Isabel Alves Feitosa Maciel

Caracterização e Clonotipagem dos Linfócitos T Antígeno
específicos em Pacientes Portadores de Neurocriptococose e
indivíduos expostos ao fungo

São Paulo,
2021

Isabel Alves Feitosa Maciel

Caracterização e Clonotipagem dos Linfócitos T Antígeno
específicos em Pacientes Portadores de Neurocriptococose e
indivíduos expostos ao fungo

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos

São Paulo,

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Maciel, Isabel Alves Feitosa

Caracterização e clonotipagem dos linfócitos T
antígeno específicos em pacientes portadores de
neurocriptococose / Isabel Alves Feitosa Maciel. --
São Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientador: Dewton de Moraes Vasconcelos.

Descritores: 1.Criptococose 2.Meningite
criptocócica 3.Fatores de virulência 4.Epidemiologia
da criptococose 5.Cryptococcus neoformans
6.Cryptococcus gattii 7.Imunossupressão 8.Pacientes
imunocompetentes

USP/FM/DBD-172/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: Maciel, Isabel Alves Feitosa

Título: Caracterização e Clonotipagem dos Linfócitos T Antígeno específicos em Pacientes Portadores de Neurocriptococose e indivíduos expostos ao fungo.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof.Dr.

Instituição
Julgamento

Prof.Dr.

Instituição
Julgamento

Prof.Dr.

Instituição
Julgamento

Prof.Dr.

Instituição
Julgamento

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho com imenso carinho a todos os pacientes e aos seus familiares, que mesmo durante os momentos mais difíceis, de enfrentamento da doença concordaram em ajudar e tornaram possível esse estudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a minha fonte inesgotável de luz, coragem, perseverança e fé durante essa minha jornada.

A meu amado esposo Celso pelo imenso amor, apoio emocional, compreensão e companheirismo dedicados a mim em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amados filhos Luciano e Fernando, Mariana e Fernanda (noras) e netinhos pela imensa alegria e inspiração que embala meu coração todos os dias.

Um agradecimento especial aos meus pais, mãe (Jô) pai José Feitosa (in memoriam) Marta (irmã) Renato (irmão), Kátia (cunhada), Ricardo, Caio, Eric e Renatinha (sobrinhos) pelo imenso apoio incentivo e carinho nos momentos de desânimo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos pela credibilidade e por cada ensinamento de humildade, bondade, perseverança e acima de tudo pela compreensão e paciência nos momentos mais difíceis.

À minha querida Roseli S. Freitas, minha “*Teacher*” agradeço imensamente por tudo, principalmente por todo o suporte acadêmico e espiritual nos momentos mais difíceis que passei durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Gil Benard pela imensa generosidade e contribuição permitindo uma etapa da realização desse trabalho no LIM 53. Agradeço igualmente ao pessoal do LIM 53 pela presteza e carinho: Dr. Gilda Del Negro, Viviane Gimenes, Sonia C. Cavalcante, Mônica S.M. Vidal e Fabio.

À Profa. Dra. Márcia Melhem e ao Prof. Dr. Meyer Wieland pelo carinho, apoio e contribuição.

À Dra. Renata Buccheri pela constante contribuição na avaliação clínica e na seleção dos pacientes hospitalizados.

Ao apoio e carinho da Profa. Dra. Maria Notomi Sato, Prof. Dr. Jorge Casseb, e Dr. Thiago Bezerra.

À querida amiga Juliana Ruiz por me ajudar e ensinar toda parte de citometria e análises.

À querida amiga Alana Dias por todos os ensinamentos sobre cultura celular.

Agradeço ao pessoal do Adolfo Lutz Dra. Adriana Pardini Vicentini, Dra. Paula Rigato e Camila pelo auxílio e incentivo.

Aos amigos Tatiane Mitiko (Tati) e Daniel Lopes que sempre me ajudaram com orientações sobre cultura celular e coleta do material biológico.

