocolos vacinais que induzam uma resposta imunitária protetora contra a criptococose (Devi, 1996; Chow e Casadevall, 2011), enquanto outros autores avaliaram a imunização com proteínas da cápsula ou da parede celular de *C. gattii* (Chaturvedi *et al.*, 2014). No campo da terapia celular, tentou-se a transferência adotiva de DC pulsadas com cepas acapsulares de *C. gattii* que promoveu um controle parcial da infecção por esse patógeno (Ueno *et al.*, 2015; Ueno *et al.*, 2017). Outra recente abordagem terapêutica frente a infecção por *C. gattii* foi a associação de antifúngico convencional com um agente imunomodulador, neste caso a lectina pCramoll, que resultou no aumento da sobrevivência, redução da carga fúngica e na melhora dos sinais clínicos dos camundongos infectados com *C. gattii* (Jandú, J. J. *et al.*, 2017). Em virtude do efeito imunomodulador de ArtinM nos protocolos de tratamento avaliados no presente estudo, avaliamos a capacidade da associação de Fluconazol com a lectina ArtinM em intensificar o controle da progressão da infecção por *C. gattii*. Adotamos no protocolo de tratamento com fluconazol a concentração e frequência de administração de acordo com diversos relatos na literatura. Como resultado dessa associação, constatamos que a atividade imunomodulatória de ArtinM é mantida em associação com fluconazol, pois nesse grupo de animais verificamos uma redução da carga fúngica pulmonar de *C. gattii*. Porém, o efeito somatório de ArtinM e antifúngico não foi evidenciado no grupo de animais tratados com ambas as moléculas, já que a carga fúngica pulmonar não diferiu em comparação ao grupo tratado somente com ArtinM. Pretendemos manter a linha investigativa acerca da associação de agente imunodulador e antifúngico ao considerar os diversos efeitos colaterais ao hospedeiro decorrente de drogas antifúngicas (Enoch *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2017); além disso, outros estudos têm demonstrado que a associação de terapias ao método convencional antifúngico tem resultado em uma maior eficácia comparado a terapias isoladas (Rinaldi, 1997; Hamad, 2008; B. *et al.*, 2015; Pippi *et al.*, 2015).

Levando em consideração nossos dados no presente estudo, é notório que devemos investigar os fatores de transcrição e marcadores proteicos clássicos que demonstrem a polarização de macrófagos e a diferenciação de linfócitos T no tecido pulmonar, em resposta a administração de ArtinM durante o curso da infecção por *C. gattii*. Em adição a isso, nossos dados em relação a associação de ArtinM com fluconazol criou-se perspectivas sobre o efeito

causado por ArtinM conjuntamente com outras classes de drogas antifúngicas, durante a infecção por *C. gattii*.

Podemos compreender com base na presente dissertação que novos fatores na relação *C. gattii*-hospedeiro foram levantados em nossos dados e contribuem no esclarecimento da rápida progressão da infecção por *C. gattii* em indivíduos imunocompetentes. Os mecanismos de subversão utilizado por *C. gattii* podem ser contornados parcialmente por meio do efeito imunomodulador de ArtinM, que ficou evidente nos protocolos de tratamento profilático e terapêutico com a lectina visando o combate da infecção por *C. gattii*. A capacidade de ArtinM em modular a imunidade do hospedeiro pode ser usufruída em associação com terapia antifúngica convencional.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

A presente dissertação evidencia que a infecção por *C. gattii* visa regular a resposta imunológica do hospedeiro perpetuando a rápida progressão da doença, enquanto o efeito imunomodulador da administração de ArtinM foi capaz de direcionar a imunidade do hospedeiro para combater essa infecção. Essa atividade imunomodulatória de ArtinM é passível de associação com terapia antifúngica convencional no combate da infecção por *C. gattii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEGG, M. A. et al. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii Isolated from the Excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. **Mycopathologia**, v. 161, n. 2, p. 83-91, February 01 2006. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0186-z> >.
- AGUIRRE, K. M.; GIBSON, G. W. Differing requirement for inducible nitric oxide synthase activity in clearance of primary and secondary Cryptococcus neoformans infection. **Med Mycol**, v. 38, n. 5, p. 343-53, Oct 2000. ISSN 1369-3786 (Print) 1369-3786.
- ALMEIDA, F. et al. Galectin-3 impacts Cryptococcus neoformans infection through direct antifungal effects. **Nat Commun**, v. 8, n. 1, p. 1968, Dec 6 2017. ISSN 2041-1723.
- ANDRADE, J. et al. Cryptococcus neoformans and gattii promote DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells. **Med Mycol**, v. 56, n. 3, p. 344-349, Apr 1 2018. ISSN 1369-3786.
- ANGKASEKWINAI, P. 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**, v. 82, n. 9, p. 3880-90, Sep 2014. ISSN 0019-9567.
- B., P. et al. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on Candida spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839-850, 2015. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jam.12746> >.
- BALTAZAR, L. D. M.; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de Cryptococcus gattii no Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 449-453, 2008. ISSN 0037-8682. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000500003&nrm=iso >.
- BAR, E. et al. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 117-27, Jan 16 2014. ISSN 1074-7613.
- BARBOSA-LORENZI, V. C. et al. The lectin ArtinM binds to mast cells inducing cell activation and mediator release. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 416, n. 3-4, p. 318-24, Dec 16 2011. ISSN 0006-291x.
- BASNAYAKE, T. L.; LIM, A.; CURRIE, B. J. Pulmonary cryptococcal infection presenting with multiple lung nodules. **Respiratory Medicine Case Reports**, v. 23, p. 122-124, 02/03 12/29/received 01/20/revised 01/22/accepted 02/03/pmc-release 2018. ISSN 2213-0071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5881413/> >.
- BEN-ABDALLAH, M. et al. Fungal-Induced Cell Cycle Impairment, Chromosome Instability and Apoptosis via Differential Activation of NF-κB. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002555, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002555> >.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. fov106-fov106, 2016. ISSN 1567-1356. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fov106>>.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune response to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, n. 1, p. 47-70, 2008/09/15/ 2008. ISSN 0165-2427. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242708001761>>.

BODEY, G. P. et al. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant therapy for fungal infection in patients with cancer. **Clin Infect Dis**, v. 17, n. 4, p. 705-7, Oct 1993. ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838.

BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 891-907, 2001. Disponível em: <
<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-147-4-891>>.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: <
<http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/57>>.

BOTTAZZI, B. et al. An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 157-183, 2010. Disponível em: <
<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-030409-101305>>.

BOVERS, M. et al. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 4, p. 400-421, 2008/04/01/ 2008. ISSN 1087-1845. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S108718450700240X>>.

BROWN, A. J.; ODDS, F. C.; GOW, N. A. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 307-13, Aug 2007. ISSN 1369-5274 (Print) 1369-5274.

BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 1-21, 2011. ISSN 0732-0582.

BUSSE, O. J. Z. B. *Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Zuchtung*. v. 16, p. 175-180, 1894.

BYRNES, E. J., 3RD et al. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002205, Sep 2011. ISSN 1553-7366.

BYRNES, E. J. et al. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 13, n. 11, p. 895-907, 06/01 2011. ISSN 1286-4579 1769-714X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318971/>>.

BYRNES, E. J., III et al. Emergence and Pathogenicity of Highly Virulent *Cryptococcus gattii* Genotypes in the Northwest United States. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000850, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000850> >.

BYRNES, E. J.; MARR, K. A. The Outbreak of *Cryptococcus gattii* in Western North America: Epidemiology and Clinical Issues. **Current infectious disease reports**, v. 13, n. 3, p. 256-261, 2011. ISSN 1523-3847 1534-3146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4696060/> >.

CAMPBELL, L. T. et al. Clonality and Recombination in Genetically Differentiated Subgroups of *Cryptococcus gattii*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 8, p. 1403-1409, August 1, 2005 2005. Disponível em: < <http://ec.asm.org/content/4/8/1403.abstract> >.

CAMPUZANO, A.; WORMLEY, F. L. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 33, 03/07 02/20/received 03/04/accepted 2018. ISSN 2309-608X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5872336/> >.

CARDOSO, M. R. et al. ArtinM, a D-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. **Vaccine**, v. 29, n. 49, p. 9183-93, Nov 15 2011. ISSN 0264-410x.

CARNEIRO, R. F. et al. Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **J Mol Recognit**, v. 26, n. 1, p. 51-8, Jan 2013. ISSN 0952-3499.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 5, p. 447-56, May 17 2012. ISSN 1931-3128.

CHAI, L. Y. et al. Anti-*Aspergillus* human host defence relies on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity. **Immunology**, v. 130, n. 1, p. 46-54, May 2010. ISSN 0019-2805.

CHAN, M. et al. Clinical and microbiological characteristics of cryptococcosis in Singapore: predominance of *Cryptococcus neoformans* compared with *Cryptococcus gattii*. **Int J Infect Dis**, v. 26, p. 110-5, Sep 2014. ISSN 1201-9712.

CHANG, Y.-L. et al. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 222-236, 11/07 07/14/received 10/19/revised 11/01/accepted 2017. ISSN 2150-5594 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354158/> >.

CHARLIER, C. et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 120-7, Jan 2009. ISSN 0019-9567.

CHATURVEDI, A. K. et al. Vaccine-mediated immune responses to experimental pulmonary *Cryptococcus gattii* infection in mice. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104316, 2014. ISSN 1932-6203.

CHATURVEDI, S. et al. *Cryptococcus gattii* in AIDS Patients, Southern California. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1686-1692, 2005. ISSN 1080-6040 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367345/> >.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*Trends in Microbiology, v. 19, n. 11, p. 564-571, 2011. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.07.010> >. Acesso em: 2018/07/04.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. *Cryptococcosis*. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 507-544, 2006/09/01/ 2006. ISSN 0891-5520. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891552006000602> >.

CHEN, M. et al. Internalized *Cryptococcus neoformans* Activates the Canonical Caspase-1 and the Noncanonical Caspase-8 Inflammasomes. **J Immunol**, v. 195, n. 10, p. 4962-72, Nov 15 2015. ISSN 0022-1767.

CHEN, S. et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 499-508, Aug 2000. ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838.

CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 4, p. 980-1024, Oct 2014. ISSN 0893-8512.

CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009. ISSN 0019-9567.

CHERNIAK, R.; SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1507-1512, 1994. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186341/> >.

CHOW, S. K.; CASADEVALL, A. Evaluation of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan-protein conjugate as vaccine candidate against murine cryptococcosis. **Vaccine**, v. 29, n. 10, p. 1891-8, Feb 24 2011. ISSN 0264-410x.

CHRETIEN, F. et al. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **J Infect Dis**, v. 186, n. 4, p. 522-30, Aug 15 2002. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899.

CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids Trigger *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement during Interactions with Amoebae and Macrophages. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002047, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002047> >.

CLEMONS, K. V.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Cytokine treatment of central nervous system infection: efficacy of interleukin-12 alone and synergy with conventional antifungal therapy in experimental cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 3, p. 460-4, Mar 1994. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. Chapter One - The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. In: SARIASLANI, S. e GADD, G. M. (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**: Academic Press, v.87, 2014. p.1-41. ISBN 0065-2164.

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, p. 762, 08/17/online 2000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35021206> >.

COLTRI, K. C. et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **Am J Pathol**, v. 173, n. 2, p. 423-32, Aug 2008. ISSN 0002-9440.

_____. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. **Med Mycol**, v. 48, n. 6, p. 792-9, Sep 2010. ISSN 1369-3786.

CONTI, H. R.; GAFFEN, S. L. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 195, n. 3, p. 780-788, 06/11/nihms-submitted 08/01/pmc-release 2015. ISSN 0022-1767 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507294/> >.

CONTI, P. et al. Impact of Fungi on Immune Responses. **Clin Ther**, v. 40, n. 6, p. 885-888, Jun 2018. ISSN 0149-2918.

COSTA, M. C. et al. The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 4, p. 187-195, 2016/06/01/ 2016. ISSN 1438-4221. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422116300303> >.

CUSTODIO, L. A. et al. Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 10, p. 1510-5, Oct 2011. ISSN 1567-5769.

D., N. J.; ARTURO, C. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x> >.

DA SILVA, L. C. et al. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. **Int J Biol Macromol**, v. 72, p. 848-54, Jan 2015. ISSN 0141-8130.

DA SILVA, L. C.; CORREIA, M. T. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. **Front Microbiol**, v. 5, p. 20, 2014. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302x.

DA SILVA, T. A. et al. Activation of spleen cells by ArtinM may account for its immunomodulatory properties. **Cell and Tissue Research**, Berlin/Heidelberg, v. 357, n. 3, p. 719-730, 05/20 08/15/received 03/24/accepted 2014. ISSN 0302-766X 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4148593/> >.

_____. IL-17 Induction by ArtinM is Due to Stimulation of IL-23 and IL-1 Release and/or Interaction with CD3 in CD4+ T Cells. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149721, 2016. ISSN 1932-6203.

_____. ArtinM Mediates Murine T Cell Activation and Induces Cell Death in Jurkat Human Leukemic T Cells. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 7, Jun 30 2017. ISSN 1422-0067.

_____. ArtinM Mediates Murine T Cell Activation and Induces Cell Death in Jurkat Human Leukemic T Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1400, 06/30 05/08/received 06/25/accepted 2017. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5535893/> >.

DADACHOVA, E. et al. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 21, n. 2, p. 192-9, Apr 2008. ISSN 1755-1471 (Print) 1755-1471.

DAVIS, M. J. et al. Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection. **mBio**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 4, n. 3, p. e00264-13, May-Jun 06/18 04/09/received 05/20/accepted 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3684832/> >.

DE MELO, C. M. et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **Int J Pharm**, v. 408, n. 1-2, p. 113-9, Apr 15 2011. ISSN 0378-5173.

DE MELO CRISTIANE MOUTINHO, L. et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 11, p. 1631-1636, 2010/11/01 2010. ISSN 0951-418X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/ptr.3156> >. Acesso em: 2018/07/26.

DE OLIVEIRA, L. L. et al. T Helper 1-Inducing Adjuvant Protects against Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, USA, v. 2, n. 3, p. e183, 03/12 08/29/received 01/07/accepted 2008. ISSN 1935-2727 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2263123/> >.

DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-75, Oct 2004. ISSN 1535-9778 (Print) 1535-9786.

DELSING, C. E. et al. Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. **BMC Infect Dis**, v. 14, p. 166, Mar 26 2014. ISSN 1471-2334.

DENNING, D. W. Calling upon all public health mycologists. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 6, p. 923-924, June 01 2017. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2909-8> >.

DEVI, S. J. Preclinical efficacy of a glucuronoxylomannan-tetanus toxoid conjugate vaccine of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **Vaccine**, v. 14, n. 9, p. 841-4, Jun 1996. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410x.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. Cryptococcus gattii: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 840452, 05/25 11/11/received 01/18/accepted 2009. ISSN 1687-708X 1687-7098. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2686104/> >.

_____. Cryptococcus gattii: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2009, p. 840452, 2009. ISSN 1687-708X (Print) 1687-708x.

DOSTERT, C.; TSCHOPP, J. DETeCTING fungal pathogens. In: (Ed.). **Nat Immunol**. United States, v.8, 2007. p.17-8. ISBN 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking).

DRICKAMER, K.; MAMON, J. F. Phosphorylation of a membrane receptor for glycoproteins. Possible transmembrane orientation of the chicken hepatic lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 24, p. 15156-15161, 1982. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/257/24/15156.abstract> >.

EDITORIAL. Stop neglecting fungi. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 17120, 07/25/online 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.120> >.

ELENI, G. et al. Epidemiology of Cryptococcus gattii, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 16, n. 2, p. 251, 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/2/09-0900> >.

ELSEGEINY, W.; MARR, K. A.; WILLIAMSON, P. R. Immunology of Cryptococcal Infections: Developing a Rational Approach to Patient Therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 651, 2018-April-04 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00651> >.

ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 7, p. 809-18, Jul 2006. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615.

EVA, P. et al. Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 267-275, 2006. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-5822.2005.00619.x> >.

FELDMAN, M. B.; VYAS, J. M.; MANSOUR, M. K. It takes a village: Phagocytes play a central role in fungal immunity. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2018/06/12/ 2018. ISSN 1084-9521. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S108495211730174X> >.

FERNANDES, F. F. et al. Detrimental Effect of Fungal 60-kDa Heat Shock Protein on Experimental Paracoccidioides brasiliensis Infection. **PLoS ONE**, San Francisco, CA USA, v. 11, n. 9, p. e0162486, 09/06 04/08/received

08/07/accepted 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5012565/> >.

FLORES-GARCIA, A. et al. Recombinant murine IL-12 promotes a protective Th1/cellular response in Mongolian gerbils infected with *Sporothrix schenckii*. **J Chemother**, v. 27, n. 2, p. 87-93, Feb 2015. ISSN 1120-009x.

FUENTEFRIA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2-13, 2018/01/01 2017. ISSN 0266-8254. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/lam.12820> >. Acesso em: 2018/07/25.

FYFE, M. et al. *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment. **Can Commun Dis Rep**, v. 34, n. 6, p. 1-12, Jun 2008. ISSN 1188-4169.

GANIKO, L. et al. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. **Glycoconj J**, v. 15, n. 5, p. 527-30, May 1998. ISSN 0282-0080 (Print) 0282-0080.

GELLIN, B. et al. Adjunctive Immune Therapy for Fungal Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. 1048-1056, 2001. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1086/322710> >.

GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-143, January 1, 2000 2000. Disponível em: < <http://cmr.asm.org/content/13/1/122.abstract> >.

GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 76-86, May 2015. ISSN 1087-1845.

GILBOA-GARBER, N.; MIZRAHI, L.; GARBER, N. Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **Can J Biochem**, v. 55, n. 9, p. 975-81, Sep 1977. ISSN 0008-4018 (Print) 0008-4018.

GLADIATOR, A. et al. Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. **J Immunol**, v. 190, n. 2, p. 521-5, Jan 15 2013. ISSN 0022-1767.

GOLDMAN, C. et al. *Scedosporium apiospermum* infections and the role of combination antifungal therapy and GM-CSF: A case report and review of the literature. **Med Mycol Case Rep**, v. 11, p. 40-3, Mar 2016. ISSN 2211-7539 (Print) 2211-7539.

GOLDSTEIN, I. J. et al. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 05/08/online 1980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/285066b0> >.

GOW, N. A. R.; NETEA, M. G. Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, 2016. Disponível em: < <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/royptb/371/1709/20150462.full.pdf> >.

GRAY, K. C. et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 7, p. 2234-9, Feb 14 2012. ISSN 0027-8424.

GROVER, N. et al. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. **Mycopathologia**, v. 164, n. 4, p. 159-170, October 01 2007. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9039-2> >.

HADRICH, I.; AYADI, A. Epidemiology of antifungal susceptibility: Review of literature. **J Mycol Med**, May 14 2018. ISSN 1156-5233.

HAMAD, M. Antifungal immunotherapy and immunomodulation: a double-hitter approach to deal with invasive fungal infections. **Scand J Immunol**, v. 67, n. 6, p. 533-43, Jun 2008. ISSN 0300-9475.

HARRIS, J.; LOCKHART, S.; CHILLER, T. *Cryptococcus gattii*: where do we go from here? **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 113-129, 2012. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2011.607854> >.

HE, X. et al. Virulence factors identified by *Cryptococcus neoformans* mutant screen differentially modulate lung immune responses and brain dissemination. **Am J Pathol**, v. 181, n. 4, p. 1356-66, Oct 2012. ISSN 0002-9440.

HERRING, A. C. et al. Transient Neutralization of Tumor Necrosis Factor Alpha Can Produce a Chronic Fungal Infection in an Immunocompetent Host: Potential Role of Immature Dendritic Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 39-49, 04/02/received 04/29/revised 09/01/accepted 2005. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC538928/> >.

HO, S. W. L. et al. Necrotizing Fasciitis Caused by *Cryptococcus gattii*. **American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)**, v. 44, n. 12, p. E517-22, 2015/12// 2015. ISSN 1078-4519. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/26665255> >.

HOANG, L. M. et al. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 9, p. 935-40, Sep 2004. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615.

HOLE, C. R. et al. Mechanisms of dendritic cell lysosomal killing of *Cryptococcus*. **Sci Rep**, v. 2, p. 739, 2012. ISSN 2045-2322.

HUANG, C. et al. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-Cell responses. **Infect Immun**, v. 70, n. 10, p. 5485-93, Oct 2002. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

HUERFANO, S.; CASTANEDA, A.; CASTANEDA, E. Experimental infection of almond trees seedlings (*Terminalia catappa*) with an environmental isolate of *Cryptococcus*

neoformans var. gattii, serotype C. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, n. 3, p. 131-2, Sep 2001. ISSN 1130-1406 (Print) 1130-1406.

HUSTON, S. M. et al. Cryptococcus gattii is killed by dendritic cells, but evades adaptive immunity by failing to induce dendritic cell maturation. **J Immunol**, v. 191, n. 1, p. 249-61, Jul 1 2013. ISSN 0022-1767.

ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T. et al. Cryptococcus and Cryptococcosis in Cuba. A minireview. **Mycoses**, v. 57, n. 12, p. 707-717, 2014. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.12275> >.

ISLAM, A. et al. An acidic microenvironment increases NK cell killing of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii by enhancing perforin degranulation. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 7, p. e1003439, 2013. ISSN 1553-7366.

J., K.-C. K.; ASHOK, V. Do major species concepts support one, two or more species within Cryptococcus neoformans? **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 574-587, 2006. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1567-1364.2006.00088.x> >.