Aos amigos e funcionários de convívio diário do LIM56 que nos apoiam prontamente e nos dão força todos os dias. Alunos: Paula (Paulinha), Gabriela, Luanda, Bruna, Vanessa (Van), Iara, Marina, Alexia, Tamires, Natalia, Tamara, Carol, Victor, Carlos, Fábio. Funcionários: Maíra, Celeste, Noêmia, Silvia (Silvinha) Adriana (Dri), Edna, Cristina (Cris), Rosa, Eduardo, Lucio, Luiz, Anderson e Lucas.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001”.

À Universidade de São Paulo pela imensa oportunidade de me profissionalizar.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Taxonomia de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	2
1.2 Aspectos gerais	2
1.2.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	4
1.2.2 <i>Cryptococcus gattii</i>	4
1.3 Epidemiologia das variedades <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	4
1.3.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	5
1.3.2 <i>Cryptococcus gattii</i>	5
1.4 Fatores de virulência	5
1.5 Manifestações Clínicas	9
1.6 Resposta Imune Inata	10
1.6.1 Neutrófilos	10
1.6.2 Macrófagos	10
1.6.3 Células Dendríticas	12
1.7 Resposta Imune adaptativa	13
1.7.1 Via Th1	13
1.7.2 Via Th2	14
1.7.3 Células T regulatórias (Treg)	14
1.7.4 Células T gama delta	15
1.8 Justificativa	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Especificamente os objetivos foram:	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3. 1 Casuística	19
3.1.1 Critérios de inclusão	19
3.1.2 Critérios de exclusão	20
3.2 Cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	20

3.2.1 Recaracterização das Cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	21
3.2.2 Provas Bioquímicas	21
3.2.3 Ágar Niger	21
3.2.4 Teste da urease	21
3.2.5 Quimiotipagem Ágar CGB (Meio Canavanina-glicina-azul de bromotimol)	222
3.3 Redução de cápsula de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	22
3.3.1 Exoantígenos de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	22
3.3.2 Exoantígenos de <i>Histoplasma capsulatum</i> e <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	233
3.4 Inativação e Esterilidade dos Antígenos.....	23
3.5 SDS-PAGE dos antígenos de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>C. gattii</i> ...	24
3.6 Separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	25
3.6.1 Descongelamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	25
3.6.2 Ensaio de avaliação da produção de IFN- γ pelo método Enzyme Linked Immunospot (ELISPOT).....	266
3.6.3 Imunofenotipagem dos linfócitos T e subpopulações CD4 ⁺	27
3.6.4 Ajuste dos parâmetros no citômetro	28
3.6.5 Análise Estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Recaracterização e redução da cápsula das cepas (ATCC) de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	29
4.2 Produção dos antígenos.....	3131
4.3 Gel SDS-PAGE	33
4.4 Características do grupo de pacientes e controles incluídos no estudo Elispot	33
4.4.1 Avaliação da frequência de células secretoras de citocinas (SFC) ..	34
4.4.2 Características do grupo de pacientes e controles incluídos no estudo para imunofenotipagem dos linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ no sangue periférico	39
4.4.3 Estratégia de análise da imunofenotipagem dos linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ no sangue periférico.....	40