J., M. A.; S., K. B. Helper T-cell responses and pulmonary fungal infections. **Immunology**, v. 0, n. 0, Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imm.12953> >.

JAIN, N. et al. Phenotypic Switching in a Cryptococcus neoformans Variety gattii Strain Is Associated with Changes in Virulence and Promotes Dissemination to the Central Nervous System. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 896-903, 09/06/received10/31/revised 11/08/accepted 2006. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1360350/> >.

JANDÚ, J. J. et al. Treatment with pCramoll Alone and in Combination with Fluconazole Provides Therapeutic Benefits in *C. gattii* Infected Mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 211, 05/24 08/09/received 05/09/accepted 2017. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5442327/> >.

JANDÚ, J. J. B. et al. Targeting the Immune System with Plant Lectins to Combat Microbial Infections. v. 8, n. 671, 2017-October-04 2017. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00671> >.

JARVIS, J. N. et al. Adjunctive interferon-gamma immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized controlled trial. **Aids**, v. 26, n. 9, p. 1105-13, Jun 1 2012. ISSN 0269-9370.

JIANG, S. Immunity against Fungal Infections. **Immunology and Immunogenetics Insights**, v. 8, p. III.S38707, 2016. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.4137/III.S38707> >.

KELLY, R. M. et al. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to Cryptococcus neoformans. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p. 592-8, Jan 2005. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

KHAN, A. A. et al. Additive potential of combination therapy against cryptococcosis employing a novel amphotericin B and fluconazole loaded dual delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 119, p. 171-178, 2018/07/01/ 2018. ISSN 0928-0987. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092809871830174X> >.

KIDD, S. E. et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 5, p. 1433-43, Mar 2007. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240.

_____. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17258-17263, 2004. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/pnas/101/49/17258.full.pdf> >.

KLEIN, K. R. et al. Identification of *Cryptococcus gattii* by Use of l-Canavanine Glycine Bromothymol Blue Medium and DNA Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3669-3672, 09/30

06/02/received 07/29/revised 09/21/accepted 2009. ISSN 0095-1137 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2772631/> >.

KOFLA, G.; RUHNKE, M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature. **Eur J Med Res**, v. 16, n. 4, p. 159-66, Apr 28 2011. ISSN 0949-2321 (Print) 0949-2321.

KOH, O. et al. *Cryptococcus gattii* Genotype VGIIa Infection in Man, Japan, 2007. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 16, n. 7, p. 1155, 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/7/10-0106> >.

KOVACIC, P.; COOKSY, A. Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and antifungal action. **MedChemComm**, v. 3, n. 3, p. 274-280, 2012. ISSN 2040-2503. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C2MD00267A> >.

KRAUS, P. R. et al. Identification of *Cryptococcus neoformans* Temperature-Regulated Genes with a Genomic-DNA Microarray. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 5, p. 1249-1260, October 1, 2004 2004. Disponível em: < <http://ec.asm.org/content/3/5/1249.abstract> >.

KRYSAN, D. J. Toward improved anti-cryptococcal drugs: Novel molecules and repurposed drugs. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 93-8, May 2015. ISSN 1087-1845.

KULLBERG, B. J. et al. Recombinant interferon-gamma enhances resistance to acute disseminated *Candida albicans* infection in mice. **J Infect Dis**, v. 168, n. 2, p. 436-43, Aug 1993. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899.

KULLBERG, B. J.; VAN DE VEERDONK, F.; NETEA, M. G. Immunotherapy: a potential adjunctive treatment for fungal infection. **Curr Opin Infect Dis**, v. 27, n. 6, p. 511-6, Dec 2014. ISSN 0951-7375.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. EPIDEMIOLOGIC DIFFERENCES BETWEEN THE TWO VARIETIES OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS1. **American Journal of Epidemiology**, v. 120, n. 1, p. 123-130, 1984. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113861> >.

KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 1, p. 218-223, 1986. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0022635758&partnerID=40&md5=feed2c4d89c8aec81a357a079dfe0fd> >.

LANDGRAF, T. N. et al. Therapeutic effect of monophosphoryl lipid A administration on *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. **Med Mycol**, v. 55, n. 3, p. 344-348, Apr 1 2017. ISSN 1369-3786.

LENHARD-VIDAL, A. et al. Polyclonal antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* are able to recognise antigens from different strains from *Paracoccidioides* species complex, including *Paracoccidioides lutzi* LDR2. **Mycoses**, Jun 25 2018. ISSN 0933-7407.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 83, n. 12, p. 4513-27, Dec 2015. ISSN 0019-9567.

LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, n. 3, p. 186-196, 2010. Disponível em: < <https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1513/pats.200907-063AL> >.

LINGEGOWDA, B. P. et al. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in Singapore. **Singapore Med J**, v. 52, n. 7, p. e160-2, Jul 2011. ISSN 0037-5675 (Print) 0037-5675.

LIU, Y. et al. Glycan microarray analysis of the carbohydrate-recognition specificity of native and recombinant forms of the lectin ArtinM. **Data Brief**, v. 5, p. 1035-47, Dec 2015. ISSN 2352-3409 (Print) 2352-3409.

LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Chapter Six - Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity. In: MURPHY, K. M. e MERAD, M. (Ed.). **Advances in Immunology**: Academic Press, v.120, 2013. p.163-184. ISBN 0065-2776.

LUIS, C. N. D. S. et al. *Cratylia mollis* Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies. **Current Bioactive Compounds**, v. 10, n. 1, p. 44-54, 2014. ISSN 1573-4072/1875-6646. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/node/123571/article> >.

LUPO, P. et al. The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. **Infect Immun**, v. 76, n. 4, p. 1581-9, Apr 2008. ISSN 0019-9567.

LUTZ, J. E.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Enhancement of antifungal chemotherapy by interferon-gamma in experimental systemic cryptococcosis. **J Antimicrob Chemother**, v. 46, n. 3, p. 437-42, Sep 2000. ISSN 0305-7453 (Print) 0305-7453.

MA, H. et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12980-5, Aug 4 2009. ISSN 0027-8424.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol**, v. 67, p. 131-90, 2009. ISSN 0065-2164 (Print) 0065-2164.

_____. Mitochondria and the regulation of hypervirulence in the fatal fungal outbreak on Vancouver Island. **Virulence**, v. 1, n. 3, p. 197-201, May-Jun 2010. ISSN 2150-5594.

MACDOUGALL, L.; FYFE, M. Emergence of *Cryptococcus gattii* in a Novel Environment Provides Clues to Its Incubation Period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1851-1852, 01/10/received 02/02/revised 03/13/accepted 2006. ISSN 0095-1137 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1479218/> >.

MACIEL, E. V. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, n. 1, p. 57-60, Mar 2004. ISSN 1045-1056 (Print) 1045-1056.

MAMBULA, S. S. et al. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 68, n. 11, p. 6257-64, Nov 2000. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

MANSOUR, M. K. et al. Protective Efficacy of Antigenic Fractions in Mouse Models of Cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1746-1754, March 1, 2004 2004. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/72/3/1746.abstract> >.

MARIANO, V. S. et al. Recognition of TLR2 N-glycans: critical role in ArtinM immunomodulatory activity. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98512, 2014. ISSN 1932-6203.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 106, 12/21/online 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6> >.

MCMULLAN, B. J.; SORRELL, T. C.; CHEN, S. C.-A. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. **Future Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1613-1631, 2013. Disponível em: < <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.13.123> >.

MENCACCI, A. et al. Defective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation and its restoration by treatment with TH2 cytokine antagonists. **Blood**, v. 97, n. 5, p. 1483-90, Mar 1 2001. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971.

MERSHON, K. L. et al. Role of Complement in Protection against *Cryptococcus gattii* Infection. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1061-1070, March 1, 2009 2009. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/77/3/1061.abstract> >.

MOHR, J. et al. Current options in antifungal pharmacotherapy. **Pharmacotherapy**, v. 28, n. 5, p. 614-45, May 2008. ISSN 0277-0008 (Print) 0277-0008.

MONARI, C. et al. *Cryptococcus neoformans* Capsular Glucuronoxylomannan Induces Expression of Fas Ligand in Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3461-3468, 2005. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/174/6/3461.full.pdf> >.

MONK, B. C.; CANNON, R. D. Genomic pathways to antifungal discovery. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 2, n. 4, p. 309-29, Dec 2002. ISSN 1568-0053 (Print) 1568-0053.

MORAN, M. et al. **G-FINDER: Neglected Disease Research and Development: the Ebola Effect**. G-FINDER 2015.

MORENO, A. N. et al. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 132, n. 3, p. 221-30, Nov 2003. ISSN 1018-2438 (Print) 1018-2438.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J Med Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 159-64, Mar 1994. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615.

MURDOCK, B. J. et al. Interleukin-17A Enhances Host Defense against Cryptococcal Lung Infection through Effects Mediated by Leukocyte Recruitment, Activation, and Gamma Interferon Production. v. 82, n. 3, p. 937-948, March 1, 2014 %J Infection and Immunity 2014. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/82/3/937.abstract> >.

N., V. S. et al. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1274-1285, 2008. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-5822.2008.01125.x> >.

NAKAMURA, K. et al. Dectin-1 is not required for the host defense to *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol Immunol**, v. 51, n. 11, p. 1115-9, 2007. ISSN 0385-5600 (Print) 0385-5600.

NEILSON, J. B.; FROMTLING, R. A.; BULMER, G. S. Pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*: Decreased survival in vivo. **Mycopathologia**, v. 73, n. 1, p. 57-59, January 01 1981. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/BF00443015> >.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 51-83, Mar 2016. ISSN 0891-5520.

NICOLA, A. M. et al. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. **MBio**, v. 2, n. 4, 2011.

O'DEA, E. M. et al. Eosinophils are recruited in response to chitin exposure and enhance Th2-mediated immune pathology in *Aspergillus fumigatus* infection. **Infect Immun**, v. 82, n. 8, p. 3199-205, Aug 2014. ISSN 0019-9567.

O'HALLORAN, J. A.; POWDERLY, W. G.; SPEC, A. Cryptococcosis today: It is not all about HIV infection. **Current clinical microbiology reports**, v. 4, n. 2, p. 88-95, 04/17 04/23/nihms-submitted 06/01/pmc-release 2017. ISSN 2196-5471. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5677188/> >.

OLIVEIRA BRITO, P. K. M. et al. Systemic effects in naive mice injected with immunomodulatory lectin ArtinM. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0187151, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29084277> >.

O., S. et al. Matrix metalloproteinases contribute to the regulation of chemokine expression and pulmonary inflammation in *Cryptococcus* infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 183, n. 3, p. 431-440, 2016. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cei.12725> >.

OKUBO, Y. et al. How histopathology can contribute to an understanding of defense mechanisms against cryptococci. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 465319, 2013. ISSN 0962-9351.

_____. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **Jpn J Infect Dis**, v. 66, n. 3, p. 216-21, 2013. ISSN 1344-6304.

OTTENSOOSER, F. et al. Lectins detecting group C streptococci. **Infect Immun**, v. 9, n. 5, p. 971-3, May 1974. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

PANUNTO-CASTELO, A. et al. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 11, n. 12, p. 1035-42, Dec 2001. ISSN 0959-6658 (Print) 0959-6658.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 20 2009. ISSN 0269-9370.

PATIL, A.; MAJUMDAR, S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. **J Pharm Pharmacol**, v. 69, n. 12, p. 1635-1660, Dec 2017. ISSN 0022-3573.

PEREIRA-DA-SILVA, G. et al. Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 1, p. 86-94, Jan 2006. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 16, n. 4, p. 837-74, v-vi, Dec 2002. ISSN 0891-5520 (Print) 0891-5520.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 1 2010. ISSN 1058-4838.

PEUMANS, W. J.; DAMME, E. J. M. V. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, n. 1, p. 199-228, 1998/04/01 1998. ISSN 0264-8725. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/02648725.1998.10647956> >.

PIKMAN, R.; BEN-AMI, R. Immune modulators as adjuncts for the prevention and treatment of invasive fungal infections. **Immunotherapy**, v. 4, n. 12, p. 1869-82, Dec 2012. ISSN 1750-743x.

PIPPI, B. et al. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839-850, 2015/04/01 2015. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/jam.12746> >. Acesso em: 2018/07/25.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 05/05 2017. ISSN 1473-3099 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5818156/> >.

RICCI-AZEVEDO, R. et al. Neutrophils Contribute to the Protection Conferred by ArtinM against Intracellular Pathogens: A Study on *Leishmania major*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004609, Apr 2016. ISSN 1935-2727.

RINALDI, M. G. Controversies in medical mycology. **Dermatology**, v. 194 Suppl 1, p. 45-7, 1997. ISSN 1018-8665 (Print) 1018-8665.

RITTNER, G. M. et al. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1519, 2012. ISSN 1935-2727.

RIVERA, J. et al. Antibody efficacy in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection: a role for nitric oxide. **J Immunol**, v. 168, n. 7, p. 3419-27, Apr 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, 2016. Disponível em: < <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016> >.

RODRIGUES, M. L. Funding and Innovation in Diseases of Neglected Populations: The Paradox of Cryptococcal Meningitis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, CA USA, v. 10, n. 3, p. e0004429, 03/10 2016. ISSN 1935-2727 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786104/> >.

ROILIDES, E. et al. The role of immunoreconstitution in the management of refractory opportunistic fungal infections. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 12-25, 1998. ISSN 1369-3786 (Print) 1369-3786.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 11, 01/01/online 2004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri1255> >.

_____. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 275-88, Apr 2011. ISSN 1474-1733.

RUAS, L. P.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. ArtinM offers new perspectives in the development of antifungal therapy. **Front Microbiol**, v. 3, p. 218, 2012. ISSN 1664-302x.

RUAS, L. P. et al. Effect of ArtinM on Human Blood Cells During Infection With *Paracoccidioides brasiliensis*. **Front Microbiol**, v. 9, p. 867, 2018. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302x.

RUMA-HAYNES, P.; BROWNLEE, A. G.; SORRELL, T. C. A rapid method for detecting extracellular proteinase activity in *Cryptococcus neoformans* and a survey of 63 isolates. **J Med Microbiol**, v. 49, n. 8, p. 733-7, Aug 2000. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615.

SA, N. P. et al. Heterocycle Thiazole Compounds Exhibit Antifungal Activity through Increase in the Production of Reactive Oxygen Species in the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 8, Aug 2017. ISSN 0066-4804.

SAIJO, T. et al. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e00912-14, Mar 18 2014.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R. et al. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J Immunol**, v. 153, n. 4, p. 1798-807, Aug 15 1994. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

SCHOFFELEN, T. et al. *Cryptococcus gattii* induces a cytokine pattern that is distinct from other cryptococcal species. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55579, 2013. ISSN 1932-6203.

SEIDER, K. et al. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 392-400, 2010/08/01/ 2010. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527410000627> >.

SEVERO, L. C.; DE MATTOS OLIVEIRA, F.; LONDERO, A. T. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases.

Revista iberoamericana de micologia, v. 16, n. 3, p. 152-154, 1999/09// 1999. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/18473564> >.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 2, p. 213-67, Jun 2011. ISSN 1092-2172.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53r-62r, Nov 2004. ISSN 0959-6658 (Print) 0959-6658.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, May-Jun 2006. ISSN 0037-8682 (Print) 0037-8682.

SKOLNIK, K.; HUSTON, S.; MODY, C. H. Cryptococcal Lung Infections. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 451-464, 2017/09/01/ 2017. ISSN 0272-5231. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272523117300424> >.

SORRELL, T. C. Cryptococcus neoformans variety gattii. **Med Mycol**, v. 39, n. 2, p. 155-68, Apr 2001. ISSN 1369-3786 (Print) 1369-3786.

SORRELL, T. C. et al. Concordance of clinical and environmental isolates of Cryptococcus neoformans var. gattii by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 1253-60, May 1996. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137.

SOUZA, M. A. et al. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconj J**, v. 30, n. 7, p. 641-57, Oct 2013. ISSN 0282-0080.

SPECHT, C. A. et al. Vaccination with Recombinant Cryptococcus Proteins in Glucan Particles Protects Mice against Cryptococcosis in a Manner Dependent upon Mouse Strain and Cryptococcal Species. **mBio**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 8, n. 6, p. e01872-17, Nov-Dec 11/28 10/12/received 10/18/accepted 2017. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5705919/> >.

SPRINGER, D. J. et al. Cryptococcus gattii VGIII Isolates Causing Infections in HIV/AIDS Patients in Southern California: Identification of the Local Environmental Source as Arboreal. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004285, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004285> >.

STEELE, K. T. et al. In-hospital mortality of HIV-infected cryptococcal meningitis patients with *C. gattii* and *C. neoformans* infection in Gaborone, Botswana. **Med Mycol**, v. 48, n. 8, p. 1112-5, Dec 2010. ISSN 1369-3786.

STEPHEN, C. et al. British Columbia: Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 10, p. 792-794, 2002. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC339618/> >.

Stop neglecting fungi. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 17120, 07/25/online 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.120> >.

SYME, R. M. et al. Primary Dendritic Cells Phagocytose *Cryptococcus neoformans* via Mannose Receptors and Fcγ Receptor II for Presentation to T Lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 5972-5981, November 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/70/11/5972.abstract> >.

TANAKA, M. et al. Toll-like receptor 9-dependent activation of bone marrow-derived dendritic cells by URA5 DNA from *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 80, n. 2, p. 778-86, Feb 2012. ISSN 0019-9567.

TEIXEIRA, C. R. et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 3001-8, Apr 5 2006. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410x.

TEIXEIRA, P. A. C. et al. Mannoprotein MP84 mediates the adhesion of *Cryptococcus neoformans* to epithelial lung cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 106, 08/19 06/06/received 07/18/accepted 2014. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4137752/> >.

TOREN, A. et al. Invasive fungal infections in lymphoma patients receiving immunotherapy following autologous bone marrow transplantation (ABMT). **Bone Marrow Transplant**, v. 20, n. 1, p. 67-9, Jul 1997. ISSN 0268-3369 (Print) 0268-3369.

UENO, K. et al. Dendritic Cell-Based Immunization Ameliorates Pulmonary Infection with Highly Virulent *Cryptococcus gattii*. **Infection and Immunity**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 83, n. 4, p. 1577-1586, 03/17 12/30/received 01/19/rev-request 01/27/accepted 2015. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4363414/> >.

_____. Immunization with Antigen-Pulsed Dendritic Cells Against Highly Virulent *Cryptococcus gattii* Infection: Analysis of Cytokine-Producing T Cells. **Methods Mol Biol**, v. 1625, p. 327-339, 2017. ISSN 1064-3745.

UPTON, A. et al. First Contemporary Case of Human Infection with *Cryptococcus gattii* in Puget Sound: Evidence for Spread of the Vancouver Island Outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3086-3088, September 1, 2007 2007. Disponível em: < <http://jcm.asm.org/content/45/9/3086.abstract> >.

VALLABHANENI, S. et al. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2016/03/01/ 2016. ISSN 0891-5520. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891552015000938> >.

VANBREUSEGHEM, R.; TAKASHIO, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. **Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol**, v. 50, n. 6, p. 695-702, 1970. ISSN 0037-9638 (Print) 0037-9638.

VECCHIARELLI, A. et al. Cryptococcus neoformans galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 3, n. 8, p. 997-1005, 2011. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/imt.11.86>>.

VOELZ, K. et al. 'Division of labour' in response to host oxidative burst drives a fatal Cryptococcus gattii outbreak. **Nat Commun**, v. 5, p. 5194, Oct 17 2014. ISSN 2041-1723.

WAN, L. et al. Effect of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor on Prevention and Treatment of Invasive Fungal Disease in Recipients of Allogeneic Stem-Cell Transplantation: A Prospective Multicenter Randomized Phase IV Trial. **J Clin Oncol**, v. 33, n. 34, p. 3999-4006, Dec 1 2015. ISSN 0732-183x.

WANG, F. et al. Innate and adaptive immune response to chronic pulmonary infection of hyphae of Aspergillus fumigatus in a new murine model. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 1400-1408, 2017. Disponível em: <<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000590>>.

WHO, W. H. O. **The top 10 causes of death**. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> 2018.

WIESNER, D. L.; KLEIN, B. S. Lung epithelium: barrier immunity to inhaled fungi and driver of fungal-associated allergic asthma. **Curr Opin Microbiol**, v. 40, p. 8-13, Dec 2017. ISSN 1369-5274.

WOZNIAK, K. L. et al. Role of IL-17A on Resolution of Pulmonary C. neoformans Infection. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17204, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017204>>.

WOZNIAK, K. L.; LEVITZ, S. M. Cryptococcus neoformans enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. **Infect Immun**, v. 76, n. 10, p. 4764-71, Oct 2008. ISSN 0019-9567.

WÜTHRICH, M. et al. Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 2, p. 554-568, 02/01/ 2011. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI43984>>.

XIE, J. L. et al. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 523-42, 2014. ISSN 1746-0913.

XUE, C. et al. The Human Fungal Pathogen Cryptococcus Can Complete Its Sexual Cycle during a Pathogenic Association with Plants. **Cell Host & Microbe**, v. 1, n. 4, p. 263-273, 2007/06/14/ 2007. ISSN 1931-3128. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193131280700100X>>.

APÊNDICES

1. Apêndice I

Título: Systemic effects in *naïve* mice injected with immunomodulatory lectin ArtinM

Autores: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito, Thiago Eleutério Gonçalves, Fabrício Freitas Fernandes, Camila Botelho Miguel, Wellington Francisco Rodrigues, Javier Emílio Lazo Chica, Maria Cristina Roque-Barreira, Thiago Aparecido da Silva.

Periódico: PLoS One. 2017; 12(10): e0187151. DOI: 10.1371/journal.pone.0187151.

RESEARCH ARTICLE

Systemic effects in naïve mice injected with immunomodulatory lectin ArtinM

Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito¹, Thiago Eleutério Gonçalves¹, Fabrício Freitas Fernandes¹, Camila Botelho Miguel², Wellington Francisco Rodrigues², Javier Emilio Lazo Chica², Maria Cristina Roque-Barreira¹, Thiago Aparecido da Silva^{1*}

1 Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, **2** Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

* sthiagoap@gmail.com, sthiagoap@usp.br

Abstract

Toll-like receptors (TLR) contain N-glycans, which are important glycotargets for plant lectins, to induce immunomodulation. The lectin ArtinM obtained from *Artocarpus heterophyllus* interacts with TLR2 N-glycans to stimulate IL-12 production by antigen-presenting cells and to drive the immune response toward the Th1 axis, conferring resistance against intracellular pathogens. This immunomodulatory effect was demonstrated by subcutaneously injecting (s.c.) ArtinM (0.5 µg) in infected mice. In this study, we evaluated the systemic implications of ArtinM administration in naïve BALB/c mice. The mice were s.c. injected twice (7 days interval) with ArtinM (0.5, 1.0, 2.5, or 5.0 µg), LPS (positive control), or PBS (negative control) and euthanized after three days. None of the ArtinM-injected mice exhibited change in body weight, whereas the relative mass of the heart and lungs diminished in mice injected with the highest ArtinM dose (5.0 µg). Few and discrete inflammatory foci were detected in the heart, lung, and liver of mice receiving ArtinM at doses ≥ 2.5 µg. Moreover, the highest dose of ArtinM was associated with increased serum levels of creatine kinase MB isoenzyme (CK-MB) and globulins as well as an augmented presence of neutrophils in the heart and lung. IL-12, IFN- γ , TNF- α , and IL-10 measurements in the liver, kidney, spleen, heart, and lung homogenates revealed decreased IL-10 level in the heart and lung of mice injected with 5.0 µg ArtinM. We also found an augmented frequency of T helper and B cells in the spleen of all ArtinM-injected naïve mice, whereas the relative expressions of T-bet, GATA-3, and ROR- γ t were similar to those in PBS-injected animals. Our study demonstrates that s.c. injection of high doses of ArtinM in naïve mice promotes mild inflammatory lesions and that a low immunomodulatory dose is innocuous to naïve mice.

OPEN ACCESS

Citation: Oliveira Brito PKM, Gonçalves TE, Fernandes FF, Miguel CB, Rodrigues WF, Lazo Chica JE, et al. (2017) Systemic effects in naïve mice injected with immunomodulatory lectin ArtinM. PLoS ONE 12(10): e0187151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151>

Editor: Sujit Kumar Bhutia, National Institute of Technology Rourkela, INDIA

Received: May 16, 2017

Accepted: October 14, 2017

Published: October 30, 2017

Copyright: © 2017 Oliveira Brito et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (grant numbers 2012/09611-0, 2013/04088-0, 2014/16003-1, 2016/04877-2, 2016/10446-4, 2016/23112-7), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Introduction

Lectins are characterized as a group of proteins that interact with specific carbohydrates in a reversible and non-catalytic manner [1]. The recognition of mono- or oligosaccharides by lectins, which are ubiquitous in nature, accounts for several biological activities [2–6]. Recently, plant lectins have been explored owing to their ability to modulate immune responses in

(475357/2013-2), Financiadora de Estudos e Projetos (0110045900), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

mammals. The modulation process is initiated by the interaction of lectin with glycans that are linked to receptors on the surface of adaptive and innate immunity cells [7–10]. Toll-like receptors (TLR) are importantly implicated in the modulation of innate immune response against several pathogens [11]; N-glycans exhibited by TLR on antigen-presenting cells (APC) can be recognized by plant lectins to trigger cell activation [12]. The lectin ArtinM, obtained from the seeds of *Artocarpus heterophyllus*, interacts with glycans N-linked to TLR2 [7], CD3 [13, 14], and CXCR2 [15], and these established interactions are biologically relevant since they induce activation of APC, CD4⁺ T cells (also known as T helper cells), and neutrophils, respectively [13–17]. ArtinM is organized as a homotetramer composed of 16 kDa non-glycosylated subunits [17], and each polypeptide chain encompasses a carbohydrate recognition domain (CRD). It recognizes Man α 1–3 [Man α 1–6] Man β 1–4, the core of N-glycans, as demonstrated by assaying the affinity of lectin to bind to a broad array of glycans [18, 19].

ArtinM induces neutrophil migration, superoxide production, and phagocytic activity [15–17]; mast cell degranulation and release of mediators such as TNF- α [20]; activation of spleen cells and CD4⁺ T cells [14]; stimulation of the interleukin (IL)-17 production by CD4⁺ T cells [13]; and IL-12 production by macrophages and dendritic cells [7, 21]. ArtinM-induced IL-12 production drives the immune response toward the T helper (Th) 1 cells [7, 21, 22], a phenomenon demonstrated in murine models of infections with *Leishmania major* [8], *L. amazonensis* [10], *Paracoccidioides brasiliensis* [21, 22], *Candida albicans* [23], and *Neospora caninum* [24].

A crescent number of TLR agonists are being reported as being able to elicit innate immune responses toward an inflammatory pattern, acting as immunomodulatory agents, and providing interesting tools of interference in the outcome of infections, particularly those caused by intracellular pathogens [9, 11, 25–27]. TLR agonists may exert inflammatory activities at the site of infection and aggravate tissue damage [28, 29]. Therefore, to avoid exacerbated inflammation, responses triggered by TLR agonists must be tightly regulated. Concerning TLR2, some studies support the idea that this receptor plays both proinflammatory and regulatory roles [30, 31]. However, pre-clinical assays for the applications of TLR agonists as immunomodulatory agents require *in vivo* approaches, including quantitative analysis of tissue damage after agonist administration. Furthermore, all the possible collateral effects of a TLR agonist administration must be examined in a large spectrum of conditions to which the treated organism is exposed.

The TLR2 agonist ArtinM has been studied *in vitro* by stimulating isolated cell populations with the lectin ArtinM and monitoring the triggered responses; *in vivo*, the systemic and local effects of the ArtinM administration have been examined in mice infected with intracellular pathogens [7, 8, 10, 13, 21–24]. Although extensive, the *in vivo* evaluation still has an important lacuna that concerns the possible effects of ArtinM on normal, naïve mice. In the present study, we evaluated the systemic effects of different doses of ArtinM administration to naïve BALB/c mice. We found that ArtinM at high doses is associated with the occurrence of mild inflammatory infiltrates in tissues, neutrophil infiltration in the heart and lung, discrete alteration of serum biochemical parameters, and reduction of the IL-10 levels in tissues. Notably, ArtinM administration at the appropriate dose to induce immunomodulation only increased the frequency of CD4⁺ T cells slightly in the spleen and promoted no undesirable effects in the naïve mice.

Materials and methods

Animals

Male BALB/c mice at 6–8-weeks-old were acquired from the animal house of the Campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. They were maintained under standard conditions in the animal house in the Molecular and Cellular Biology Department of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, under

optimized hygienic conditions. All experiments were conducted following the Committee of Ethics in Animal Research of the College of Medicine of Ribeirão Preto at the University of São Paulo approved the animal studies, Protocol no. 082/2012.

ArtinM affinity purification

The lectin ArtinM was purified from the saline extract of *A. heterophyllus* (jackfruit) seeds via affinity chromatography on sugar columns as previously described [17]. The purity degree was evaluated by electrophoresis in a polyacrylamide gel (12%) in the presence of sodium dodecyl sulfate.

Experimental design

The administration protocol of ArtinM described by Coltri [21] was adapted for the current work. Groups of animals received two injections subcutaneously (s.c.; at 7-day intervals) of ArtinM, LPS, or PBS, as indicated in Fig 1. The injected ArtinM doses were 0.5, 1.0, 2.5, or 5.0 μg . Mice of the positive control group received LPS (3.2 mg/Kg), whereas those of the negative control group received PBS. Mice were euthanized at day 0 to collect blood and organs.

Measurement of variation in body weight and relative mass of organs

Body weight of the animals was measured daily to calculate the variation from the initial body weight and was expressed as a percentage of the initial body weight. The quotient of organ mass and the body weight was determined at day 0 to estimate the relative mass of the organs (spleen, heart, lung, liver, and kidney).

Fig 1. Body weight variation and relative organs mass of naïve BALB/c mice after ArtinM administration. (A) The protocol of ArtinM administration includes two subcutaneous injections, 10 and 3 days before the mice were euthanized (adapted from Coltri et al. [22]). An identical protocol was used for PBS or LPS injection in the negative and positive control groups, respectively. (B) The body weight was first determined on day -10, and the daily subsequent determinations allowed calculating the weight variations in relation to the first value. (C–G) On day 0, the mass of spleen (C), liver (D), kidney (E), lung (F), and heart (G) was measured, and the quotient between the organ mass and the body weight was used to express the organ relative mass (mg/body weight) for each mice. (A–G) Results are expressed as mean $\pm$ SD, and the differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) compared to the PBS control group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151.g001>

Histopathological processing and morphometric analysis

A fragment of either of the organs (heart, lung, liver, and kidney) was processed for histopathological and morphometric analysis. In brief, specimens were fixed in methacarn, dehydrated in a series of ethyl alcohol, diaphanized in xylol, and embedded in paraffin. Serial sections with a thickness of 6 μm were prepared at intervals of 30 μm . Tissues were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and 20 samples were analyzed for each organ.

Morphometric analysis was performed on one slide (randomly selected) for all organs. Four images were captured per slide, selecting those obtained at 60- μm intervals. The analysis was performed using a light microscope fitted with a digital camera (Evolution MP 5.0; Media Cibernetic Inc., USA) and using the Image-Pro Plus software (Media Cibernetic Inc., USA). Images of the histological sections were captured using 20 $\times$ objective lenses and were analyzed by the ImageJ software in duplicates.

Each acquired image was subdivided into 25 grids (155,2015 μm^2 each), and 13 grids were randomly selected to be analyzed. The inflammatory infiltrates were examined in a total area of 1,614 mm^2 per organ/animal. The quantitation of the number of inflammatory cells (inflammatory infiltrate/ cm^2) in each tissue was calculated as follows: (inflammatory cells)/(total area).

Peripheral blood leukogram

The peripheral blood samples of each animal were used to measure the total leukocyte count by Neubauer chamber after 1:20 dilution in Turkey's solution. Next, peripheral blood samples were smeared on a glass slide and stained with Panopticon (NewPro, Products for Laboratory LTDA, Brazil) to perform differential leucocyte count. Neutrophils, lymphocytes, and monocytes were counted using a light microscope under a 100 $\times$ objective lens.

Measurement of biochemical markers in serum

The levels of urea, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), creatine phosphokinase (CPK), creatine kinase MB isoenzyme (CK-MB), alkaline phosphatase, protein total, albumin, and globulin were determined in plasma samples by using kits obtained from ROCHE (Roche Diagnostics Ltd), according the manufacturer's instructions. The concentration of biochemical markers was determined from standard curves in the Cobas[®] Integra 400 equipment (Cobas Integra, Roche Diagnostics Ltd).

Measurement of cytokines

The lung, liver, heart, spleen, and kidney were homogenized, centrifugated (3220 $\times\text{g}$ for 10 min at 4°C), and the supernatants were assessed to determine the levels of IL-12p40, IL-10, IFN- γ , and TNF- α by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with antibody pairs purchased from BD Biosciences (Pharmingen, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. The cytokines concentrations were determined concerning a standard curve for each murine recombinant cytokine. The data represent the mean of three independent assays.

Myeloperoxidase (MPO) activity assay

Fragments of lung, liver, heart, kidney, and spleen were individually homogenized in phosphate sodium buffer (50 mM; pH 7.5) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB; 50 mM) and were stocked at -80°C for 24 h. Then, the samples were centrifuged (3000 $\times\text{g}$ for 30 min at 4°C). The supernatant was distributed in 96-well microplates and 50 μL of O-dianisidine (3.51 mg of O-dionisidine in 5 mL of phosphate buffer and 5 μL of H_2O_2 at 30%) was added. The plate was incubated at 37°C for 30 min, and the reaction was

stopped by adding sodium azide (1.0%). Absorbance was recorded at 460 nm using a Power Wave-X microplate scanning spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). The quotient between the optical density value and the organ weight was calculated to express the MPO activity.

Flow cytometry analysis of spleen cells and pulmonary leukocytes

The spleen of each mouse was removed aseptically and transferred to a petri dish, soaked, macerated, and filtered using a nylon strainer (40 μ m) by using RPMI medium. The cellular suspension was centrifuged (300 $\times$ g for 10 min at 4°C), and erythrocytes were depleted with lysis buffer (9 parts 0.16 M ammonium chloride and 1 part 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5) for 5 min in an ice bath. Then, the cells were fixed in PBS-formaldehyde (3%), washed with PBS-glycine (1%), and with PBS for removing formaldehyde. The number of cells contained in the suspensions was determined, and 5×10^5 cells were incubated with anti-CD4 FITC (clone H129.19), anti-CD8 FITC (clone 53-6.7), anti-CD3 PE (clone 145-2C11), anti-CD11b PE (clone M1/70), anti-CD19 PE (clone 1D3), or IgG Isotype control antibody for 45 min at 4°C. After washing twice with PBS, the cells were analyzed by flow cytometry (Guava easyCyte, Guava Technologies, Millipore, Hayward, CA, USA).

The lung tissues were excised on day 0 and subjected to enzymatic digestion at 37°C for 30 minutes in 1 ml of RPMI medium containing 1 mg/ml of collagenase type IV. After, the tissues were dissociated in a 40- μ m nylon cell strainer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and centrifuged at 300g for 10 min at 4°C with RPMI supplemented with 10% fetal cow serum (FCS). The suspension was erythrocyte-depleted with lysing buffer (9 parts 0.16 M ammonium chloride and one part 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5) for 10 min at 4°C. Afterwards, the pulmonary leukocytes were washed in PBS and the cell concentration was determined. The cells were stained with anti-CD4 FITC (clone H129.19), and anti-CD3 PE (clone 145-2C11) antibodies or IgG Isotype control antibody at 4°C. After 45 min, the cells were washed in PBS and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, Biosciences, CA, USA).

Quantitative reverse transcription (qRT)-PCR of transcription factors

Total RNA was isolated from spleen cells using the TRIzol Reagent, according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription of RNA into cDNA was performed using the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Fitchburg, WI) using oligo(dT). qRT-PCR was performed in 15- μ L reaction mixtures with SYBR Green (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The reactions were performed using the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) under the following conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 sec/60°C for 1 min. Gene expression was quantified using the $\Delta\Delta C_t$ method and normalized to β -actin expression. The following PCR primers were utilized: β -actin (F: 5'-AGCTGCGTTTACACCCTT-3'/R: 5'-AAGCCATGCCAATGTTGTC T-3'); T-bet (F: CACTAAGCAAGGACGGCGAA/R: CCACCAAGACCACATCCAC); GATA-3 (F: AAGAAAGGCA TGAAGGACGC/R: GTGTGCCCCA TTTGGACA TCA); ROR- γ t (F: TGGGAAGATGTGGACTTCGTT/R: TGGTTCCCCAAGTTCAGGAT).

Statistical analysis

Data were analyzed using Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA., USA), and the results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). All statistical determinations for normality were analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test, and homogeneous variance was determined by the Bartlett's test. The difference between means of groups was performed

with analysis of variance for one-way ANOVA test followed by Bonferroni's multiple comparison tests. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Effects of ArtinM administration on body and organ weights of naïve BALB/c mice

ArtinM-induced Th1 immunity provides protection against several fungal and protozoan infections [8–10, 21–24]. Thus, evaluating the effects of ArtinM on naïve mice was mandatory. We adopted a previously standardized protocol [22], and administered ArtinM according to the schedule shown in Fig 1A. Each group of naïve mice received low (0.5 and 1.0 µg) or high (2.5 and 5.0 µg) doses of ArtinM. For the entire experimental period, we daily measured the body weight of animals, and analyzed its variation relative to the initial verification (day -10). The constructed time-lapse curves showed that no significant change in body weight was observed in the ArtinM-injected mice compared to that in the negative control group, which received PBS instead of the lectin (Fig 1B). Moreover, mice injected with LPS (positive control) exhibited body weight loss a day after each endotoxin injection (Fig 1B). Also, at the end of the experimental period (day 0), we measured the weight of the harvested organs (spleen, liver, kidneys, lungs, and heart) and determined the quotients between weight of each organ and body weight at day 0. The relative mass of each organ of mice receiving lower ArtinM doses (0.5–1.0 µg) was similar to that verified in the PBS control group (Fig 1C–1G). Nonetheless, in the group receiving the ArtinM highest dose (5.0 µg), we detected a significantly lower relative mass of the heart and lung than that verified in the PBS control group (Fig 1F and 1G). These results showed that ArtinM administered at the appropriate dose to induce immunomodulation did not promote body weight loss nor did it alter the mass of the organs. However, ArtinM administration at the highest dose reduced the relative mass of the heart and lung.

Evaluation of inflammatory infiltrate in tissues of naïve BALB/c after ArtinM administration

The alteration in organ mass associated with high-dose ArtinM administration propelled us to perform histopathological analysis of the heart, lung, kidney, and liver after the lectin injection. These tissues, stained with H&E, exhibited morphology comparable to that of the control group. Few and discrete perivascular foci of mononuclear inflammatory cells were observed in the heart, lung, and liver of mice receiving high doses of ArtinM or LPS (Fig 2). Moreover, the same group of animals displayed few mononuclear inflammatory cells at the peribronchial and periductal regions of the lung and liver, respectively (Fig 2J, 2K, 2Q and 2R); we visualized no inflammatory infiltrate in the kidney of any experimental group (S1 Fig). A morphometric semiquantitative analysis of the inflammatory foci in the heart, lung, and liver showed that the organs of the mice injected with high doses of ArtinM (2.5 and 5.0 µg) showed higher numbers of inflammatory foci compared to those observed in the PBS control group (Fig 3). Moreover, we verified by flow cytometry a significant increase in the CD4⁺ T cells frequency among pulmonary leukocytes harvested from mice that received high doses of ArtinM (S2 Fig). These findings suggest that ArtinM administration at high doses is associated with the occurrence of inflammatory infiltrates in tissues of naïve mice.

Serum biochemistry of naïve BALB/c mice after ArtinM administration

The observation that some organs of mice receiving high doses of ArtinM present with reduced mass and mild inflammatory infiltrates directed us to examine various serum biochemical parameters. We compared the levels of urea, GOT, GPT, CPK, CK-MB, alkaline

Fig 2. Histopathology of the heart, lung, and liver of naïve BALB/c mice receiving ArtinM. The panels show representative sections (6 µm) of the organs from mice injected with various ArtinM doses or those of the positive (LPS) and negative (PBS) controls groups. The sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and images were captured using a microscope (Nikon Eclipse 50i) coupled to a digital camera (Evolution MP 5.0). The yellow arrows indicate the presence of inflammatory infiltrate at the perivascular, peribronchial, or periductal regions. Magnification bars = 100 µm for all the tissues sections.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151.g002>

Fig 3. Quantitation of inflammatory infiltrate in the heart, lung, and liver of naïve BALB/c mice receiving ArtinM. The inflammatory infiltrate were quantitated in captured images of two tissue sections of 6 µm, obtained at an interval of 60 µm for each organ stained with H&E. The morphometric analysis was performed using the ImageJ software, as described in Material and Methods section. Tissue samples were obtained from mice injected with various ArtinM doses, LPS (positive controls), or PBS (negative controls). Inflammatory cells were counted and represented as number of inflammatory cells/cm². The results are expressed as mean ± SD, and the differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) compared to the PBS control group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151.g003>

phosphatase, protein total, albumin, and globulin in animals treated with or without ArtinM. Although most parameters were similar in mice that received ArtinM or PBS (Fig 4), we found a significant increase in the levels of CK-MB and globulin in animals receiving the highest dose of ArtinM (5.0 µg; Fig 4B and 4I). These results reinforced the idea that ArtinM at high dose may exert a systemic effect in naïve mice.

Fig 4. Serum biochemical parameters of naïve BALB/c mice receiving ArtinM. The serum levels of CPK (A), CK-MB (B), GOT (C), GPT (D), alkaline phosphatase (E), urea (F), total protein (G), albumin (H), and globulin (I) were determined in samples harvested at day 0 from mice that received ArtinM at the specified dose (x axis). PBS and LPS was administered to the negative and positive controls, respectively. Results are expressed as mean ± SD, and differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) compared to the PBS control group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151.g004>

Effect of ArtinM administration on the peripheral blood leukogram and levels of tissue MPO

We evaluated the leukogram of the samples collected at the end of the experimental period (day 0). We found that ArtinM injection at low and high doses, compared to the PBS injection, caused no alteration in the number of neutrophils, lymphocytes, and monocytes (Fig 5A). We also determined the leukogram at subsequent days after ArtinM administration at high doses, and no differences were observed in comparison to the PBS control groups (Fig 5B–5E). In

Fig 5. Blood leukogram of naïve BALB/c mice after ArtinM administration. Total and differential leukocyte counting was performed in blood samples obtained at days 0 (A), -9 (B), -8 (C), -2 (D), and -1 (E) from animals that received ArtinM at the doses specified in each panel, LPS (positive controls), or PBS (negative controls). Results are expressed as mean $\pm$ SEM (A) and mean $\pm$ SD (B–E). Differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) compared to the PBS control group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151.g005>

contrast, LPS administration significantly reduced the number of lymphocytes and monocytes compared to the PBS control group (Fig 5B–5E).