4.4.4 Caracterização fenotípica dos linfócitos totais e subpopulações CD3 ⁺ CD4 ⁺	42
4.4.5 Características Clínicas de pacientes com neurocriptococose “Imunocompetentes”	48
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:	50
5.1 Antígeno	50
5.2 Imunofenotipagem	56
6 ANEXOS	62
ANEXO A - Antígenos de <i>Cryptococcus</i> : Filtrado de Cultura (FC) inativados com timerosal borato e inibidor de proteases (FMSF).....	62
ANEXO B - Antígenos <i>Cryptococcus</i> : <i>Cell Free</i> (CFA) e Somático (So) Inativados com timerosal borato.....	63
ANEXO C - Antígenos <i>Cryptococcus</i> : Filtrado de cultura, <i>Cell Free</i> (CFA) e Somático com inibidor de proteases (FMSF)	64
ANEXO D - Antígenos <i>Cryptococcus</i> : Filtrado de Cultura, <i>Cell Free</i> (CFA) e Somático inativado pelo calor (tindalização)	65
ANEXO E - Antígenos de <i>Histoplasma capsulatum</i> e <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	66
ANEXO F - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Erro! Indicador não definido.	
ANEXO G - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP HC.....	72
ANEXO H - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP ER	76
ANEXO I - Ficha clinica do paciente.....	81
ANEXO J - Ficha do Aluno	812
ANEXO K- Cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	8284
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AmBd	Anfotericina B desoxicolato
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BHE	Barreira Hematoencefálica
<i>C. gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CCR	Receptor de quimiocinas
CDR3	Região determinante de complementaridade
CFA	<i>Cell Free Antigen</i>
CGB	Canavanina-glicina-azul de Bromotimol
CLRs	Receptores do tipo lectina C
CMC	Candidíase Mucocutânea Crônica
CMNs	Células Mononucleares
DCs	Células Dendríticas
DI	Água Deionizada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTH	Reação de hipersensibilidade tardia
ELISPOT	<i>Enzyme Linked Immunospot</i>
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GALXM	Galactoxilomanana
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
GXM	Glicuronoxilomanana
GzmA	Granzima A
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPL	Lisofosfolipase
LPS	Lipopolissacarídeo
LPTA	Lisofosfolipase transacilase
LT	Linfócito T
M1	Macrófagos clássicos
M2	Macrófagos alternativos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOMP	Permeabilização da membrana mitocondrial externa
MP	Manoproteínas
N	<i>Naïve</i>
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T
NLRs	Receptores do tipo NOD-símile
NO	Oxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão salina fosfato
PHA	Fitohemaglutinina
PKC α	Proteína quinase C α
PLB	Fosfolipases β 1
PMA	Forbol 12- Miristato 13- Acetato
PMN	Polimorfonucleares
PMSF	<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PtdSer	Fosfatidilserina
PWM	<i>Pokeweed mitogen</i> (Mitógeno do <i>pokeweed</i>)
RHAMM	Receptor endotelial de motilidade mediada por hialuronano
RNS	Espécies nitrogenadas

ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAB	Ágar Sabouraud Dextrose
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SFC	Células formadoras de spots
SNC	Sistema nervoso central
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT1	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
T regs	Células T reguladoras
T α β	Célula T alfa beta
T $\gamma\delta$	Célula T gama delta
TCRA	Receptor de célula T α
TCRB	Receptor de célula T β
TCRs	Receptores de células T
TEMRA	Célula T de Memória Terminalmente Diferenciada
TGF - β	Fator de crescimento e transformação beta
TH	<i>T helper</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TMC	Célula T de Memória Central
TME	Célula T de Memória Efetora
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF - α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR 1	Receptor de fator de necrose tumoral 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Componente da parede celular de <i>Cryptococcus</i>	8
Figura 2 - (A) Célula Típica; (B) Célula Titan.....	8
Figura 3 - Mecanismo de invasão do <i>Cryptococcus</i> no SNC.....	12
Figura 4 - Recaracterização das cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	3030
Figura 5 - Redução da cápsula de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	30
Figura 6 - Organograma da produção dos antígenos <i>C.neoformans</i> e <i>C.gattii</i>	332
Figura 7- Gel SDS-PAGE.	33
Figura 8 - Ecoturistas.....	355
Figura 9 - Micologistas.....	35
Figura 10 - Tratadores de Aves	36
Figura 11 - Sem exposição ocupacional ao fungo.....	36
Figura 12 - Secreção de IFN - γ , do grupo de estudo Erro! Indicador não definido.	
Figura 13 - Gates de Citometria	41
Figura 14 - Análise dos linfócitos T totais.	43
Figura 15 - Análise das células T CD4 ⁺	43
Figura 16 - Análise das células T CD4 ⁺ $\alpha\beta$	44
Figura 17 - Análise das células T CD4 ⁺ TCR $\gamma\delta$	44
Figura 18 - Análise das células T CD25 ⁺ CD127 ^{low}	45
Figura 19 - Análise das células T CD25 ⁺ CD127 ⁺	45
Figura 20 - Análise das células T CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ (N- Naïve).....	46
Figura 21 - Análise das células T CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ (TMC - Memória Central).....	46
Figura 22 - Análise das células T CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ (TME)	47
Figura 23 - Análise das células T CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ (TEMRA).....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Taxonomia e sorotipos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	3
Quadro 2 - Painel de anticorpos para marcação dos linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺	28
Quadro 3 - Correlação cores e idades dos controles do gráfico.....	37
Quadro 4 - Casuística e correlação clínica dos pacientes com neurocriptococose	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas controle ATCC de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	20
Tabela 2 - Dosagem Protéica dos Exoantígenos	32
Tabela 3 - Casuística da população saudável com exposição ou não a agentes fúngicos	34
Tabela 4 - Dados da secreção de IFN- γ do grupo de estudo	38
Tabela 5 - Casuística dos pacientes e controles selecionados para o estudo	40

RESUMO

Maciel, Isabel Alves Feitosa. Caracterização e clonotipagem dos linfócitos T antígeno específicos em pacientes portadores de neurocriptococose. 2021. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo 2021.

A neurocriptococose é uma infecção causada por fungos do gênero *Cryptococcus* spp. O *C. neoformans* afeta principalmente indivíduos imunossuprimidos, particularmente, pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), enquanto o *C. gattii* afeta geralmente indivíduos “imunocompetentes” sem histórico prévio de doenças ou de alguma outra forma de comprometimento do sistema imune. Neste estudo foi produzido um lote de antígenos a partir das cepas de *C. neoformans* (VNI-VNIV) e *C. gattii* (VGI-VGIV) para avaliação da secreção de IFN- γ pelo método Elispot após estímulos com os antígenos de *C. neoformans* e *C. gattii* em células mononucleares de sangue periférico de quatorze indivíduos controles saudáveis sendo: cinco ecoturistas, dois micologistas, três tratadores de aves, e quatro indivíduos sem relatos de atividades ocupacionais relacionadas a frequente exposição ao fungo. Os resultados mostraram aumento significativo da secreção de IFN- γ no grupo de ecoturistas, micologistas e tratadores de aves em relação ao grupo de indivíduos sem relato de exposições ocupacionais a esses agentes. Nossos resultados sugerem que o aumento significativo da secreção de IFN- γ pode estar relacionado com as contínuas exposições ao fungo a que esse grupo se submete, assim como com resposta imunológica de memória antígeno específica desenvolvida durante a exposição aos *Cryptococcus*. Neste estudo também avaliamos, por citometria de fluxo, a população de linfócitos T CD4⁺ e subpopulações quanto ao estado de ativação e maturação de oito pacientes hospitalizados com neurocriptococose e oito indivíduos controles saudáveis. Os pacientes apresentaram aumento significativo das subpopulações T CD4⁺ $\gamma\delta$, T regulatória CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, CD4⁺CD25⁺CD127^{high}, células T CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻ de memória efetora terminalmente diferenciada (TEMRA) e CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻ de memória efetora (TME). Observamos ainda diminuição significativa dos linfócitos totais, células T CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺

(naïve) e CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺ de memória central (TMC). As células T CD4⁺ e T CD4⁺αβ não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos de estudo. Esses resultados sugerem que a resposta imunológica desses pacientes esteja sofrendo alterações na maturação e diferenciação dos linfócitos T e pode estar relacionado com os fatores de virulência do fungo que interferem em diversos mecanismos das células tanto da resposta imune inata como adaptativa, assim como com possíveis distúrbios de regulação entre as respostas imunes Th1 e Th2 durante a infecção por *Cryptococcus*.