Considering that ArtinM activity induces neutrophil migration and activation, we examined mice organs for the presence of neutrophils, indicated by the grade of MPO activity detected in tissues. The lung, heart, kidney, spleen, and liver were harvested at the experimental period terminus (day 0), and we used the supernatant of the organ homogenate to measure the MPO activity. We found that administration of ArtinM at the highest dose was associated with a significant increase in MPO activity in the lung and heart compared to that observed in the PBS control group (Fig 6A and 6B). However, MPO activity was reduced in the liver of animals injected with 5.0 µg of ArtinM (Fig 6C). Our results indicated that ArtinM administration at the highest dose augments the neutrophil extravasation to tissues of naïve mice.

Tissue levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in naïve BALB/c mice after ArtinM administration

Previous studies have demonstrated that the prophylactic or therapeutic effect of ArtinM against several pathogens is exerted through the induction of a prominent production of pro-inflammatory cytokines [8, 21, 22]. In the current study, we verified that ArtinM at high doses induces mild tissue infiltration of inflammatory cells. Then, we compared the IL-12, IFN-γ, IL-10, and TNF-α levels in homogenates of organs from ArtinM-, PBS-, and LPS-injected mice. No significant difference was observed among the groups regarding the concentration of cytokines observed in the liver, kidney, and spleen (Fig 7I–7T). Interestingly, lower IL-10 levels were detected in the heart and lung of mice receiving 5.0 µg of ArtinM compared to that observed in the PBS control group, whereas no difference was observed in the IL-12, IFN-γ, IL-10, and TNF-α levels (Fig 7D and 7H). Thus, the only substantial alteration was observed in IL-10 levels, which were reduced in the heart and lung tissues after the ArtinM administration at the highest dose.

Phenotype of the spleen cells of ArtinM-injected naïve mice

To investigate whether or not ArtinM administration alters the incidence of immune cell populations, we prepared suspensions of spleen cells that were harvested at day 0 from mice of the

Fig 6. MPO activity in organs of naïve BALB/c mice after ArtinM administration. The supernatant of the homogenates of organs obtained at day 0 was incubated with O-dianisidine at 37°C for 30 min to measure the MPO activity, which was represented as optical density (OD)/organ mass (mg). The organs were lung (A), heart (B), liver (C), kidney (D), and spleen (E). Animals received ArtinM at the specified doses, PBS (negative control), or LPS (positive control). Results are expressed as mean ± SD, and the differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) compared to the PBS control group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151.g006>

Fig 7. Cytokine levels in tissues of naïve BALB/c mice after ArtinM administration. The levels of IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , and IL-10 in the supernatant of organ homogenates obtained at the day 0 were assessed by ELISA. The organs were heart (A–D), lung (E–H), liver (I–L), kidney (M–P), and spleen (Q–T). Animals received ArtinM at the specified doses, PBS (negative control), or LPS (positive control). Results are expressed as mean $\pm$ SD, and the differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) compared to the PBS control group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151.g007>

experimental and control groups. The cell suspensions were analyzed by flow cytometry to determine the relative frequency of the major cell populations in the spleen. We found a significant increase in CD4⁺ T and B cells in mice receiving different ArtinM doses compared to that observed in the PBS control group (Fig 8A and 8C). In contrast, the frequency of CD8⁺ T and CD11b cells in the spleen of ArtinM-injected mice was similar to that observed in the PBS control group (Fig 8B and 8D). Our results indicate that ArtinM administration augments the frequency of Th and B cells in the spleen of naïve mice.

Fig 8. Relative frequency of cell populations in the spleen of naïve BALB/c mice after ArtinM administration. Cell suspension prepared from the mice spleen harvested at day 0 was assessed by flow cytometry. The frequency of CD4⁺ T (A), CD8⁺ T (B), B (C), and CD11b⁺ cells (D) was determined by reacting the cells with anti-CD4 FITC, anti-CD8 FITC, anti-CD3 PE, anti-CD19 PE, and anti-CD11b PE antibodies. Animals received ArtinM at the specified doses, PBS (negative control), or LPS (positive control). Results are expressed in percentage and are represented as mean $\pm$ SD. Differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) compared to the PBS control group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151.g008>

The higher frequency of CD4⁺ T cells in the spleen of mice receiving ArtinM propelled us to assess the relative expression of transcription factors involved in differentiation of Th cells, namely T-bet (Th1 cells), GATA-3 (Th2 cells), and ROR-γt (Th17 cells), by RT-PCR. The only significant difference observed between ArtinM- and PBS-injected groups was the augmented GATA-3 expression in animals receiving the highest ArtinM dose (5.0 μg; Fig 9C). However, administration of ArtinM, even at high doses, did not modify the relative expression of T-bet and ROR-γt (Fig 9A and 9B) in spleen cells. These results suggest that the augmented frequency of CD4⁺ T cells detected in the spleen of ArtinM-injected naïve mice was not associated with changes in the relative expression of transcription factors associated with T cell differentiation.

Discussion

The immunomodulatory activity of ArtinM depends on the recognition of TLR2 N-glycans, which drives the immunity toward the Th1 axis and confers protection against several intracellular pathogens. Considering the potential applicability of ArtinM as a therapeutic agent and the consequent necessity of evaluating its collateral effects, we investigated the systemic effects of ArtinM administration at different doses in naïve BALB/c mice. We observed that high doses of ArtinM induced augmentation of the serum levels of CK-MB and globulin, inflammatory infiltrates in several tissues, and increased MPO and IL-10 levels in the heart and lungs. However, naïve BALB/c mice receiving low doses of ArtinM displayed increased frequency of CD4⁺ T and B cells in the spleen. Low doses of ArtinM that are therapeutic against experimental infections [8, 10, 21–24] did not exert any deleterious effects in healthy mice, in contrast with the systemic consequences of ArtinM injection at higher doses.

The adopted protocol of ArtinM administration, shown in Fig 1A, was designed on the basis of previous standardization [8, 10, 21, 22, 24, 32, 33] that was demonstrated to confer resistance against several intracellular pathogens [8, 10, 21–24].

The s.c. route of protein injection, compared to oral administration, affords the advantage of preventing the molecule from losing its stability due to hydrolysis occurring in the protein passage through the gastrointestinal tract and favoring protein bioavailability [34]. Previous studies have shown that proteins with a high isoelectric point (pI) [34, 35] exhibit a positive correlation between their molecular mass (MM) and half-life permanence at the injection site [34, 36]. Molecules that are injected s.c. may be transported through the blood and/or lymphatic vessels in a manner that is dependent on the MM. The blood capillaries preferentially distribute molecules with MM lower than 1 kDa [37], whereas the lymphatic system drains

Fig 9. Relative expression of transcription factors related to the differentiation of T helper cells in the spleen of naïve BALB/c mice after ArtinM administration. Total RNA was extracted from the mice spleen harvested at day 0. The total RNA was reverse-transcribed into cDNA, and the relative expression of T-bet (A), GATA-3 (B), and ROR-γt (C) was determined by real-time quantitative PCR. Animals received ArtinM at the specified doses, PBS (negative control), or LPS (positive control). The values were normalized to β-actin expression. Results are expressed as mean ± SD, and the levels of relative expression were compared to the PBS control group. Differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) compared to the PBS control group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151.g009>

molecules with MM >16 kDa [36–40]. ArtinM is a homotetramer consisting of 16-kDa subunits [17], a feature that allows us to predict that s.c. injected ArtinM is captured and transported by the lymphatic system. Since that ArtinM was injected in the groin, a region that is enriched with lymph nodes, its presence in the secondary lymphoid tissue could induce a specific adaptive response. Nonetheless, s.c. injected ArtinM at a therapeutic dose, even if associated with a Freund's adjuvant, does not trigger a detectable specific immune response (Coltri et al., unpublished data). However, in infected mice, in which the sensitized macrophages and dendritic cells display increased TLR expression in response to the pathogen stimulus, ArtinM elicits additional cell activation through the recognition of TLR2 N-glycans, generation of M1 macrophages, and induction of Th1 responses [8, 21, 23] (da Silva et al. unpublished data). Thus, we found that s.c. injected ArtinM does not alter TLR2 expression in the spleen cell suspension compared to that in the PBS control group (S3 Fig), although macrophages under ArtinM stimulus significantly increase TLR2 expression [41]. Regarding that we did not find an altered cytokine profile in naïve BALB/c mice, we assumed that ArtinM administered at a therapeutic dose does not influence the immune system of the animals. After passing through the lymph nodes, s.c. injected ArtinM enters the thoracic lymph duct and reaches the blood vessels allowing systemic distribution of the proteins [40, 42]. ArtinM capture by the lymphatic system makes possible the lectin to pass through the appropriate circuit for exerting its immunomodulatory effect, while preserving its bioavailability as an immunomodulatory agent and reproducing advantages that were already reported for vaccines and adjuvants [36, 42, 43]. Recently, Broad et al. demonstrated that mice maintained in an enriched environment (EE) favors the modulation of their immune response, determined by infecting the mice and verifying that the inflammatory response favors the resolution of the systemic infection [44]. The immunomodulation induced by EE and ArtinM are similar because both are imperceptible in naïve mice but notable in infected animals [44].

In our experiments, the s.c. injection of LPS was used as the positive control; its systemic effects such as the reduction in weight body occurred within 24 h after administration, as previously reported in naïve C57BL/6 mice [45, 46]. Similarly, in the present study, we observed a reduction in body weight of naïve BALB/c mice 96 h after s.c. injecting LPS. These findings demonstrate that s.c. injected LPS presents high bioavailability, which is probably related to its MM, and could be changed by aggregating the molecule [34, 36]. Body weight of the mice receiving ArtinM at different doses did not alter compared to the body weight of mice in the PBS control group. However, this observation cannot be attributed to a low bioavailability of ArtinM since the positive control was active and other systemic effects of ArtinM at high doses were manifested, such as change in organ weight and the presence of tissue inflammatory infiltrates.

Histopathological analysis of different mice organs allows detection of the systemic effects of an immunomodulatory agent administration to naïve mice. However, this approach has not been executed previously to evaluate the effect of an agent that recognizes N-glycans to interact with TLR2 and modulates the host immunity. In the current study, we performed histological analysis of the heart, kidney, lung, and liver of naïve BALB/c mice injected with ArtinM. Interestingly, we did not observe morphological alterations in the tissues from naïve animals that received a low ArtinM dose (0.5 µg, dosage administered to prevent or treat infections) compared to those in the tissues from the PBS control group. Otherwise, administration of ArtinM at high doses was associated with the presence of discrete foci of mononuclear cells infiltration in the heart, lung, and liver. The infiltration was prominent in the perivascular, peribronchial, and periductal areas, indicating that ArtinM administration at high doses has systemic effects in naïve BALB/c mice. These findings support the microscopic detection of discrete mononuclear cells infiltrations and show a high frequency of CD4⁺ T cells in the lung obtained from

naïve mice that received high doses of ArtinM (S2 Fig). Our observations reinforce our postulation that s.c. administration of ArtinM is appropriate for exerting its systemic effects, likely facilitated by the protein passage throughout the cardiac and pulmonary circulation [34, 36–40, 42]. We suppose that the inflammatory infiltrate verified in the heart, lung, and liver of naïve BALB/c mice treated with high ArtinM doses may also occur in the unexamined organs of these animals.

The evaluation of serum biochemical parameters revealed additional systemic effects of ArtinM administration at high doses to naïve BALB/c mice, concerning the increased serum levels of globulins and CK-MB. Previous study reported that ArtinM induces polyclonal B cell activation, followed by high immunoglobulins secretion, in a manner that is T cell-independent [47]. Recently, our group demonstrated that ArtinM induces the activation of murine CD4⁺ and CD8⁺ T cells [13, 14, 48], whereas in the present work we found that ArtinM treated mice exhibit a significant increase in the frequency of CD4⁺ T and B cells in the spleen (Fig 8). The ability of ArtinM to elicit the activation of adaptive immune cells [13, 14, 48] seems to be related to augmented production of immunoglobulins and the resultant alteration in the serum proteins. The augmented levels of CK-MB that follow the ArtinM administration at high doses may be associated with the presence of mononuclear cells and high levels of MPO in the heart. It is well established that MPO has pleiotropic actions, directly linked with the interference of MPO-derived oxidants with numerous cell functions, contributing to tissue injury in a wide spectrum of diseases. Nonetheless, the most prominent MPO effect is exerted on the initiation and the propagation of a number of cardiac pathologies [49, 50]. It was demonstrated that high levels of MPO can generate a cytotoxic effect in cardiac tissue [49–51]. Moreover, the early MPO releasing does not require the existence of a previous morphological alteration [49]. Thus, we postulate that s.c. administered ArtinM is systemically bioavailable. The low levels of FAL verified in naïve BALB/c mice after LPS administration are probably due to the ability of FAL to dephosphorylate and inactivate LPS. The catalytic activity and enzymatic turnover that follow FAL–LPS interaction reduce the FAL levels [52–54].

Considering that ArtinM activates innate and adaptive immune cells [8, 13–15, 17, 55–58], we performed leukograms of blood samples harvested from naïve BALB/c mice treated with different doses of ArtinM. Samples collected at 24 and 48 h after the s.c. injections of ArtinM provided leukograms that did not differ from those of the PBS control mice, whereas s.c. injected LPS promoted a significant decrease in the total leukocyte number within 24 h. Interestingly, the measurement of MPO activity revealed a significantly augmented number of neutrophils in the heart and lungs of the naïve BALB/c mice receiving ArtinM at high doses. These findings are corroborated by previous studies that observed the ArtinM capacity to induce the adhesion and haptotactic migration neutrophil in lung [16, 17, 56], and the proinflammatory activity of neutrophils is capable to exert a deleterious effect in the heart [45, 46].

The ability of ArtinM to modulate the immune response of infected BALB/c mice led us to characterize the profile of cytokines harvested from the organs of naïve mice receiving s.c. injections of ArtinM. Mice receiving ArtinM at high doses displayed reduced IL-10 content in the heart and lungs, which in addition to the increased MPO activity indicates a proinflammatory environment promoted by ArtinM at high doses. Concerning the phenotypic profile of spleen cells, we demonstrated a significant increase in the frequency of CD4⁺ T cells, which was not associated with higher incidences of Th and B cells, following s.c. injections of ArtinM at different doses. These findings corroborate with our hypothesis that the initial ArtinM distribution by lymphatic system favors the lectin to exert its effect on immune cells.

In conclusion, our study demonstrates that s.c. injection of ArtinM at high doses to naïve BALB/c mice induces a proinflammatory response that accounts for deleterious effects in the animals. In contrast, the administration of ArtinM at therapeutic doses, which were previously

standardized in murine models of infections caused by various intracellular pathogens, does not exert a deleterious effect in naïve BALB/c mice. Moreover, s.c. administration of ArtinM is appropriate to preserve its bioavailability, which is desirable for its application as an immunomodulatory agent to confer resistance to murine models of human infectious diseases.

Supporting information

S1 Fig. Histopathology of the kidney of naïve BALB/c mice after ArtinM administration.

The panels show representative images of kidney sections harvested at day 0 from mice receiving ArtinM at the specified doses, PBS (negative control), or LPS (positive control). The sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and images were captured using a microscope (Nikon Eclipse 50i) coupled to a digital camera (Evolution MP 5.0). Magnification bars = 100 µm for all sections.

(TIF)

S2 Fig. Relative frequency of CD4⁺ T cells in the lung of naïve BALB/c mice that were injected with ArtinM at high doses. Pulmonary leukocytes harvested from naïve mice at day 0 following administration of ArtinM at high doses (2.5 µg and 5.0 µg) or PBS alone (negative control). The cells were stained with anti-CD4 FITC and anti-CD3 PE antibodies and the CD4⁺ T cells frequency was determined by flow cytometry. The results are expressed in percentage and represent the mean ± SD; the differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) or $p < 0.001$ (***) compared to PBS control group.

(TIF)

S3 Fig. Relative expression of TLR2 in the spleen cells of naïve BALB/c mice after ArtinM administration. Total RNA was extracted from the spleen cells harvested at day 0 and was reverse-transcribed into cDNA. The relative expression of TLR2 was determined by real-time quantitative PCR for mice receiving ArtinM at the specified doses, PBS (negative control), or LPS (positive control). The values were normalized to β-actin expression. Results are expressed as mean ± SD, and the levels of relative expression were compared to the PBS control group. Differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) compared to the PBS control group.

(TIF)

Acknowledgments

We thank João Batista Pereira, Júlio César R. Pereira, Patricia E. Vendruscolo, Sandra M.O. Thomaz, and Érica Vendruscolo for technical support, and Domingos Soares de Souza Filho for expert animal care. We also thank Patricia Vianna Bonini Palma (Flow cytometry of the Regional Blood Center) for helpful in flow cytometry. This research was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (grant numbers 2012/09611-0, 2013/04088-0, 2014/16003-1, 2016/04877-2, 2016/10446-4, 2016/23112-7, 2016/23044-1), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (475357/2013-2), Financiadora de Estudos e Projetos (0110045900), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Author Contributions

Conceptualization: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito, Maria Cristina Roque-Barreira, Thiago Aparecido da Silva.

Data curation: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito, Maria Cristina Roque-Barreira, Thiago Aparecido da Silva.

Formal analysis: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito, Javier Emílio Lazo Chica, Maria Cristina Roque-Barreira, Thiago Aparecido da Silva.

Funding acquisition: Maria Cristina Roque-Barreira, Thiago Aparecido da Silva.

Investigation: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito, Thiago Eleutério Gonçalves, Fabrício Freitas Fernandes, Camila Botelho Miguel, Wellington Francisco Rodrigues, Javier Emílio Lazo Chica, Thiago Aparecido da Silva.

Methodology: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito, Javier Emílio Lazo Chica, Thiago Aparecido da Silva.

Project administration: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito, Thiago Aparecido da Silva.

Resources: Thiago Aparecido da Silva.

Supervision: Thiago Aparecido da Silva.

Validation: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito, Thiago Aparecido da Silva.

Visualization: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito.

Writing – original draft: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito, Maria Cristina Roque-Barreira, Thiago Aparecido da Silva.

Writing – review & editing: Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito, Maria Cristina Roque-Barreira, Thiago Aparecido da Silva.

References

1. Peumans WJ, Van Damme EJ. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 1995; 109(2):347–52. PMID: [7480335](#); PubMed Central PMCID: [PMC4157596](#).
2. Carneiro RF, de Melo AA, Nascimento FE, Simplicio CA, Nascimento KS, Rocha BA, et al. Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. *J Mol Recognit.* 2013; 26(1):51–8. doi: [10.1002/jmr.2243](#). PMID: [23280618](#).
3. Gilboa-Garber N, Mizrahi L, Garber N. Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Biochem.* 1977; 55(9):975–81. PMID: [409463](#).
4. Ottensooser F, Nakamizo Y, Sato M, Miyamoto Y, Takizawa K. Lectins detecting group C streptococci. *Infect Immun.* 1974; 9(5):971–3. PMID: [4824637](#); PubMed Central PMCID: [PMC414918](#).
5. Sharon N. Lectins: past, present and future. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36(Pt 6):1457–60. doi: [10.1042/BST0361457](#). PMID: [19021575](#).
6. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 2004; 14(11):53R–62R. doi: [10.1093/glycob/cwh122](#). PMID: [15229195](#).
7. Mariano VS, Zorzetto-Fernandes AL, da Silva TA, Ruas LP, Nohara LL, Almeida IC, et al. Recognition of TLR2 N-glycans: critical role in ArtinM immunomodulatory activity. *PLoS One.* 2014; 9(6):e98512. doi: [10.1371/journal.pone.0098512](#). PMID: [24892697](#); PubMed Central PMCID: [PMC4043963](#).
8. Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira MC, Silva JS. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology.* 2001; 11(12):1035–42. PMID: [11805076](#).
9. Souza MA, Carvalho FC, Ruas LP, Ricci-Azevedo R, Roque-Barreira MC. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J.* 2013; 30(7):641–57. doi: [10.1007/s10719-012-9464-4](#). PMID: [23299509](#); PubMed Central PMCID: [PMC3769584](#).
10. Teixeira CR, Cavassani KA, Gomes RB, Teixeira MJ, Roque-Barreira MC, Cavada BS, et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine.* 2006; 24(15):3001–8. doi: [10.1016/j.vaccine.2005.11.067](#). PMID: [16455170](#).