Descritores: 1. Criptococose; 2. Meningite Criptocócica; 3. Fatores de virulência; 4. Epidemiologia da criptococose; 5. *Cryptococcus neoformans*; 6. *Cryptococcus gattii*; 7. Resposta imune na criptococose; 8. Pacientes imunocompetentes.

ABSTRACT

Maciel, Isabel Alves Feitosa. *Characterization and Clonotyping of Antigen Specific T Lymphocytes in Patients with Neurocryptococcosis and exposed individuals*. 2021. Thesis (Doctorate in Sciences) - Universidade de São Paulo, São Paulo 2021.

Neurocriptococcosis is an infection caused by fungi of the genus *Cryptococcus* spp. *C. neoformans* mainly affects immunosuppressed individuals, particularly patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), while *C. gattii* generally affects “immunocompetent” individuals without prior history of disease or any other form of impairment of the immune system.

This study produced a lot of antigens from strains of *C. neoformans* (VNI-VNIV) and *C. gattii* (VGI-VGIV) for evaluation of IFN- γ secretion by Elispot method after stimulation with *C. neoformans* antigens and *C. gattii* in peripheral blood mononuclear cells of fourteen healthy control subjects, being: five ecotourists, two mycologists, three poultry keepers, and four individuals without reports of occupational activities with frequent exposure to the fungus. The results showed a significant increase in IFN- γ secretion in the group of ecotourists, mycologists and bird keepers in relation to the group of individuals without reports of occupational exposures to these agents. Our results suggest the significant increase in IFN- γ secretion may be related to the continuous exposure of these groups of individuals to the fungus, as well as to the specific antigen memory immune response developed during exposure to *Cryptococcus*. In this study we also evaluated by flow cytometry, the population of CD4⁺ T lymphocytes and subpopulations as to the activation and maturation status of eight hospitalized patients with neurocriptococcosis and eight healthy control subjects. The patients showed a statistically significant increase in the subsets T CD4⁺ $\gamma\delta$, regulatory T CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, CD4⁺CD25⁺CD127^{high}, CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻ terminally differentiated effector memory cells (TEMRA) and CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻ effector memory (TEM). Significant decrease in total lymphocytes, CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺ cells (*naïve*) and CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺ central memory (TCM). The T CD4⁺ and T CD4⁺ $\alpha\beta$ cells did not show significant statistic difference between the studied

groups. These results suggest that the immune response of these patients is being affected in the maturation and differentiation of T lymphocytes, which may be related to fungal virulence factors that interfere with several cell mechanisms, affecting both innate and adaptive immune responses, as well as possible regulatory disorders of Th1 and Th2 immune responses during *Cryptococcus* infection.

Descriptors: 1. Cryptococcosis; 2. Cryptococcal meningitis; 3. Virulence factors; 4. Epidemiology of cryptococcosis; 5. *Cryptococcus neoformans*; 6. *Cryptococcus gattii*; 7. Immune response in cryptococcosis; 8. Immunocompetent patients.

1. INTRODUÇÃO

Na última década a biodiversidade global de fungos foi investigada por inúmeras pesquisas e uma grande variedade de técnicas incluindo a filogenia molecular na identificação de muitas espécies enigmáticas demonstrando a grande diversidade dos fungos e os novos táxons, incluindo novas divisões, classes, ordens e famílias. Com base em dados mais recentes pesquisados, estima-se que a variedade das espécies de fungos no planeta esteja em torno de 12 milhões (1). Fungos desempenham papéis importantes em nosso ecossistema como mutualistas e decompositores. Entretanto alguns são considerados patogênicos para humanos devido a sua capacidade de infectar um indivíduo e causar doenças graves com quadros de grande morbidade (2). A maioria das infecções fúngicas é adquirida de fontes ambientais, porém podem ser resultantes de fontes de colonização endógena. Ademais, a capacidade dos fungos em colonizarem e/ou infectarem o hospedeiro humano demonstra uma enorme capacidade de reprogramação específica dos mecanismos de adaptação desenvolvidos pelo fungo para garantir sua sobrevivência em diversas condições adversas na luta pela aquisição de nutrientes (2).

Dentre a gama de agentes fúngicos existentes *Cryptococcus* spp. é um patógeno oportunista que afeta principalmente indivíduos imunossuprimidos, como pacientes HIV-AIDS que apresentam defeitos na imunidade mediada por células (3). (4). A meningite criptocócica apresenta maior incidência nesse grupo e está associada a 181.000 mortes a cada ano (3) (5).

A neurocriptococose afeta principalmente pacientes imunossuprimidos, no entanto na última década observou-se aumento da incidência em indivíduos “aparentemente imunocompetentes”. Pacientes imunocomprometidos ou submetidos a terapias imunossupressoras são mais suscetíveis a infecção pela variedade *C. neoformans*, enquanto *C. gattii* afeta geralmente indivíduos aparentemente saudáveis sem histórico prévio de doenças ou de alguma outra forma de comprometimento do sistema imune (5)(6).

A neurocriptococose em humanos ainda apresenta diversos pontos obscuros e só através de muito estudo será possível responder claramente as inúmeras questões sobre a severidade da doença.

1.1 Taxonomia de *C. neoformans* e *C. gattii*

Estudos recentes de 11 *loci* genéticos, junto com o avanço das técnicas moleculares, revelaram uma diversidade genética significativa com o complexo patogênico *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, propondo uma nova taxonomia para o complexo das duas espécies de *Cryptococcus* sugerindo a separação desse complexo em sete espécies: O antigo *C. neoformans* foi classificado em *C. neoformans* e *C. deneoformans* que se referem às previamente conhecidas como: *C. neoformans* var *grubii* e *C. neoformans* var *neoformans*; o antigo *C. gattii* foi reclassificado como *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (4), que representam o que era anteriormente conhecido como *C. gattii* VGI a VGIV, respectivamente. Este estudo fará menção somente às duas variedades: *C. neoformans* e *C. gattii* (7)(4).

1.2 Aspectos gerais.

Cryptococcus spp. é o agente responsável pela criptococose. Otto Busse (patologista) e Abraham Buschke (dermatologista) foram os primeiros médicos a relatar a criptococose humana em uma mulher com 31 anos que apresentava Osteomielite crônica na tíbia. Busse e Buschke (1894) apresentaram suas descobertas em palestras consecutivas no *Greifswald Medical Society* em julho de 1894 denominando a levedura encontrada em *C. neoformans* (8)(9).

O gênero *Cryptococcus* spp. apresenta ocorrência mundial. São encontrados em regiões tropicais e subtropicais. Além disso, fontes ricas em nitrogênio, como ureia e creatinina favorecem o crescimento destes fungos (10). Embora exista 37 espécies reconhecidas de *Cryptococcus*, duas são responsáveis pela grande maioria das infecções em humanos: *C. neoformans*

(sorotipos A e D) e *C. gattii* (sorotipos B e C) ; ambas as espécies acometem tanto humanos como animais (4)(8)(11)(12)(13) (14).

Ainda que ocorram diferenças ecológicas, epidemiológicas, patológicas, bioquímicas e genéticas, ambas exibem tropismo para o sistema nervoso central (SNC)(8).

Baseado na composição antigênica da cápsula e nas características bioquímicas, foram identificados até o momento cinco sorotipos (A, B, C, D e AD): - *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A); - *C. neoformans* (sorotipos D e AD) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) como pode ser visto no (Quadro 1) (8)(14)(15).

O fungo caracteriza se por apresentar blastoconídios e uma espessa cápsula esférica de forma arredondada e ovalada com 5 a 7 µm de diâmetro constituído de polissacarídeos antigênicos:- glicuronoxilomanana (GXM); - galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (MP) (8)(14)(15).