11. Mifsud EJ, Tan AC, Jackson DC. TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. *Front Immunol*. 2014; 5:79. doi: [10.3389/fimmu.2014.00079](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00079). PMID: [24624130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24624130/); PubMed Central PMCID: PMC43939722.
12. Unitt J, Hornigold D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochem Pharmacol*. 2011; 81(11):1324–8. doi: [10.1016/j.bcp.2011.03.010](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.010). PMID: [21420389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21420389/).
13. da Silva TA, Mariano VS, Sardinha-Silva A, de Souza MA, Mineo TW, Roque-Barreira MC. IL-17 Induction by ArtinM is Due to Stimulation of IL-23 and IL-1 Release and/or Interaction with CD3 in CD4+ T Cells. *PLoS One*. 2016; 11(2):e0149721. doi: [10.1371/journal.pone.0149721](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149721). PMID: [26901413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26901413/); PubMed Central PMCID: PMC4767177.
14. Silva TA, Souza MA, Cecilio NT, Roque-Barreira MC. Activation of spleen cells by ArtinM may account for its immunomodulatory properties. *Cell Tissue Res*. 2014; 357(3):719–30. doi: [10.1007/s00441-014-1879-8](https://doi.org/10.1007/s00441-014-1879-8). PMID: [24842046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24842046/); PubMed Central PMCID: PMC4148593.
15. Pereira-da-Silva G, Moreno AN, Marques F, Oliver C, Jamur MC, Panunto-Castelo A, et al. Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760(1):86–94. doi: [10.1016/j.bbagen.2005.09.011](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.09.011). PMID: [16260092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16260092/).
16. Ganiko L, Martins AR, Espreafico EM, Roque-Barreira MC. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. *Glycoconj J*. 1998; 15(5):527–30. PMID: [9881756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9881756/).
17. Santos-de-Oliveira R, Dias-Baruffi M, Thomaz SM, Beltrami LM, Roque-Barreira MC. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J Immunol*. 1994; 153(4):1798–807. PMID: [8046246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8046246/).
18. Cecilio NT, Carvalho FC, Liu Y, Moncrieffe M, Buranello PA, Zorzetto-Fernandes AL, et al. Yeast expressed ArtinM shares structure, carbohydrate recognition, and biological effects with native ArtinM. *Int J Biol Macromol*. 2016; 82:22–30. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2015.09.062](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.062). PMID: [26433176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26433176/).
19. Liu L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J Pharm Sci*. 2015; 104(6):1866–84. doi: [10.1002/jps.24444](https://doi.org/10.1002/jps.24444). PMID: [25872915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25872915/).
20. Moreno AN, Jamur MC, Oliver C, Roque-Barreira MC. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003; 132(3):221–30. <https://doi.org/10.1002/ia.1003> PMID: [14646383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14646383/).
21. Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF, Vendruscolo PE, Martinez R, Goldman MH, et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol*. 2008; 173(2):423–32. doi: [10.2353/ajpath.2008.080126](https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080126). PMID: [18599609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18599609/); PubMed Central PMCID: PMC2475779.
22. Coltri KC, Oliveira LL, Ruas LP, Vendruscolo PE, Goldman MH, Panunto-Castelo A, et al. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. *Med Mycol*. 2010; 48(6):792–9. doi: [10.3109/13693780903501671](https://doi.org/10.3109/13693780903501671). PMID: [20392144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20392144/).
23. Custodio LA, Loyola W, Conchon-Costa I, da Silva Quirino GF, Felipe I. Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(10):1510–5. doi: [10.1016/j.intimp.2011.05.005](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.005). PMID: [21609786](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21609786/).
24. Cardoso MR, Mota CM, Ribeiro DP, Santiago FM, Carvalho JV, Araujo EC, et al. ArtinM, a D-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. *Vaccine*. 2011; 29(49):9183–93. doi: [10.1016/j.vaccine.2011.09.136](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.136). PMID: [22001880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22001880/).
25. Basto AP, Leitao A. Targeting TLR2 for vaccine development. *J Immunol Res*. 2014; 2014:619410. doi: [10.1155/2014/619410](https://doi.org/10.1155/2014/619410). PMID: [25057505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057505/); PubMed Central PMCID: PMC4098989.
26. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9(4):293–307. doi: [10.1038/nrd3203](https://doi.org/10.1038/nrd3203). PMID: [20380038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20380038/).
27. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med*. 2007; 13(5):552–9. doi: [10.1038/nm1589](https://doi.org/10.1038/nm1589). PMID: [17479101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17479101/).
28. Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol*. 2005; 6(12):1198–205. doi: [10.1038/ni1274](https://doi.org/10.1038/ni1274). PMID: [16369559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16369559/).
29. Sansonetti PJ. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol*. 2006; 7(12):1237–42. doi: [10.1038/ni1420](https://doi.org/10.1038/ni1420). PMID: [17110939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17110939/).
30. Kiura K, Hasebe A, Saeki A, Segawa T, Okada F, Shamsul HM, et al. In vivo anti- and pro-tumour activities of the TLR2 ligand FSL-1. *Immunobiology*. 2011; 216(8):891–900. doi: [10.1016/j.imbio.2011.02.006](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.02.006). PMID: [21496943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21496943/).

31. Mele T, Madrenas J. TLR2 signalling: At the crossroads of commensalism, invasive infections and toxic shock syndrome by *Staphylococcus aureus*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42(7):1066–71. doi: [10.1016/j.biocel.2010.03.021](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.021). PMID: [20363358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20363358/).
32. Alegre AC, Oliveira AF, Dos Reis Almeida FB, Roque-Barreira MC, Hanna ES. Recombinant paracocin reproduces the biological properties of the native protein and induces protective Th1 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(4):e2788. doi: [10.1371/journal.pntd.0002788](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002788). PMID: [24743161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24743161/); PubMed Central PMCID: [PMC3990478](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3990478/).
33. Alegre-Maller AC, Mendonca FC, da Silva TA, Oliveira AF, Freitas MS, Hanna ES, et al. Therapeutic administration of recombinant Paracocin confers protection against *paracoccidioides brasiliensis* infection: involvement of TLRs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(12):e3317. doi: [10.1371/journal.pntd.0003317](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003317). PMID: [25474158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25474158/); PubMed Central PMCID: [PMC4256291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4256291/).
34. Shah DK. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for the next generation protein therapeutics. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2015; 42(5):553–71. doi: [10.1007/s10928-015-9447-8](https://doi.org/10.1007/s10928-015-9447-8). PMID: [26373957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26373957/); PubMed Central PMCID: [PMC4593704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4593704/).
35. Zheng Y, Tesar DB, Benincosa L, Birnbock H, Boswell CA, Bumbaca D, et al. Minipig as a potential translatable model for monoclonal antibody pharmacokinetics after intravenous and subcutaneous administration. *MAbs*. 2012; 4(2):243–55. doi: [10.4161/mabs.4.2.19387](https://doi.org/10.4161/mabs.4.2.19387). PMID: [22453096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22453096/); PubMed Central PMCID: [PMC3361660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361660/).
36. Wu F, Bhansali SG, Law WC, Bergey EJ, Prasad PN, Morris ME. Fluorescence imaging of the lymph node uptake of proteins in mice after subcutaneous injection: molecular weight dependence. *Pharm Res*. 2012; 29(7):1843–53. doi: [10.1007/s11095-012-0708-6](https://doi.org/10.1007/s11095-012-0708-6). PMID: [22373666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22373666/).
37. Supersaxo A, Hein WR, Steffen H. Effect of molecular weight on the lymphatic absorption of water-soluble compounds following subcutaneous administration. *Pharm Res*. 1990; 7(2):167–9. PMID: [2137911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2137911/).
38. Porter CJ. Drug delivery to the lymphatic system. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1997; 14(4):333–93. PMID: [9450175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9450175/).
39. Porter CJ, Charman SA. Lymphatic transport of proteins after subcutaneous administration. *J Pharm Sci*. 2000; 89(3):297–310. doi: [10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200003\)89:3<297::AID-JPS2>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200003)89:3<297::AID-JPS2>3.0.CO;2-P). PMID: [10707011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10707011/).
40. Porter CJ, Edwards GA, Charman SA. Lymphatic transport of proteins after s.c. injection: implications of animal model selection. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; 50(1–2):157–71. PMID: [11489338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11489338/).
41. da Silva TA, Zorzetto-Fernandes ALV, Cecilio NT, Sardinha-Silva A, Fernandes FF, Roque-Barreira MC. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. *Sci Rep*. 2017; 7(1):7083. doi: [10.1038/s41598-017-07397-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-07397-0). PMID: [28765651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28765651/); PubMed Central PMCID: [PMC5539197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5539197/).
42. Trevaskis NL, Kaminskis LM, Porter CJ. From sewer to saviour—targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity. *Nat Rev Drug Discov*. 2015; 14(11):781–803. doi: [10.1038/nrd4608](https://doi.org/10.1038/nrd4608). PMID: [26471369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26471369/).
43. Andorko JI, Hess KL, Jewell CM. Harnessing biomaterials to engineer the lymph node microenvironment for immunity or tolerance. *AAPS J*. 2015; 17(2):323–38. doi: [10.1208/s12248-014-9708-2](https://doi.org/10.1208/s12248-014-9708-2). PMID: [25533221](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25533221/); PubMed Central PMCID: [PMC4365095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4365095/).
44. Brod S, Gobetti T, Gittens B, Ono M, Perretti M, D'Acquisto F. The impact of environmental enrichment on the murine inflammatory immune response. *JCI Insight*. 2017; 2(7):e90723. doi: [10.1172/jci.insight.90723](https://doi.org/10.1172/jci.insight.90723). PMID: [28405616](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28405616/); PubMed Central PMCID: [PMC5374068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5374068/) exists.
45. Bubalo N, Nguyen P, Nguyen T, Abramson T, Wilkinson K. Characterization of the immune response in male and female mice following lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. *Faseb J*. 2014; 28(1). PubMed PMID: [WOS:000346651001213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/250034665/).
46. Kim KK, Jin SH, Lee BJ. Herpes virus entry mediator signaling in the brain is imperative in acute inflammation-induced anorexia and body weight loss. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013; 28(3):214–20. doi: [10.3803/EnM.2013.28.3.214](https://doi.org/10.3803/EnM.2013.28.3.214). PMID: [24396681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24396681/); PubMed Central PMCID: [PMC3811702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811702/).
47. de Miranda-Santos IK, Mengel JOJ, Bunn-Moreno MM, Campos-Neto A. Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediated by a lectin distinct from jacalin. *J Immunol Methods*. 1991; 140(2):197–203. PMID: [2066566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2066566/).
48. da Silva TA, Oliveira-Brito PKM, Goncalves TE, Vendruscolo PE, Roque-Barreira MC. ArtinM Mediates Murine T Cell Activation and Induces Cell Death in Jurkat Human Leukemic T Cells. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(7). doi: [10.3390/ijms18071400](https://doi.org/10.3390/ijms18071400). PMID: [28665310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28665310/); PubMed Central PMCID: [PMC5535893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5535893/).
49. Anatoliotakis N, Deftereos S, Bouras G, Giannopoulos G, Tsounis D, Angelidis C, et al. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem*. 2013; 13(2):115–38. PMID: [23470074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23470074/).

50. Issac TT, Dokainish H, Lakkis NM. Role of inflammation in initiation and perpetuation of atrial fibrillation: a systematic review of the published data. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 50(21):2021–8. doi: [10.1016/j.jacc.2007.06.054](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.06.054). PMID: [18021867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18021867/).
51. Van der Zwan LP, Scheffer PG, Dekker JM, Stehouwer CD, Heine RJ, Teerlink T. Hyperglycemia and oxidative stress strengthen the association between myeloperoxidase and blood pressure. *Hypertension*. 2010; 55(6):1366–72. doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147231](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147231). PMID: [20385972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20385972/).
52. Bentala H, Verweij WR, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K. Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. *Shock*. 2002; 18(6):561–6. PMID: [12462566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12462566/).
53. Lalles JP. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr Rev*. 2014; 72(2):82–94. doi: [10.1111/nure.12082](https://doi.org/10.1111/nure.12082). PMID: [24506153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24506153/).
54. Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, Kamps JA, Hardonk MJ, Meijer DK. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *Am J Pathol*. 1997; 151(4):1163–9. PMID: [9327750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9327750/); PubMed Central PMCID: [PMC1858034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1858034/).
55. Barbosa-Lorenzi VC, Buranello PA, Roque-Barreira MC, Jamur MC, Oliver C, Pereira-da-Silva G. The lectin ArtinM binds to mast cells inducing cell activation and mediator release. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 416(3–4):318–24. doi: [10.1016/j.bbrc.2011.11.033](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.033). PMID: [22108054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22108054/).
56. Ganiko L, Martins AR, Freymuller E, Mortara RA, Roque-Barreira MC. Lectin KM+-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1721(1–3):152–63. doi: [10.1016/j.bbagen.2004.10.012](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.10.012). PMID: [15652190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15652190/).
57. Ricci-Azevedo R, Oliveira AF, Conrado MC, Carvalho FC, Roque-Barreira MC. Neutrophils Contribute to the Protection Conferred by ArtinM against Intracellular Pathogens: A Study on *Leishmania major*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(4):e0004609. doi: [10.1371/journal.pntd.0004609](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004609). PMID: [27058234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27058234/); PubMed Central PMCID: [PMC4825989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4825989/).
58. Toledo KA, Schwartz C, Oliveira AF, Conrado MC, Bernardes ES, Fernandes LC, et al. Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. *Immunol Lett*. 2009; 123(1):14–20. doi: [10.1016/j.imlet.2009.01.009](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.01.009). PMID: [19428547](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19428547/).

2. Apêndice II

Título: TLR2/CD14 recognition independent response of IL-17-producing B cells to ArtinM

Autores: Patrícia Kellen Martins Oliveira-Brito, Maria Cristina Roque-Barreira, Thiago Aparecido da Silva.

Manuscrito submetido: molecules-343569.

Periódico: Molecules.

User Menu

- Home
- Manage E-Mail Alerts
- Manage E-Mail Newsletters
- Manage Saved Searches
- Change Password
- Edit Profile
- Logout

Submissions Menu

- Submit Manuscript
- Display Submitted Manuscripts
- English Editing
- Discount Vouchers
- Invoices
- Display Co-Authored Manuscripts
- Help

Reviewers Menu

- Reviewing Preferences

Manuscript ID **molecules-343569**
Status Under review
Article type Communication
Title TLR2/CD14 recognition independent response of IL-17-producing B cells to ArtinM
Journal *Molecules*
Section Chemical Biology
Special Issue Immunomodulatory Compounds
Abstract ArtinM, a D-mannose-binding lectin from Artocarpus heterophyllus, activates antigen-presenting cells by recognizing TLR2/CD14 N-glycans, induces cytokines production, and promotes T helper-1 immunity, a process that favors the combat against fungal infections. We recently demonstrated that ArtinM stimulated CD4+ T cells to produce IL-17 through the direct interaction with CD3. Here, we further studied the effects of ArtinM in the IL-17 production by B cell activation. We showed that ArtinM activates murine B cells, showing higher interleukin (IL)-17 and IL-12p40 production. The direct effect of ArtinM was sufficient to induce IL-17 production by B cells, and when we compared the IL-17 levels produced by the B cells purified from the wild-type (WT) and knockout (KO) mice for TLR2 or CD14 in the presence of ArtinM were not distinct between those. Thus, the ArtinM effects on splenic B cells through carbohydrate recognition can contribute to Th17 immunity, but the mechanism involved is not associated with the interaction of ArtinM with TLR2 and CD14. The current work is pioneering in the induction of IL-17 by lectins in B cells.
Keywords IL-17, B cells, ArtinM, TLR2, CD14, carbohydrate recognition
Manuscript File [manuscript.docx](#)
PDF File [manuscript.pdf](#)

Post a preprint of your work immediately at our platform [Preprints](#). After a brief check, our editorial staff will put the full text online within 24 hours, under a Creative Commons CC BY license. [Preprints](#) is free of charge and has the following benefits:

- Your manuscript publicly available before peer review.
- Assignment of a digital object identifier (DOI) to make it immediately citable.
- Update with a new version at any time.
- Indexing in Google Scholar and other search engines.
- Receive feedback via comments from readers.
- Establish precedence for your work.

[Upload to Preprints](#)

Data is of paramount importance to scientific progress, yet most research data drowns in supplementary files or remains private. Enhancing the transparency of the data processes will help to render scientific research results reproducible and thus more accountable. Co-submit your methodical data processing articles or data descriptors for a linked data set in [Data](#) journal to make your data more citable and reliable.

- Deposit your data set in an online repository, obtain the DOI number or link to the deposited data set.
- Download and use the [Microsoft Word template](#) or [LaTeX template](#) to prepare your data article.
- Upload and send your data article to the [Data](#) journal [here](#).

[Submit To Data](#)

Author Information

Submitting Author Thiago da Silva
Corresponding Author Thiago Aparecido da Silva

Author #1 Patrícia Kellen Martins Oliveira-Brito

E-Mail patriciakellen04@hotmail.com

Author #2 Maria Cristina Roque-Barreira

E-Mail mcrbarre@gmail.com

Author #3 Thiago Aparecido da Silva

E-Mail sthiagoap@gmail.com

Manuscript Information

Received Date 30 July 2018

Word Count 4122

Page Count 14

APC information

Journal APC: 1,800.00 CHF

Total Payment Amount: 1,800.00 CHF

Funding

Funding information **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo: 2016/04877-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo: 2016/23112-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo: 2016/10446-4**

Previously Published Papers

da Silva, T.A.; Oliveira-Brito, P.K.M.; Gonçalves, T.E.; Vendruscolo, P.E.; Roque-Barreira, M.C. ArtinM Mediates Murine T Cell Activation and Induces Cell Death in Jurkat Human Leukemic T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1400. doi: [10.3390/ijms18071400](https://doi.org/10.3390/ijms18071400)

Related Papers Published in MDPI Journals

Matsui, K.; Sano, H. T Helper 17 Cells in Primary Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 65. doi: [10.3390/jcm6070065](https://doi.org/10.3390/jcm6070065)

Chehimi, M.; Vidal, H.; Eljaafari, A. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 68. doi: [10.3390/jcm6070068](https://doi.org/10.3390/jcm6070068)

Fabre, J.; Giustiniani, J.; Garbar, C.; Antonicelli, F.; Merrouche, Y.; Bensussan, A.; Bagot, M.; al-Dacak, R. Targeting the Tumor Microenvironment: The Protumor Effects of IL-17 Related to Cancer Type. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1433. doi: [10.3390/ijms17091433](https://doi.org/10.3390/ijms17091433)

Troitskaya, M.; Baysa, A.; Vaage, J.; Sand, K.L.; Maghazachi, A.A.; Valen, G. Interleukin-17 (IL-17) Expression Is Reduced during Acute Myocardial Infarction: Role on Chemokine Receptor Expression in Monocytes and Their *in Vitro* Chemotaxis towards Chemokines. *Toxins* **2012**, *4*, 1427-1439. doi: [10.3390/toxins4121427](https://doi.org/10.3390/toxins4121427)

Awate, S.; Eng, N.F.; Gerdt, V.; Babiuk, L.A.; Mutwiri, G. Caspase-1 Dependent IL-1 β Secretion and Antigen-Specific T-Cell Activation by the Novel Adjuvant, PCEP. *Vaccines* **2014**, *2*, 500-514. doi: [10.3390/vaccines2030500](https://doi.org/10.3390/vaccines2030500)

If you have any questions or concerns, please do not hesitate to contact molecules@mdpi.com.

TLR2/CD14 recognition independent response of IL-17-producing B cells to ArtinM

Patrícia Kellen Martins Oliveira-Brito, Maria Cristina Roque-Barreira, Thiago Aparecido da Silva *

Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail addresses:

Patrícia Kellen Martins Oliveira Brito; patriciakellen04@hotmail.com

Maria Cristina Roque-Barreira; mcrbarre@fmrp.usp.br

Thiago Aparecido da Silva; sthiagoap@gmail.com

*Corresponding author: Thiago Aparecido da Silva, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
Phone: +55 16 3315-3062. Fax: +55 16 3315-0728; E-mail: sthiagoap@gmail.com

Abstract

ArtinM, a D-mannose-binding lectin from *Artocarpus heterophyllus*, activates antigen-presenting cells by recognizing TLR2/CD14 N-glycans, induces cytokines production, and promotes T helper-1 immunity, a process that favors the combat against fungal infections. We recently demonstrated that ArtinM stimulated CD4⁺ T cells to produce IL-17 through the direct interaction with CD3. Here, we further studied the effects of ArtinM in the IL-17 production by B cell activation. We showed that ArtinM activates murine B cells, showing higher interleukin (IL)-17 and IL-12p40 production. The direct effect of ArtinM was sufficient to induce IL-17 production by B cells, and when we compared the IL-17 levels produced by the B cells purified from the wild-type (WT) and knockout (KO) mice for TLR2 or CD14 in the presence of ArtinM were not distinct between those. Thus, the ArtinM effects on splenic B cells through carbohydrate recognition can contribute to Th17 immunity, but the mechanism involved is not associated with the interaction of ArtinM with TLR2 and CD14. The current work is pioneering in the induction of IL-17 by lectins in B cells.

Keywords: IL-17, B cells, ArtinM, TLR2, CD14, carbohydrate recognition

Introduction

The interleukin (IL)-17 family (IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, and IL-17F) has amino acid sequence homology and highly conserved cysteine residues; IL-17A has been renamed IL-17 [1]. The IL-17 family of cytokines is mainly produced by a distinct lineage of CD4⁺ T helper (Th) lymphocytes, known as Th17 cells, and the transcription factor RAR-related orphan receptor γ T (ROR γ T) is induced by IL-6 and IL-23 via STAT3, which is essential for the Th17 lineage [2]. Th17 polarization is also induced by low doses of TGF- β , together with IL-6, and the combination of IL-6, IL-1 β , and IL-23 is sufficient for the development of Th17 cells in mice [3]. The other cells capable of producing IL-17 are CD8⁺

T cells, known as Tc17 cells [4,5], $\gamma\delta$ T cells [6,7], invariant natural killer T (iNKT) cells [8,9], natural killer (NK) cells [10,11], and type 3 innate lymphoid cells (ILC3) [12,13]. Recently, Bernejo et al. showed that mature cells of the B lineage act as innate-like producers of IL-17 in response to infection with *Trypanosoma cruzi* [14,15]. This work also demonstrated that splenic B cells do not produce IL-17 after stimulation with TLR2, TLR4, or TLR9 ligands; otherwise, the *T. cruzi* trans-sialidase induces IL-17 production by remodeling the glycoproteins on the cell surface of B cells that lack the TLR signal transduction pathway [14,15].

ArtinM, a D-mannose-binding lectin obtained from the seeds of *Artocarpus heterophyllus*, is a homotetramer formed by 16-kDa non-glycosylated subunits [16]. Each polypeptide chain contains a carbohydrate recognition domain (CRD) with affinity for Mana1- 3[Mana1-6]Man [17,18]. It is well established that the ArtinM interaction with TLR2/CD14 N-glycans on innate immune cells induces the IL-12 production and establishment of Th1 immunity [19,20]. Moreover, our previous study showed that ArtinM promotes the induction of IL-17 release by directly targeting CD4⁺ T cells via an interaction with CD3. Furthermore, we found that ArtinM-induced IL-17 production by spleen cells was inhibited by 30% in the absence of B cells [21]. In addition, we verified that stimulation of murine spleen cells with ArtinM induced IL-17 production at levels significantly higher than those detected in the presence of plant lectins with distinct specificities for sugar recognition [21,22]. These findings reinforced the importance of investigating the capacity of ArtinM to induce IL-17-producing B cells, and the binding of ArtinM to Toll-like receptor (TLR) 2 and CD14 could be relevant because these receptors are considered to be crucial for the activation of antigen-presenting cells [19]. In the current work, we found that the direct effect of ArtinM on splenic B cells obtained from C57BL/6 mice was that it caused IL-17 production and that

the presence of TLR2 or CD14 was dispensable for the maintenance of the levels of IL-17 induced by ArtinM.

Results

IL-17-producing B cells in the presence of ArtinM

Previously, we identified that ArtinM acts on CD4⁺ T cells to induce IL-17 production by CD3 recognition [21]. Moreover, the IL-17 production induced by ArtinM in spleen cells was impaired after B cell depletion [21]. Thus, we assayed the ArtinM activity in splenic B cells, selected with magnetic beads, and we evaluated the IL-17 production in the culture supernatant by ELISA after 48 h of incubation at 37°C. High levels of IL-17 were detected after ArtinM stimulation, compared to the negative control (medium), and stimulation with a cytokine cocktail of IL-6 (10 ng/mL)/IL-1 β (10 ng/mL)/IL-23 (10 ng/mL) was considered as the positive control (Pos. Ctrl) (Figure 1A). Considering that ArtinM induces high levels of IL-12p40 and IL-6 by antigen-presenting cells via TLR2/CD14 interaction and these cytokines can be produced by B cells in response to TLR agonist, we also measured the levels of IL-12 and IL-6 released by B cells after 48 h of stimulation with ArtinM. We found that only the production of IL-12p40 increased significantly after ArtinM stimulation, compared to the cells in the medium (Figure 1B). Thus, the direct effect of ArtinM was sufficient to induce IL-17- and IL-12p40-production by B cells, which can contribute to the development of Th17- and Th1-cells, respectively.

Figure 1. IL-17 production induced by ArtinM in B cells

Splenic B cells from C57BL/6 mice were purified via magnetic beads, and B cells at a concentration of 2×10^6 cells/mL were distributed in a 48-well plate and incubated for 48 h at 37°C. The cells were incubated with ArtinM [2.5 µg/mL], the positive control (IL-6 [10 ng/mL]; IL-1β [10 ng/mL]; IL-23 [10 ng/mL]), or medium alone (Medium). Culture supernatants were assessed by ELISA for the levels of IL-17 (A), IL-6 (B, left side – white bar), and IL-12p40 (B, right side – black bar). The values (in pg/mL) for the B cells under stimuli were compared with those of the cells in medium. Data are shown as the mean ± SD, and **p < 0.01 and ***p < 0.001 were determined from the analysis of variance (Kruskal-Wallis test), followed by Dunn's multiple comparison test.

IL-17 production induced by ArtinM in B cells is not dependent on TLR2 and CD14 recognition

The immunomodulatory activity of ArtinM on macrophages involves a mechanism that is crucially dependent on TLR2 and the co-receptor CD14 [19,20]. As the TLR pathway can be responsible for the production of pro-inflammatory cytokines in B cells, the interaction of ArtinM with TLR2/CD14 was proposed as the major mechanism related to IL-17 production by B cells, stimulated with ArtinM. Initially, we investigated the capacity of a TLR2 agonist (P3C4) to promote IL-17 production by B cells from WT mice, and the P3C4

stimulation was not sufficient to induce high levels of IL-17 in B cells compared to Medium (Figure 2A). The cytokine cocktail of IL-6 (10 ng/mL)/IL-1 β (10 ng/mL)/IL-23 (10 ng/mL) was considered as the positive control (Pos. Ctrl) (Figure 2A). In Figure 2B, we obtained splenic B cells from wild-type (WT) mice and knockout (KO) mice for TLR2 or CD14, and we compared the IL-17 levels produced by these B cells in the presence of ArtinM. Interestingly, IL-17 production by the B cells from the WT mice in response to ArtinM was not significantly different from that obtained from TLR2KO or CD14KO mice under the same conditions (Figure 2B). These findings demonstrated that the TLR2/CD14 recognition by ArtinM was not critical for the induction of IL-17 production by B cells.

Figure 2. Effect of absence of TLR2 or CD14 on IL-17 production induced by ArtinM on B cells

B cells (1×10^6 /mL) from WT, TLR2 KO, and CD14 KO mice were stimulated with ArtinM (2.5 μ g/mL), P3C4 (1 μ g/mL), the positive control (IL-6 [10 ng/mL]; IL-1 β [10 ng/mL]; IL-23 [10 ng/mL]), or medium alone (Medium) for 48 h at 37°C. (A) IL-17 production was measured by ELISA of the culture supernatant of B cells incubated with P3C4, the positive control, or medium. (B) WT, TLR2 KO, and CD14 KO mice were used to obtain splenic B cells that were stimulated with ArtinM, the positive control, or medium. The culture supernatants were used for the measurement of IL-17 by ELISA, and the cells under stimuli were compared with the cells in medium; the values were also compared between the WT and TLR2 KO or CD14 KO B cells stimulated with ArtinM. Data are shown as the mean $\pm$ SD,

and $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, and not significant (ns) were determined from the analysis of variance (Kruskal-Wallis test), followed by Dunn's multiple comparison test.

Discussion

The known recognition of TLR2/CD14 N-glycans on innate immune cells by ArtinM is essential for inducing Th1 cytokine production, which favors the host immune response against infection by intracellular pathogens [19,23-28]. Otherwise, the ArtinM interaction with the CD3 receptor is associated with the induction of IL-17 in $CD4^+$ T cells, and we also observed that ArtinM induces APCs to express IL-23 and IL-1, which are known to positively influence IL-17 production by $CD4^+$ T cells [21]. In this way, we verified that spleen cell suspensions collected after the depletion of B cells showed a 30% inhibition of the IL-17 production after ArtinM stimulation [21]. Then, in the current work, we evaluated the effect of ArtinM on splenic B cells associated with the induction of IL-17, and the lectin interaction was able to promote IL-17 release by B cells. Interestingly, the recognition of TLR2 or CD14 by ArtinM was not important for the maintenance of the level of IL-17, induced by the lectins, in B cells.

Previous studies in mice have clearly shown that IL-17 has a major role in the host defense against experimental infections of the oral cavity, skin, intestine, lungs, and vagina, of which bacterial and fungal infectious diseases are the main sources [29]. In contrast, the IL-17 family and their receptors are well understood in the context of autoimmunity, autoinflammation, and allergies, which suggests that the balance between pathogenic and protective IL-17 immunity is essential in the application of therapeutic strategies for inflammatory and infectious diseases [29]. In this approach, IL-17-producing B cells are an important field of research, based on the study published by Bermejo *et al.*, 2013 [14,15]. This author described that B cells are the principal source of IL-17 after infection with *T.*

cruzi, and that direct exposure to *T. cruzi* or to the trans-sialidase enzyme from this parasite is responsible for IL-17 production by B cells [14,15]. Our group has been investigating the direct effect of ArtinM on murine T cells to understand the mechanisms involved in the immunomodulatory activity triggered by ArtinM [21,22,30,31], and the capacity of ArtinM to induce IL-17 production by spleen cells and CD4⁺ T cells has been recently reported [21]. Interestingly, we found that the levels of IL-17 induced by ArtinM in spleen cells after B-cell depletion were affected [21], and the polyclonal activation of B cells induced by ArtinM was verified in naïve mice that received ArtinM at various doses [32]. Thus, these findings suggested the involvement of B cells in the immunomodulatory activity induced by ArtinM. The current work on IL-17 production induced by ArtinM in B cells reinforced our hypotheses.

Bermejo et al. described that B cells use alternative IL-17-triggering signals, as demonstrated by infected mice, deficient for the receptor for IL-23 (IL-23R) or deficient in IL-6, and they also observed that B cell–T cell cooperation through the costimulatory receptor CD40 pathway was also not required [14,15]. Additionally, the direct exposure of B cells to *T. cruzi* trypomastigotes or *T. cruzi* trans-sialidase drives the formation of IL-17⁺ B cells via CD45- and Btk-dependent signaling [14,15]. We found that the interaction of ArtinM with B cells was also sufficient to induce high levels of IL-12p40 as well as observed in innate immune cells, while IL-6 production by B cells was not detected in response to ArtinM. These results showed that ArtinM induces IL-17 production by B cells in an IL-6-independent manner while in the development of Th17 cells in mice the IL-6 is essential, then the current study suggested that the IL-17 production by B cells can not be correlated to high levels of IL-6. Further studies should investigate the participation of the CD45 receptor in the effect of ArtinM on B cells, due to the high incidence of N-glycans in this receptor [33], which can be used by the lectin to mediate B cell activation.

Although TLRs can promote IL-17 production by innate cells, the induction of the TLR-signaling pathway in B cells by TLR2, TLR4, and TLR9 ligands did not promote a significant increase in IL-17 production [14,15]. We also observed that the TLR2 agonist (P3C4) was insufficient to induce IL-17 production by splenic B cells, as reported by Bermejo et al. As TLR2 and CD14 recognition by ArtinM on antigen-presenting cells is required to induce immunomodulatory activity [19,20], we assayed IL-17 production by B cells obtained from knockout mice for TLR2 or CD14 in response to ArtinM, for which the levels of IL-17 were not distinct between the B cells from the WT and KO mice. Surprisingly, purified B cells *in vitro* under direct exposure to ArtinM released high levels of IL-17 in a TLR2/CD14-independent manner. Thus, our hypotheses that ArtinM targets CD45 N-glycans on B cells, triggering Src and Btk kinase intracellular signaling, is substantially relevant, and further studies are required to demonstrate this mechanism.

In conclusion, ArtinM stimulates the production of IL-17 by B cells, and the mechanism involved is not associated with the interaction of ArtinM with TLR2 and CD14. The present study demonstrates that ArtinM, through carbohydrate recognition on splenic B cells, can contribute to Th17 immunity. Our work is pioneering in the induction of IL-17 by lectins in B cells and illustrates new strategies to modulate immunity.

Materials and Methods

Ethics statement

The Committee of Ethics in Animal Research of the College of Medicine of Ribeirão Preto at the University of São Paulo approved the animal studies. Protocol no. 54/2016 was conducted in accordance with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Animals

C57BL/6 (WT), TLR2 (C57BL/6 genetic background), and CD14 KO (C57BL/6 genetic background) mice (6–8 weeks old) were used in this study. The mice were acquired from the animal facility of the Ribeirão Preto Medical School at the University of São Paulo and were bred and housed under optimized hygienic conditions at the animal facility of the Molecular and Cellular Biology Department of the Ribeirão Preto Medical School. The mice were anesthetized with xylazine (125 mg/kg) and ketamine (10 mg/kg) in PBS, and their necks were hyperextended and their trachea was exposed after incision.

ArtinM lectin and B cell isolation

ArtinM was purified as described previously [16] from the saline extract of *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) seeds through affinity chromatography with immobilized carbohydrate columns. Before use, the ArtinM aliquots were incubated for 1 h with a polymyxin solution (50 µg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Suspensions of the spleen cells, obtained from two mice, were prepared as reported by da Silva et al. [30]. The obtained cell suspensions were used to isolate B cells using the Pan B Cell Isolation Kit for mice from Miltenyi Biotec (Auburn, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The purification of B cells was performed for determination of IL-17-, IL-6-, and IL-12p40-production in response to ArtinM. Afterwards, B cells were isolated from WT, TLR2KO, and CD14KO mice to measure the IL-17 production induced by ArtinM.

Measurement of the cytokines

B cells (1×10^6 /mL or 2×10^6 /mL) were cultured in RPMI 1640 (containing 10% fetal bovine serum) for 48 h with stimulation by ArtinM (2.5 µg/mL), palmitoyl-3-cysteine-serine-lysine-4 Pam3CSK4 (P3C4, 1 µg/mL; Sigma-Aldrich), a mixture (Positive control – Pos. Ctrl; PeproTech, Rock Hill, NJ, USA) of IL-6 (10 ng/mL) plus IL-1β (10 ng/mL) and IL-23 (10 ng/mL), or medium alone (Medium). After 48 h of incubation, the B cells were centrifuged

(300 g, 10 min at 24°C), and the supernatants were collected to measure IL-17 (Ready-SET-Go!® Kit; Cat. No. 88-7371), IL-6, and IL-12p40 levels by the OptEIA kit (BD Biosciences) using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD), and all data were analyzed using Prism 6.0 (Graph Pad Software). All statistical determinations for normality were analyzed by the Kolmogorov–Smirnov test with the Dallal-Wilkinson-Lilliefors p-value, and when the distribution could not be assumed, normality was used for the Kruskal-Wallis test. Statistical determinations of the differences in means between groups were performed by the analysis of variance with the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test. Differences that provided $p < 0.05$ were considered statistically significant. All experiments were performed in triplicates and repeated three times.

Acknowledgments

We thank Patricia E. Vendruscolo, Sandra M.O. Thomaz, and Érica Vendruscolo for technical support, and Domingos Soares de Souza Filho, Julio Anselmo Siqueira, and Dener Salviano dos Reis for expert animal care. This research was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (grant numbers 2016/04877-2, 2016/23112-7, and 2016/10446-4), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (475357/2013-2), and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Author Contributions

PKMOB, TAS, and MCRB designed the study. PKMOB, TAS, and MCRB planned experiments and analyzed data. PKMOB and TAS performed the experiments. PKMOB, TAS, and MCRB wrote the manuscript. TAS supervised the study.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

- ABEGG, M. A. et al. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii Isolated from the Excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. **Mycopathologia**, v. 161, n. 2, p. 83-91, February 01 2006. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0186-z> >.
- AGUIRRE, K. M.; GIBSON, G. W. Differing requirement for inducible nitric oxide synthase activity in clearance of primary and secondary Cryptococcus neoformans infection. **Med Mycol**, v. 38, n. 5, p. 343-53, Oct 2000. ISSN 1369-3786 (Print) 1369-3786.
- ALEGRE, A. C. et al. Recombinant paracoccin reproduces the biological properties of the native protein and induces protective Th1 immunity against Paracoccidioides brasiliensis infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 4, p. e2788, Apr 2014. ISSN 1935-2727.
- ALEGRE-MALLER, A. C. P. et al. Therapeutic Administration of Recombinant Paracoccin Confers Protection against Paracoccidioides brasiliensis Infection: Involvement of TLRs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, USA, v. 8, n. 12, p. e3317, 12/04 07/26/received 10/04/accepted 2014. ISSN 1935-2727 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4256291/> >.
- ALMEIDA, F. et al. Galectin-3 impacts Cryptococcus neoformans infection through direct antifungal effects. **Nat Commun**, v. 8, n. 1, p. 1968, Dec 6 2017. ISSN 2041-1723.
- ANDRADE, J. et al. Cryptococcus neoformans and gattii promote DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells. **Med Mycol**, v. 56, n. 3, p. 344-349, Apr 1 2018. ISSN 1369-3786.
- ANGKASEKWINAI, P. 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**, v. 82, n. 9, p. 3880-90, Sep 2014. ISSN 0019-9567.
- B., P. et al. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on Candida spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839-850, 2015. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jam.12746> >.

- BALTAZAR, L. D. M.; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 449-453, 2008. ISSN 0037-8682. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000500003&nrm=iso >.
- BAR, E. et al. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 117-27, Jan 16 2014. ISSN 1074-7613.
- BARBOSA-LORENZI, V. C. et al. The lectin ArtinM binds to mast cells inducing cell activation and mediator release. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 416, n. 3-4, p. 318-24, Dec 16 2011. ISSN 0006-291x.
- BASNAYAKE, T. L.; LIM, A.; CURRIE, B. J. Pulmonary cryptococcal infection presenting with multiple lung nodules. **Respiratory Medicine Case Reports**, v. 23, p. 122-124, 02/03 12/29/received 01/20/revised 01/22/accepted 02/03/pmc-release 2018. ISSN 2213-0071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5881413/> >.
- BEN-ABDALLAH, M. et al. Fungal-Induced Cell Cycle Impairment, Chromosome Instability and Apoptosis via Differential Activation of NF- κ B. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002555, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002555> >.
- BERMEJO, D. A. et al. Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR gamma t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. **Nature Immunology**, v. 14, n. 5, p. 514-+, May 2013. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000317732100017 >.
- BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. fov106-fov106, 2016. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fov106> >.
- BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune response to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, n. 1, p. 47-70, 2008/09/15/ 2008. ISSN 0165-2427. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242708001761> >.
- BODEY, G. P. et al. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant therapy for fungal infection in patients with cancer. **Clin Infect Dis**, v. 17, n. 4, p. 705-7, Oct 1993. ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838.
- BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 891-907, 2001. Disponível em: < <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-147-4-891> >.
- BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/57> >.

- 341 BOTTAZZI, B. et al. An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a
342 Paradigm. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 157-183, 2010. Disponível em: <
343 <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-030409-101305> >.
- 344
- 345 BOVERS, M. et al. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans*
346 and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45,
347 n. 4, p. 400-421, 2008/04/01/ 2008. ISSN 1087-1845. Disponível em: <
348 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S108718450700240X> >.
- 349
- 350 BROWN, A. J.; ODDS, F. C.; GOW, N. A. Infection-related gene expression in *Candida*
351 *albicans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 307-13, Aug 2007. ISSN 1369-5274 (Print)
352 1369-5274.
- 353
- 354 BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annu Rev**
355 **Immunol**, v. 29, p. 1-21, 2011. ISSN 0732-0582.
- 356
- 357 BUSSE, O. J. Z. B. Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Zuchtung. v. 16, p. 175-180,
358 1894.
- 359
- 360 BYRNES, E. J., 3RD et al. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII
361 in southern Californian HIV/AIDS patients. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002205, Sep 2011.
362 ISSN 1553-7366.
- 363
- 364 BYRNES, E. J. et al. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and
365 animals. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 13, n. 11, p. 895-907, 06/01 2011.
366 ISSN 1286-4579 1769-714X. Disponível em: <
367 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318971/> >.
- 368
- 369 BYRNES, E. J., III et al. Emergence and Pathogenicity of Highly Virulent *Cryptococcus*
370 *gattii* Genotypes in the Northwest United States. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000850,
371 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000850> >.
- 372
- 373 BYRNES, E. J.; MARR, K. A. The Outbreak of *Cryptococcus gattii* in Western North
374 America: Epidemiology and Clinical Issues. **Current infectious disease reports**, v. 13, n. 3,
375 p. 256-261, 2011. ISSN 1523-3847 1534-3146. Disponível em: <
376 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4696060/> >.
- 377
- 378 CAMPBELL, L. T. et al. Clonality and Recombination in Genetically Differentiated
379 Subgroups of *Cryptococcus gattii*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 8, p. 1403-1409, August 1, 2005
380 2005. Disponível em: < <http://ec.asm.org/content/4/8/1403.abstract> >.
- 381
- 382 CAMPUZANO, A.; WORMLEY, F. L. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from
383 Recognition to Elimination. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 33, 03/07 02/20/received
384 03/04/accepted 2018. ISSN 2309-608X. Disponível em: <
385 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5872336/> >.
- 386
- 387 CARDOSO, M. R. et al. ArtinM, a D-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*,
388 plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora*
389 *caninum*. **Vaccine**, v. 29, n. 49, p. 9183-93, Nov 15 2011. ISSN 0264-410x.
- 390

- 391 CARNEIRO, R. F. et al. Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated
392 from the marine sponge Haliclona caerulea. **J Mol Recognit**, v. 26, n. 1, p. 51-8, Jan 2013.
393 ISSN 0952-3499.
- 394
- 395 CARVALHO, F. C. et al. The recognition of N-glycans by the lectin ArtinM mediates cell
396 death of a human myeloid leukemia cell line. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27892, 2011. ISSN
397 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <
398 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22132163>>.
- 399
- 400 CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and
401 therapy of fungal diseases. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 5, p. 447-56, May 17 2012. ISSN
402 1931-3128.
- 403
- 404 CHAI, L. Y. et al. Anti-Aspergillus human host defence relies on type 1 T helper (Th1),
405 rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity. **Immunology**, v. 130, n. 1, p. 46-54,
406 May 2010. ISSN 0019-2805.
- 407
- 408 CHAN, M. et al. Clinical and microbiological characteristics of cryptococcosis in Singapore:
409 predominance of Cryptococcus neoformans compared with Cryptococcus gattii. **Int J Infect**
410 **Dis**, v. 26, p. 110-5, Sep 2014. ISSN 1201-9712.
- 411
- 412 CHANG, Y.-L. et al. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 222-236,
413 11/0707/14/received 10/19/revised 11/01/accepted 2017. ISSN 2150-5594
414 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354158/>>.
- 415
- 416 CHARLIER, C. et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion
417 by Cryptococcus neoformans. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 120-7, Jan 2009. ISSN 0019-
418 9567.
- 419
- 420 CHATURVEDI, A. K. et al. Vaccine-mediated immune responses to experimental
421 pulmonary Cryptococcus gattii infection in mice. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104316, 2014.
422 ISSN 1932-6203.
- 423
- 424 CHATURVEDI, S. et al. Cryptococcus gattii in AIDS Patients, Southern California.
425 **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1686-1692, 2005. ISSN 1080-6040
426 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367345/>>.
- 427
- 428 CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Cryptococcus gattii: a resurgent fungal
429 pathogen. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 564-571, 2011. ISSN 0966-842X.
430 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.07.010>>. Acesso em: 2018/07/04.
- 431
- 432 CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of**
433 **North America**, v. 20, n. 3, p. 507-544, 2006/09/01/ 2006. ISSN 0891-5520. Disponível em:
434 < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891552006000602>>.
- 435
- 436 CHEN, M. et al. Internalized Cryptococcus neoformans Activates the Canonical Caspase-1
437 and the Noncanonical Caspase-8 Inflammasomes. **J Immunol**, v. 195, n. 10, p. 4962-72, Nov
438 15 2015. ISSN 0022-1767.
- 439

- CHEN, S. et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 499-508, Aug 2000. ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838.
- CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 4, p. 980-1024, Oct 2014. ISSN 0893-8512.
- CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009. ISSN 0019-9567.
- CHERNIAK, R.; SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1507-1512, 1994. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186341/> >.
- CHOW, S. K.; CASADEVALL, A. Evaluation of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan-protein conjugate as vaccine candidate against murine cryptococcosis. **Vaccine**, v. 29, n. 10, p. 1891-8, Feb 24 2011. ISSN 0264-410x.
- CHRETIEN, F. et al. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **J Infect Dis**, v. 186, n. 4, p. 522-30, Aug 15 2002. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899.
- CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids Trigger *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement during Interactions with Amoebae and Macrophages. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002047, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002047> >.
- CIRIC, B. et al. IL-23 Drives Pathogenic IL-17-Producing CD8(+) T Cells. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 9, p. 5296-5305, May 1 2009. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275119200023 >.
- CLEMONS, K. V.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Cytokine treatment of central nervous system infection: efficacy of interleukin-12 alone and synergy with conventional antifungal therapy in experimental cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 3, p. 460-4, Mar 1994. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. Chapter One - The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. In: SARIASLANI, S. e GADD, G. M. (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**: Academic Press, v.87, 2014. p.1-41. ISBN 0065-2164.
- COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, p. 762, 08/17/online 2000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35021206> >.
- COLTRI, K. C. et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **Am J Pathol**, v. 173, n. 2, p. 423-32, Aug 2008. ISSN 0002-9440.