Os ciclos de vida de *C. neoformans* e *C. gattii* envolvem a fase assexuada e sexuada. O estágio sexuada, ou teleomórfica existe como *Filobasidiella bacillispora*, sendo caracterizada pela formação de hifas com conexões de fixação, podendo ser observado somente durante o cruzamento. A forma assexuada, estágio anamórfico é denominado por *Filobasidiella neoformans* (16)(15).

Quadro 1- Taxonomia e sorotipos de *Cryptococcus* spp

Espécies	Variedades	Sorotipos	Tipos moleculares
<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	A	VNI e VNII
	<i>neoformans</i>	D	VNIV
	-	AD*	VNIII
<i>C. gattii</i>		B e C	VGI, VGII, VGIII e VGIV

*AD híbrido diplóide. FONTE: Chayakulkeeree e Perfect (2006).

1.2.1 *Cryptococcus neoformans*

Compreende espécies de leveduras patogênicas, de natureza cosmopolita, e nicho ecológico urbano. Têm sido isolados a partir do solo, ocos de árvores, matéria orgânica em decomposição, excretas de diversas aves principalmente pombos. Alguns estudos evidenciam o fato de que os pombos não desenvolvem a doença provavelmente por apresentarem uma temperatura corporal entre 40°C e 42°C (17).

1.2.2 *Cryptococcus gattii*

Possui nicho ecológico rural e urbano de ocorrência sazonal relacionado à floração do eucalipto. São geralmente encontrados em uma grande variedade de árvores como pinheiros, cedros, carvalhos, fícus, jambolão, cássia rosa (18).

Pesquisas em amostras ambientais descrevem o isolamento de ambas as espécies em vegetações de praças públicas localizadas em algumas cidades do Brasil (19)(20)(21)(22)(23).

1.3 Epidemiologia das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*

A ocorrência de *C. neoformans* e *C. gattii* varia de acordo com a população, região geográfica e período estudado.

No Brasil o perfil epidemiológico foi traçado envolvendo 467 isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans*. Os resultados obtidos demonstraram que os sorotipos mais isolados foram: *C. neoformans* sorotipo A (77,9%); *C. neoformans* sorotipo AD (1,3%); *C. neoformans* sorotipo D (0,4%); *C. gattii* sorotipo B (18,2%) e *C. gattii* sorotipo C (0,2%) sendo que 1,9% dos isolados não foram tipificáveis (17).

Em relação à distribuição dos sorotipos a região sul, sudeste e centro oeste detêm um maior predomínio do sorotipo A, enquanto que nas regiões norte e nordeste a maioria dos isolados foi do sorotipo B (17).

1.3.1 *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans VN I e VN II são as espécies mais comumente isoladas em amostras clínicas no mundo, representando mais de 95% dos achados em Criptococose (16). *Cryptococcus neoformans* variedade VN I tem sido mais encontrado em países como: Dinamarca, Alemanha, Itália, França, Suíça e Estados Unidos (16). Ambas as variedades, VN I e VN II causam infecção no homem sendo que 90% ocorrem em pacientes que apresentam algum estado de imunossupressão (24).

1.3.2 *Cryptococcus gattii*

Cryptococcus gattii VG II compreende (47%) sendo a variedade de maior incidência global seguido por VG I (34%), VG III (11%) e VG IV (8%). Entre os isolados clínicos o VG I e o VG II foram os mais frequentes, seguidos pelo VG III e VG IV (25).

Estudos anteriores propuseram que o surto de *C. gattii* VG II em Vancouver Canadá entre os anos de 1999 a 2003 e sua expansão no noroeste do Pacífico fossem originários da Austrália, no entanto estudos mais recentes corroboram com a ideia de que *C. gattii* VG II tenha se originado na América do Sul de uma cepa ancestral (LMM-645) da região da floresta Amazônica (25)(26). Quanto à transmissão de VG II para a América do Norte, há uma concordância de que a Austrália e a Tailândia foram possivelmente responsáveis pela disseminação global (25)(26).