_____. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. **Med Mycol**, v. 48, n. 6, p. 792-9, Sep 2010. ISSN 1369-3786.

CONTI, H. R.; GAFFEN, S. L. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 195, n. 3, p. 780-788, 06/11/nihms-submitted 08/01/pmc-release 2015. ISSN 0022-1767 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507294/> >.

CONTI, P. et al. Impact of Fungi on Immune Responses. **Clin Ther**, v. 40, n. 6, p. 885-888, Jun 2018. ISSN 0149-2918.

COSTA, M. C. et al. The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 4, p. 187-195, 2016/06/01/ 2016. ISSN 1438-4221. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422116300303> >.

CUPEDO, T. et al. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127(+) natural killer-like cells. **Nature Immunology**, v. 10, n. 1, p. 66-74, Jan 2009. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261788800013 >.

CUSTODIO, L. A. et al. Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 10, p. 1510-5, Oct 2011. ISSN 1567-5769.

D., N. J.; ARTURO, C. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x> >.

DA SILVA, L. C. et al. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. **Int J Biol Macromol**, v. 72, p. 848-54, Jan 2015. ISSN 0141-8130.

DA SILVA, L. C.; CORREIA, M. T. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. **Front Microbiol**, v. 5, p. 20, 2014. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302x.

DA SILVA, T. A. et al. Activation of spleen cells by ArtinM may account for its immunomodulatory properties. **Cell and Tissue Research**, v. 357, n. 3, p. 719-730, Sep 2014. ISSN 0302-766x. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000341495400017 >.

_____. Activation of spleen cells by ArtinM may account for its immunomodulatory properties. **Cell and Tissue Research**, Berlin/Heidelberg, v. 357, n. 3, p. 719-730, 05/20 08/15/received 03/24/accepted 2014. ISSN 0302-766X 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4148593/> >.

DA SILVA, T. A.; FERNANDES, F. F.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Data on IL-17 production induced by plant lectins. **Data Brief**, v. 7, p. 1584-7, Jun 2016. ISSN 2352-3409

- (Print) 2352-3409 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27222857>>.
- DA SILVA, T. A. et al. IL-17 Induction by ArtinM is Due to Stimulation of IL-23 and IL-1 Release and/or Interaction with CD3 in CD4+ T Cells. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149721, 2016a. ISSN 1932-6203.
- _____. IL-17 Induction by ArtinM is Due to Stimulation of IL-23 and IL-1 Release and/or Interaction with CD3 in CD4(+) T Cells. **Plos One**, v. 11, n. 2, Feb 22 2016b. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000371276100134 >.
- _____. ArtinM Mediates Murine T Cell Activation and Induces Cell Death in Jurkat Human Leukemic T Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, Jul 2017a. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000408746800072 >.
- _____. ArtinM Mediates Murine T Cell Activation and Induces Cell Death in Jurkat Human Leukemic T Cells. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 7, Jun 30 2017b. ISSN 1422-0067.
- _____. ArtinM Mediates Murine T Cell Activation and Induces Cell Death in Jurkat Human Leukemic T Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1400, 06/30 05/08/received 06/25/accepted 2017. ISSN 1422-0067. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5535893/>>.
- _____. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. **Scientific Reports**, v. 7, Aug 1 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000406764200115 >.
- DADACHOVA, E. et al. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 21, n. 2, p. 192-9, Apr 2008. ISSN 1755-1471 (Print) 1755-1471.
- DAVIS, M. J. et al. Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection. **mBio**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 4, n. 3, p. e00264-13, May-Jun 06/18 04/09/received 05/20/accepted 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3684832/>>.
- DE MELO, C. M. et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **Int J Pharm**, v. 408, n. 1-2, p. 113-9, Apr 15 2011. ISSN 0378-5173.
- DE MELO CRISTIANE MOUTINHO, L. et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 11, p. 1631-1636, 2010/11/01 2010. ISSN 0951-418X. Disponível em: <
<https://doi.org/10.1002/ptr.3156>>.
Acesso em: 2018/07/26.
- DE OLIVEIRA, L. L. et al. T Helper 1-Inducing Adjuvant Protects against Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, USA, v. 2, n. 3, p. e183, 03/12 08/29/received 01/07/accepted 2008. ISSN 1935-2727 1935-2735. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2263123/>>.

- DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-75, Oct 2004. ISSN 1535-9778 (Print) 1535-9786.
- DELSING, C. E. et al. Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. **BMC Infect Dis**, v. 14, p. 166, Mar 26 2014. ISSN 1471-2334.
- DENNING, D. W. Calling upon all public health mycologists. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 6, p. 923-924, June 01 2017. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2909-8> >.
- DEVI, S. J. Preclinical efficacy of a glucuronoxylomannan-tetanus toxoid conjugate vaccine of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **Vaccine**, v. 14, n. 9, p. 841-4, Jun 1996. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410x.
- DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2009, p. 840452, 2009. ISSN 1687-708X (Print) 1687-708x.
- _____. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 840452, 05/25 11/11/received 01/18/accepted 2009. ISSN 1687-708X 1687-7098. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2686104/> >.
- DOSTERT, C.; TSCHOPP, J. DETeCTING fungal pathogens. In: (Ed.). **Nat Immunol**. United States, v.8, 2007. p.17-8. ISBN 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking).
- DRICKAMER, K.; MAMON, J. F. Phosphorylation of a membrane receptor for glycoproteins. Possible transmembrane orientation of the chicken hepatic lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 24, p. 15156-15161, 1982. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/257/24/15156.abstract> >.
- DURANT, L. et al. Diverse Targets of the Transcription Factor STAT3 Contribute to T Cell Pathogenicity and Homeostasis. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 605-615, May 28 2010. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278280500007 >.
- EDITORIAL. Stop neglecting fungi. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 17120, 07/25/online 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.120> >.
- ELENI, G. et al. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 16, n. 2, p. 251, 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/2/09-0900> >.
- ELSEGEINY, W.; MARR, K. A.; WILLIAMSON, P. R. Immunology of Cryptococcal Infections: Developing a Rational Approach to Patient Therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 651, 2018-April-04 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00651> >.
- ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 7, p. 809-18, Jul 2006. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615.

- 639 EVA, P. et al. Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide component
640 galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8.
641 **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 267-275, 2006. Disponível em: <
642 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-5822.2005.00619.x>>.
643
- 644 FELDMAN, M. B.; VYAS, J. M.; MANSOUR, M. K. It takes a village: Phagocytes play a
645 central role in fungal immunity. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2018/06/12/
646 2018. ISSN 1084-9521. Disponível em: <
647 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S108495211730174X>>.
648
- 649 FERNANDES, F. F. et al. Detrimental Effect of Fungal 60-kDa Heat Shock Protein on
650 Experimental Paracoccidioides brasiliensis Infection. **PLoS ONE**, San Francisco, CA USA, v.
651 11, n. 9, p. e0162486, 09/06 04/08/received 08/07/accepted 2016. ISSN 1932-6203.
652 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5012565/>>.
653
- 654 FLORES-GARCIA, A. et al. Recombinant murine IL-12 promotes a protective Th1/cellular
655 response in Mongolian gerbils infected with Sporothrix schenckii. **J Chemother**, v. 27, n. 2,
656 p. 87-93, Feb 2015. ISSN 1120-009x.
657
- 658 FUENTEFRIA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat
659 antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2-13, 2018/01/01
660 2017. ISSN 0266-8254. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/lam.12820>>. Acesso em:
661 2018/07/25.
662
- 663 FYFE, M. et al. Cryptococcus gattii infections on Vancouver Island, British Columbia,
664 Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment. **Can Commun Dis Rep**,
665 v. 34, n. 6, p. 1-12, Jun 2008. ISSN 1188-4169.
666
- 667 GANIKO, L. et al. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. **Glycoconj J**, v. 15, n.
668 5, p. 527-30, May 1998. ISSN 0282-0080 (Print) 0282-0080.
669
- 670 GELLIN, B. et al. Adjunctive Immune Therapy for Fungal Infections. **Clinical Infectious**
671 **Diseases**, v. 33, n. 7, p. 1048-1056, 2001. ISSN 1058-4838. Disponível em: <
672 <http://dx.doi.org/10.1086/322710>>.
673
- 674 GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal
675 Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-143, January 1, 2000 2000.
676 Disponível em: < <http://cmr.asm.org/content/13/1/122.abstract>>.
677
- 678 GHORESCHI, K. et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta
679 signalling. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 967-U144, Oct 21 2010. ISSN 0028-0836. Disponível
680 em: <<Go to ISI>://WOS:000283254700039>.
681
- 682 GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to Cryptococcus neoformans and C. gattii
683 during cryptococcosis. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 76-86, May 2015. ISSN 1087-1845.
684
- 685 GILBOA-GARBER, N.; MIZRAHI, L.; GARBER, N. Mannose-binding hemagglutinins in
686 extracts of Pseudomonas aeruginosa. **Can J Biochem**, v. 55, n. 9, p. 975-81, Sep 1977. ISSN
687 0008-4018 (Print) 0008-4018.
688

- GLADIATOR, A. et al. Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. **J Immunol**, v. 190, n. 2, p. 521-5, Jan 15 2013. ISSN 0022-1767.
- GOLDMAN, C. et al. Scedosporium apiospermum infections and the role of combination antifungal therapy and GM-CSF: A case report and review of the literature. **Med Mycol Case Rep**, v. 11, p. 40-3, Mar 2016. ISSN 2211-7539 (Print) 2211-7539.
- GOLDSTEIN, I. J. et al. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 05/08/online 1980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/285066b0> >.
- GOW, N. A. R.; NETEA, M. G. Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, 2016. Disponível em: < <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/royptb/371/1709/20150462.full.pdf> >.
- GRAY, K. C. et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 7, p. 2234-9, Feb 14 2012. ISSN 0027-8424.
- GROVER, N. et al. Ecological niche of Cryptococcus neoformans var. grubii and Cryptococcus gattii in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. **Mycopathologia**, v. 164, n. 4, p. 159-170, October 01 2007. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9039-2> >.
- GUILLOT-DELOST, M. et al. Human CD90 Identifies Th17/Tc17 T Cell Subsets That Are Depleted in HIV-Infected Patients. **Journal of Immunology**, v. 188, n. 3, p. 981-991, Feb 1 2012. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000299690200011 >.
- HADRICH, I.; AYADI, A. Epidemiology of antifungal susceptibility: Review of literature. **J Mycol Med**, May 14 2018. ISSN 1156-5233.
- HAMAD, M. Antifungal immunotherapy and immunomodulation: a double-hitter approach to deal with invasive fungal infections. **Scand J Immunol**, v. 67, n. 6, p. 533-43, Jun 2008. ISSN 0300-9475.
- HARRIS, J.; LOCKHART, S.; CHILLER, T. Cryptococcus gattii: where do we go from here? **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 113-129, 2012. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2011.607854> >.
- HE, X. et al. Virulence factors identified by Cryptococcus neoformans mutant screen differentially modulate lung immune responses and brain dissemination. **Am J Pathol**, v. 181, n. 4, p. 1356-66, Oct 2012. ISSN 0002-9440.
- HERRING, A. C. et al. Transient Neutralization of Tumor Necrosis Factor Alpha Can Produce a Chronic Fungal Infection in an Immunocompetent Host: Potential Role of Immature Dendritic Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 39-49, 04/02/received 04/29/revised 09/01/accepted 2005. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC538928/> >.

- HO, S. W. L. et al. Necrotizing Fasciitis Caused by *Cryptococcus gattii*. **American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)**, v. 44, n. 12, p. E517-22, 2015/12// 2015. ISSN 1078-4519. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/26665255> >.
- HOANG, L. M. et al. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 9, p. 935-40, Sep 2004. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615.
- HOLE, C. R. et al. Mechanisms of dendritic cell lysosomal killing of *Cryptococcus*. **Sci Rep**, v. 2, p. 739, 2012. ISSN 2045-2322.
- HUANG, C. et al. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-Cell responses. **Infect Immun**, v. 70, n. 10, p. 5485-93, Oct 2002. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.
- HUERFANO, S.; CASTANEDA, A.; CASTANEDA, E. Experimental infection of almond trees seedlings (*Terminalia catappa*) with an environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, n. 3, p. 131-2, Sep 2001. ISSN 1130-1406 (Print) 1130-1406.
- HUSTON, S. M. et al. *Cryptococcus gattii* is killed by dendritic cells, but evades adaptive immunity by failing to induce dendritic cell maturation. **J Immunol**, v. 191, n. 1, p. 249-61, Jul 1 2013. ISSN 0022-1767.
- ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T. et al. *Cryptococcus* and Cryptococcosis in Cuba. A minireview. **Mycoses**, v. 57, n. 12, p. 707-717, 2014. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.12275> >.
- ISLAM, A. et al. An acidic microenvironment increases NK cell killing of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by enhancing perforin degranulation. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 7, p. e1003439, 2013. ISSN 1553-7366.
- J., K.-C. K.; ASHOK, V. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 574-587, 2006. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1567-1364.2006.00088.x> >.
- J., M. A.; S., K. B. Helper T-cell responses and pulmonary fungal infections. **Immunology**, v. 0, n. 0, Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imm.12953> >.
- JAIN, N. et al. Phenotypic Switching in a *Cryptococcus neoformans* Variety *gattii* Strain Is Associated with Changes in Virulence and Promotes Dissemination to the Central Nervous System. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 896-903, 09/06/received 10/31/revised 11/08/accepted 2006. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1360350/> >.
- JANDÚ, J. J. et al. Treatment with pCramoll Alone and in Combination with Fluconazole Provides Therapeutic Benefits in *C. gattii* Infected Mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 211, 05/24 08/09/received 05/09/accepted 2017. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5442327/> >.

- JANDÚ, J. J. B. et al. Targeting the Immune System with Plant Lectins to Combat Microbial Infections. v. 8, n. 671, 2017-October-04 2017. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00671> >.
- JARVIS, J. N. et al. Adjunctive interferon-gamma immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized controlled trial. **Aids**, v. 26, n. 9, p. 1105-13, Jun 1 2012. ISSN 0269-9370.
- JIANG, S. Immunity against Fungal Infections. **Immunology and Immunogenetics Insights**, v. 8, p. III.S38707, 2016. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.4137/III.S38707> >.
- KAWAGUCHI, M. et al. IL-17 cytokine family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 6, p. 1265-1274, Dec 2004. ISSN 0091-6749. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225577400002 >.
- KELLY, R. M. et al. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p. 592-8, Jan 2005. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.
- KHAN, A. A. et al. Additive potential of combination therapy against cryptococcosis employing a novel amphotericin B and fluconazole loaded dual delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 119, p. 171-178, 2018/07/01/ 2018. ISSN 0928-0987. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092809871830174X> >.
- KIDD, S. E. et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 5, p. 1433-43, Mar 2007. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240.
- _____. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17258-17263, 2004. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/pnas/101/49/17258.full.pdf> >.
- KLEIN, K. R. et al. Identification of *Cryptococcus gattii* by Use of l-Canavanine Glycine Bromothymol Blue Medium and DNA Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3669-3672, 09/30 06/02/received 07/29/revised 09/21/accepted 2009. ISSN 0095-1137 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2772631/> >.
- KOFLA, G.; RUHNKE, M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature. **Eur J Med Res**, v. 16, n. 4, p. 159-66, Apr 28 2011. ISSN 0949-2321 (Print) 0949-2321.
- KOH, O. et al. *Cryptococcus gattii* Genotype VGIIa Infection in Man, Japan, 2007. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 16, n. 7, p. 1155, 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/7/10-0106> >.

- 838 KOVACIC, P.; COOKSY, A. Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other
839 polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and
840 antifungal action. **MedChemComm**, v. 3, n. 3, p. 274-280, 2012. ISSN 2040-2503.
841 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C2MD00267A> >.
- 842
- 843 KRAUS, P. R. et al. Identification of Cryptococcus neoformans Temperature-Regulated
844 Genes with a Genomic-DNA Microarray. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 5, p. 1249-1260, October
845 1, 2004 2004. Disponível em: < <http://ec.asm.org/content/3/5/1249.abstract> >.
- 846
- 847 KRYSAN, D. J. Toward improved anti-cryptococcal drugs: Novel molecules and repurposed
848 drugs. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 93-8, May 2015. ISSN 1087-1845.
- 849
- 850 KULLBERG, B. J. et al. Recombinant interferon-gamma enhances resistance to acute
851 disseminated Candida albicans infection in mice. **J Infect Dis**, v. 168, n. 2, p. 436-43, Aug
852 1993. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899.
- 853
- 854 KULLBERG, B. J.; VAN DE VEERDONK, F.; NETEA, M. G. Immunotherapy: a potential
855 adjunctive treatment for fungal infection. **Curr Opin Infect Dis**, v. 27, n. 6, p. 511-6, Dec
856 2014. ISSN 0951-7375.
- 857
- 858 KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. EPIDEMIOLOGIC DIFFERENCES BETWEEN
859 THE TWO VARIETIES OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS1. **American Journal of**
860 **Epidemiology**, v. 120, n. 1, p. 123-130, 1984. ISSN 0002-9262. Disponível em: <
861 <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113861> >.
- 862
- 863 KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators
864 of virulence in Cryptococcus neoformans. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 1, p. 218-223,
865 1986. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0022635758&partnerID=40&md5=feed2c4d89c8aec81a357a079dfe0fd> >.
- 866
- 867
- 868 LANDGRAF, T. N. et al. Therapeutic effect of monophosphoryl lipid A administration on
869 Paracoccidioides brasiliensis-infected mice. **Med Mycol**, v. 55, n. 3, p. 344-348, Apr 1 2017.
870 ISSN 1369-3786.
- 871
- 872 LENHARD-VIDAL, A. et al. Polyclonal antibodies to Paracoccidioides brasiliensis are able
873 to recognise antigens from different strains from Paracoccidioides species complex, including
874 Paracoccidioides lutzii LDR2. **Mycoses**, Jun 25 2018. ISSN 0933-7407.
- 875
- 876 LEON, B.; LUND, F. E. IL-17-producing B cells combat parasites. **Nature Immunology**, v.
877 14, n. 5, p. 419-421, May 2013. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <Go to
878 ISI>://WOS:000317732100003 >.
- 879
- 880 LEOPOLD WAGER, C. M. et al. STAT1 signaling within macrophages is required for
881 antifungal activity against Cryptococcus neoformans. **Infect Immun**, v. 83, n. 12, p. 4513-27,
882 Dec 2015. ISSN 0019-9567.
- 883
- 884 LI, J.; CASANOVA, J. L.; PUEL, A. Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans:
885 host defense vs. excessive inflammation. **Mucosal Immunol**, v. 11, n. 3, p. 581-589, May
886 2018. ISSN 1935-3456 (Electronic) 1933-0219 (Linking). Disponível em: <
887 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29186107> >.

- LI, S. S.; MODY, C. H. Cryptococcus. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, n. 3, p. 186-196, 2010. Disponível em: < <https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1513/pats.200907-063AL> >.
- LINGEGOWDA, B. P. et al. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in Singapore. **Singapore Med J**, v. 52, n. 7, p. e160-2, Jul 2011. ISSN 0037-5675 (Print) 0037-5675.
- LIU, Y. et al. Glycan microarray analysis of the carbohydrate-recognition specificity of native and recombinant forms of the lectin ArtinM. **Data Brief**, v. 5, p. 1035-47, Dec 2015. ISSN 2352-3409 (Print) 2352-3409 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26793748> >.
- LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Chapter Six - Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity. In: MURPHY, K. M. e MERAD, M. (Ed.). **Advances in Immunology**: Academic Press, v.120, 2013. p.163-184. ISBN 0065-2776.
- LUIS, C. N. D. S. et al. Cratylia mollis Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies. **Current Bioactive Compounds**, v. 10, n. 1, p. 44-54, 2014. ISSN 1573-4072/1875-6646. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/node/123571/article> >.
- LUPO, P. et al. The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. **Infect Immun**, v. 76, n. 4, p. 1581-9, Apr 2008. ISSN 0019-9567.
- LUTZ, J. E.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Enhancement of antifungal chemotherapy by interferon-gamma in experimental systemic cryptococcosis. **J Antimicrob Chemother**, v. 46, n. 3, p. 437-42, Sep 2000. ISSN 0305-7453 (Print) 0305-7453.
- MA, H. et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12980-5, Aug 4 2009. ISSN 0027-8424.
- MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol**, v. 67, p. 131-90, 2009. ISSN 0065-2164 (Print) 0065-2164.
- _____. Mitochondria and the regulation of hypervirulence in the fatal fungal outbreak on Vancouver Island. **Virulence**, v. 1, n. 3, p. 197-201, May-Jun 2010. ISSN 2150-5594.
- MACDOUGALL, L.; FYFE, M. Emergence of *Cryptococcus gattii* in a Novel Environment Provides Clues to Its Incubation Period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1851-1852, 01/10/received 02/02/revised 03/13/accepted 2006. ISSN 0095-1137 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1479218/> >.
- MACIEL, E. V. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, n. 1, p. 57-60, Mar 2004. ISSN 1045-1056 (Print) 1045-1056.

- MAMBULA, S. S. et al. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 68, n. 11, p. 6257-64, Nov 2000. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.
- MANSOUR, M. K. et al. Protective Efficacy of Antigenic Fractions in Mouse Models of *Cryptococcosis*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1746-1754, March 1, 2004 2004. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/72/3/1746.abstract> >.
- MARIANO, V. S. et al. Recognition of TLR2 N-glycans: critical role in ArtinM immunomodulatory activity. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98512, 2014. ISSN 1932-6203.
- MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 106, 12/21/online 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6> >.
- MCMULLAN, B. J.; SORRELL, T. C.; CHEN, S. C.-A. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. **Future Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1613-1631, 2013. Disponível em: < <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.13.123> >.
- MENCACCI, A. et al. Defective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation and its restoration by treatment with TH2 cytokine antagonists. **Blood**, v. 97, n. 5, p. 1483-90, Mar 1 2001. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971.
- MERSHON, K. L. et al. Role of Complement in Protection against *Cryptococcus gattii* Infection. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1061-1070, March 1, 2009 2009. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/77/3/1061.abstract> >.
- MICHEL, M. L. et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 5, p. 995-1001, May 14 2007. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246467600005 >.
- _____. Critical role of ROR-gamma t in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 50, p. 19845-19850, Dec 16 2008. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261802300050 >.
- MOHR, J. et al. Current options in antifungal pharmacotherapy. **Pharmacotherapy**, v. 28, n. 5, p. 614-45, May 2008. ISSN 0277-0008 (Print) 0277-0008.
- MONARI, C. et al. *Cryptococcus neoformans* Capsular Glucuronoxylomannan Induces Expression of Fas Ligand in Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3461-3468, 2005. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/174/6/3461.full.pdf> >.
- MONK, B. C.; CANNON, R. D. Genomic pathways to antifungal discovery. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 2, n. 4, p. 309-29, Dec 2002. ISSN 1568-0053 (Print) 1568-0053.

MORAN, M. et al. **G-FINDER: Neglected Disease Research and Development: the Ebola Effect**. G-FINDER 2015.

MORENO, A. N. et al. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 132, n. 3, p. 221-30, Nov 2003. ISSN 1018-2438 (Print) 1018-2438.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J Med Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 159-64, Mar 1994. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615.

MURDOCK, B. J. et al. Interleukin-17A Enhances Host Defense against Cryptococcal Lung Infection through Effects Mediated by Leukocyte Recruitment, Activation, and Gamma Interferon Production. v. 82, n. 3, p. 937-948, March 1, 2014 %J Infection and Immunity 2014. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/82/3/937.abstract> >.

N., V. S. et al. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1274-1285, 2008. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-5822.2008.01125.x> >.

NAKAMURA, K. et al. Dectin-1 is not required for the host defense to *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol Immunol**, v. 51, n. 11, p. 1115-9, 2007. ISSN 0385-5600 (Print) 0385-5600.

NEILSON, J. B.; FROMTLING, R. A.; BULMER, G. S. Pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*: Decreased survival in vivo. **Mycopathologia**, v. 73, n. 1, p. 57-59, January 01 1981. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/BF00443015> >.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 51-83, Mar 2016. ISSN 0891-5520.

NICOLA, A. M. et al. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. **MBio**, v. 2, n. 4, 2011.

O'DEA, E. M. et al. Eosinophils are recruited in response to chitin exposure and enhance Th2-mediated immune pathology in *Aspergillus fumigatus* infection. **Infect Immun**, v. 82, n. 8, p. 3199-205, Aug 2014. ISSN 0019-9567.

O'HALLORAN, J. A.; POWDERLY, W. G.; SPEC, A. Cryptococcosis today: It is not all about HIV infection. **Current clinical microbiology reports**, v. 4, n. 2, p. 88-95, 04/17 04/23/nihms-submitted 06/01/pmc-release 2017. ISSN 2196-5471. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5677188/> >.

O., S. et al. Matrix metalloproteinases contribute to the regulation of chemokine expression and pulmonary inflammation in *Cryptococcus* infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 183, n. 3, p. 431-440, 2016. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cei.12725> >.

- OKUBO, Y. et al. How histopathology can contribute to an understanding of defense mechanisms against cryptococci. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 465319, 2013. ISSN 0962-9351.
- _____. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **Jpn J Infect Dis**, v. 66, n. 3, p. 216-21, 2013. ISSN 1344-6304.
- OLIVEIRA BRITO, P. K. M. et al. Systemic effects in naive mice injected with immunomodulatory lectin ArtinM. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0187151, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29084277> >.
- OTTENSOOSER, F. et al. Lectins detecting group C streptococci. **Infect Immun**, v. 9, n. 5, p. 971-3, May 1974. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.
- PANDYA, A. D. et al. Identification of Human NK17/NK1 Cells. **Plos One**, v. 6, n. 10, Oct 21 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000296513200052 >.
- PANUNTO-CASTELO, A. et al. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania* major antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 11, n. 12, p. 1035-42, Dec 2001. ISSN 0959-6658 (Print) 0959-6658.
- PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 20 2009. ISSN 0269-9370.
- PASSOS, S. T. et al. IL-6 Promotes NK Cell Production of IL-17 during Toxoplasmosis. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 4, p. 1776-1783, Feb 15 2010. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274585100013 >.
- PATIL, A.; MAJUMDAR, S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. **J Pharm Pharmacol**, v. 69, n. 12, p. 1635-1660, Dec 2017. ISSN 0022-3573.
- PEREIRA-DA-SILVA, G. et al. Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 1, p. 86-94, Jan 2006. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.
- PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 16, n. 4, p. 837-74, v-vi, Dec 2002. ISSN 0891-5520 (Print) 0891-5520.
- PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 1 2010. ISSN 1058-4838.
- PEUMANS, W. J.; DAMME, E. J. M. V. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, n. 1, p. 199-228, 1998/04/01 1998. ISSN 0264-8725. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/02648725.1998.10647956> >.

- PIKMAN, R.; BEN-AMI, R. Immune modulators as adjuncts for the prevention and treatment of invasive fungal infections. **Immunotherapy**, v. 4, n. 12, p. 1869-82, Dec 2012. ISSN 1750-743x.
- PIPPI, B. et al. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839-850, 2015/04/01 2015. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/jam.12746> >. Acesso em: 2018/07/25.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 05/05 2017. ISSN 1473-3099 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5818156/> >.
- RICCI-AZEVEDO, R. et al. Neutrophils Contribute to the Protection Conferred by ArtinM against Intracellular Pathogens: A Study on *Leishmania major*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004609, Apr 2016. ISSN 1935-2727.
- RINALDI, M. G. Controversies in medical mycology. **Dermatology**, v. 194 Suppl 1, p. 45-7, 1997. ISSN 1018-8665 (Print) 1018-8665.
- RITTNER, G. M. et al. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1519, 2012. ISSN 1935-2727.
- RIVERA, J. et al. Antibody efficacy in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection: a role for nitric oxide. **J Immunol**, v. 168, n. 7, p. 3419-27, Apr 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.
- ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, 2016. Disponível em: < <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016> >.
- RODRIGUES, M. L. Funding and Innovation in Diseases of Neglected Populations: The Paradox of Cryptococcal Meningitis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, CA USA, v. 10, n. 3, p. e0004429, 03/10 2016. ISSN 1935-2727 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786104/> >.
- ROILIDES, E. et al. The role of immunoreconstitution in the management of refractory opportunistic fungal infections. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 12-25, 1998. ISSN 1369-3786 (Print) 1369-3786.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 11, 01/01/online 2004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri1255> >.
- _____. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 275-88, Apr 2011. ISSN 1474-1733.

- 1135 RUAS, L. P. et al. Effect of ArtinM on Human Blood Cells During Infection With
1136 *Paracoccidioides brasiliensis*. **Front Microbiol**, v. 9, p. 867, 2018. ISSN 1664-302X (Print)
1137 1664-302x.
- 1138
- 1139 RUDD, P. M. et al. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular
1140 immune recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 293, n. 2, p. 351-366, Oct 22 1999.
1141 ISSN 0022-2836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083284300019 >.
- 1142
- 1143 RUMA-HAYNES, P.; BROWNLEE, A. G.; SORRELL, T. C. A rapid method for detecting
1144 extracellular proteinase activity in *Cryptococcus neoformans* and a survey of 63 isolates. **J**
1145 **Med Microbiol**, v. 49, n. 8, p. 733-7, Aug 2000. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615.
- 1146
- 1147 SA, N. P. et al. Heterocycle Thiazole Compounds Exhibit Antifungal Activity through
1148 Increase in the Production of Reactive Oxygen Species in the *Cryptococcus neoformans*-
1149 *Cryptococcus gattii* Species Complex. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 8, Aug
1150 2017. ISSN 0066-4804.
- 1151
- 1152 SAIJO, T. et al. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a
1153 risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise
1154 immunocompetent patients. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e00912-14, Mar 18 2014.
- 1155
- 1156 SANTOS-DE-OLIVEIRA, R. et al. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus*
1157 *integrifolia*. **J Immunol**, v. 153, n. 4, p. 1798-807, Aug 15 1994. ISSN 0022-1767 (Print)
1158 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8046246> >.
- 1159
- 1160 SCHOFFELEN, T. et al. *Cryptococcus gattii* induces a cytokine pattern that is distinct from
1161 other cryptococcal species. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55579, 2013. ISSN 1932-6203.
- 1162
- 1163 SEIDER, K. et al. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and
1164 escape. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 392-400, 2010/08/01/ 2010. ISSN
1165 1369-5274. Disponível em: <
1166 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527410000627> >.
- 1167
- 1168 SEVERO, L. C.; DE MATTOS OLIVEIRA, F.; LONDERO, A. T. Cryptococcosis due to
1169 *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases.
1170 **Revista iberoamericana de micologia**, v. 16, n. 3, p. 152-154, 1999/09// 1999. ISSN 1130-
1171 1406. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/18473564> >.
- 1172
- 1173 SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal
1174 development, drug resistance, and disease. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 2, p. 213-67,
1175 Jun 2011. ISSN 1092-2172.
- 1176
- 1177 SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition
1178 molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53r-62r, Nov 2004. ISSN 0959-6658 (Print)
1179 0959-6658.
- 1180
- 1181 SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras**
1182 **Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, May-Jun 2006. ISSN 0037-8682 (Print) 0037-8682.
- 1183

- SKOLNIK, K.; HUSTON, S.; MODY, C. H. Cryptococcal Lung Infections. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 451-464, 2017/09/01/ 2017. ISSN 0272-5231. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272523117300424> >.
- SORRELL, T. C. Cryptococcus neoformans variety gattii. **Med Mycol**, v. 39, n. 2, p. 155-68, Apr 2001. ISSN 1369-3786 (Print)1369-3786.
- SORRELL, T. C. et al. Concordance of clinical and environmental isolates of Cryptococcus neoformans var. gattii by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 1253-60, May 1996. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137.
- SOUZA, M. A. et al. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconj J**, v. 30, n. 7, p. 641-57, Oct 2013. ISSN 0282-0080.
- SPECHT, C. A. et al. Vaccination with Recombinant Cryptococcus Proteins in Glucan Particles Protects Mice against Cryptococcosis in a Manner Dependent upon Mouse Strain and Cryptococcal Species. **mBio**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 8, n. 6, p. e01872-17, Nov-Dec 11/28 10/12/received 10/18/accepted 2017. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5705919/> >.
- SPRINGER, D. J. et al. Cryptococcus gattii VGIII Isolates Causing Infections in HIV/AIDS Patients in Southern California: Identification of the Local Environmental Source as Arboreal. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004285, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004285> >.
- STARK, M. A. et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 285-294, Mar 2005. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228105700004 >.
- STEELE, K. T. et al. In-hospital mortality of HIV-infected cryptococcal meningitis patients with *C. gattii* and *C. neoformans* infection in Gaborone, Botswana. **Med Mycol**, v. 48, n. 8, p. 1112-5, Dec 2010. ISSN 1369-3786.
- STEPHEN, C. et al. British Columbia: Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 10, p. 792-794, 2002. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC339618/> >.
- Stop neglecting fungi. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 17120, 07/25/online 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.120> >.
- SYME, R. M. et al. Primary Dendritic Cells Phagocytose Cryptococcus neoformans via Mannose Receptors and Fcγ Receptor II for Presentation to T Lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 5972-5981, November 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/70/11/5972.abstract> >.
- TAKATORI, H. et al. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 35-41, Jan 16 2009. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266008300006 >.

- TANAKA, M. et al. Toll-like receptor 9-dependent activation of bone marrow-derived dendritic cells by URA5 DNA from *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 80, n. 2, p. 778-86, Feb 2012. ISSN 0019-9567.
- TEIXEIRA, C. R. et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 3001-8, Apr 5 2006. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410x.
- TEIXEIRA, P. A. C. et al. Mannoprotein MP84 mediates the adhesion of *Cryptococcus neoformans* to epithelial lung cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 106, 08/19 06/06/received 07/18/accepted 2014. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4137752/> >.
- TOREN, A. et al. Invasive fungal infections in lymphoma patients receiving immunotherapy following autologous bone marrow transplantation (ABMT). **Bone Marrow Transplant**, v. 20, n. 1, p. 67-9, Jul 1997. ISSN 0268-3369 (Print) 0268-3369.
- UENO, K. et al. Dendritic Cell-Based Immunization Ameliorates Pulmonary Infection with Highly Virulent *Cryptococcus gattii*. **Infection and Immunity**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 83, n. 4, p. 1577-1586, 03/17 12/30/received 01/19/rev-request 01/27/accepted 2015. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4363414/> >.
- _____. Immunization with Antigen-Pulsed Dendritic Cells Against Highly Virulent *Cryptococcus gattii* Infection: Analysis of Cytokine-Producing T Cells. **Methods Mol Biol**, v. 1625, p. 327-339, 2017. ISSN 1064-3745.
- UMEMURA, M. et al. Involvement of IL-17 in Fas ligand-induced inflammation. **International Immunology**, v. 16, n. 8, p. 1099-1108, Aug 2004. ISSN 0953-8178. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223172000005 >.
- UPTON, A. et al. First Contemporary Case of Human Infection with *Cryptococcus gattii* in Puget Sound: Evidence for Spread of the Vancouver Island Outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3086-3088, September 1, 2007 2007. Disponível em: < <http://jcm.asm.org/content/45/9/3086.abstract> >.
- VALLABHANENI, S. et al. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2016/03/01/ 2016. ISSN 0891-5520. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891552015000938> >.
- VANBREUSEGHEM, R.; TAKASHIO, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. **Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol**, v. 50, n. 6, p. 695-702, 1970. ISSN 0037-9638 (Print) 0037-9638.
- VECCHIARELLI, A. et al. *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 3, n. 8, p. 997-1005, 2011. Disponível em: < <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/imt.11.86> >.

- 1284 VOELZ, K. et al. 'Division of labour' in response to host oxidative burst drives a fatal
1285 Cryptococcus gattii outbreak. **Nat Commun**, v. 5, p. 5194, Oct 17 2014. ISSN 2041-1723.
1286
- 1287 WAN, L. et al. Effect of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor on Prevention
1288 and Treatment of Invasive Fungal Disease in Recipients of Allogeneic Stem-Cell
1289 Transplantation: A Prospective Multicenter Randomized Phase IV Trial. **J Clin Oncol**, v. 33,
1290 n. 34, p. 3999-4006, Dec 1 2015. ISSN 0732-183x.
1291
- 1292 WANG, F. et al. Innate and adaptive immune response to chronic pulmonary infection of
1293 hyphae of Aspergillus fumigatus in a new murine model. **Journal of Medical Microbiology**,
1294 v. 66, n. 10, p. 1400-1408, 2017. Disponível em: <
1295 <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000590>>.
1296
- 1297 WHO, W. H. O. **The top 10 causes of death.** [http://www.who.int/news-room/fact-](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death)
1298 [sheets/detail/the-top-10-causes-of-death](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death) 2018.
1299
- 1300 WIESNER, D. L.; KLEIN, B. S. Lung epithelium: barrier immunity to inhaled fungi and
1301 driver of fungal-associated allergic asthma. **Curr Opin Microbiol**, v. 40, p. 8-13, Dec 2017.
1302 ISSN 1369-5274.
1303
- 1304 WOZNIAK, K. L. et al. Role of IL-17A on Resolution of Pulmonary C. neoformans
1305 Infection. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17204, 2011. Disponível em: <
1306 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017204>>.
1307
- 1308 WOZNIAK, K. L.; LEVITZ, S. M. Cryptococcus neoformans enters the endolysosomal
1309 pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. **Infect Immun**, v. 76, n. 10,
1310 p. 4764-71, Oct 2008. ISSN 0019-9567.
1311
- 1312 WÜTHRICH, M. et al. Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to
1313 North America requires Th17 cells in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n.
1314 2, p. 554-568, 02/01/ 2011. ISSN 0021-9738. Disponível em: <
1315 <https://doi.org/10.1172/JCI43984>>.
1316
- 1317 XIE, J. L. et al. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiol**, v.
1318 9, n. 4, p. 523-42, 2014. ISSN 1746-0913.
1319
- 1320 XUE, C. et al. The Human Fungal Pathogen Cryptococcus Can Complete Its Sexual Cycle
1321 during a Pathogenic Association with Plants. **Cell Host & Microbe**, v. 1, n. 4, p. 263-273,
1322 2007/06/14/ 2007. ISSN 1931-3128. Disponível em: <
1323 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193131280700100X>>.
1324
1325

ANEXOS

1. Anexo I

Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*A atividade imunomoduladora de ArtinM sobre o curso da infecção por Cryptococcus gattii*”, registrado com o número 204/2016, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 30 de julho de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 375 camundongos Balb c machos pesando 21g e 15 camundongos C57Bl/6 machos pesando 21g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e 15 camundongos IL-17R KO machos pesando 21g, 15 camundongos IL-23 KO machos pesando 21g, 15 camundongos IL-6 KO machos pesando 21g, 15 camundongos IL-1R KO machos pesando 21g, 15 camundongos IFN γ KO machos pesando 21g, 15 camundongos iNOS KO machos pesando 21g, oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 30/07/2018 a 31/10/2020.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

We certify that the Protocol nº 204/2016, entitled “*Immunomodulatory activity of ArtinM during the cryptococcosis infection*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 07/30/2018. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 375 male Balb c mice weighing 21g and 15 male C57Bl/6 mice weighing 21g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School and 15 male IL-17R KO mice weighing 21g, 15 male IL-23 KO mice weighing 21g, 15 male IL-6 KO mice weighing 21g, 15 male IL-1R KO mice weighing 21g, 15 male IFN γ KO mice weighing 21g, 15 male iNOS KO mice weighing 21g, from the Breeding Center of Special Mice of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 10/31/2020.

Ribeirão Preto, 30 de julho de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP – USP