1.4 Fatores de virulência

Vários fatores de virulência estão associados à criptococose, tais como a produção de cápsula, biossíntese de melanina, manitol, lacase, urease, produção de fosfolipases e termotolerância a temperaturas fisiológicas de mamíferos a 37°C. Esses fatores de virulência favorecem o parasitismo do fungo e podem comprometer a resposta imune do indivíduo (27).

A parede celular dos fungos de importância médica é constituída por Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs) (2).

Os três principais componentes são: β glucanos (polímeros de glicose) especialmente β (1,3); β glucanos variados β (1,6); quitina (polímero de N-acetilglucosamina) e mananas (cadeias de várias moléculas de manose) (2).

Os polissacarídeos são descritos como um fator de virulência de grande complexidade. Esses açúcares do *Cryptococcus* interferem na migração de fagócitos, inibem a proliferação de células T e retardam diretamente a maturação e ativação de células dendríticas (DCs), desempenhando potentes mecanismos de evasão da resposta imune (28). Assim sendo, o fungo também consegue escapar dos macrófagos e subverter respostas imunes do hospedeiro para sobreviver e se replicar (2)(29)(30)(31). A cápsula é hidrofílica, composta por 99% de água. Cerca de 90 a 95% da cápsula é constituída por glicuroxilomanana (GXM) sendo este o principal componente capsular com propriedades de induzir a apoptose de macrófagos e inibir a proliferação de linfócitos T. A galactoxilomanana (GalXM) constitui 5-8% da cápsula e <1% da cápsula é composta por manoproteínas (MPs) (15). Trabalhos experimentais mais recentes, em modelos murinos, estão evidenciando a presença de células Titans (32). Essas células são poliplóides, apresentam uma cápsula muito compactada e uma parede celular muito espessa (32). São maiores que as células típicas de *C. neoformans* e podem chegar até 100 μ m de diâmetro, estão associadas com uma resposta imune não protetora e possível disseminação para o sistema nervoso central (SNC); além disso, correspondem a 20% das células fúngicas encontradas no pulmão (33) (Figura 1 e 2).

A melanina é um importante fator de virulência, protege o fungo contra condições ambientais adversas como temperaturas extremas e raios ultravioletas. Tem potente atividade antioxidante, isso pode favorecer a migração das leveduras do pulmão para o SNC (34)(35). A produção de melanina requer substratos como as catecolaminas, ou seja, noradrenalina, dopamina e adrenalina. A ausência desses nutrientes e os efeitos oxidantes deletérios dirigidos ao fungo induzem a enzima fenoloxidase (lacase) a catalisar a conversão destes compostos difenólicos em melanina (35)(34). O tropismo da

levedura para o sistema nervoso central pode estar relacionado à necessidade do fungo em adquirir esses substratos e garantir sua sobrevivência. O manitol protege o fungo de radicais hidroxilas, gerados por neutrófilos. Desse modo consegue se proteger do ataque oxidativo dos fagócitos (35)(34). A infecção do SNC também pode estar relacionada com a produção do manitol nas meningoencefalites (15)(36).

A urease também é um importante fator de virulência, a enzima catalisa a ureia em amônia alcalinizando o meio, o que favorece a sobrevivência do patógeno (37). Embora o papel da urease na invasão da barreira hematoencefálica (BHE) seja desconhecido, um estudo em modelo animal com cepa selvagem urease/negativa e cepas altamente virulentas demonstraram que a degradação enzimática da ureia em amônia pode danificar as células endoteliais e levar a um aumento na permeabilidade da barreira (BHE) promovendo o sequestro de células criptocócicas para o SNC (34)(37).

Cryptococcus produz e secreta enzimas hidrolíticas, proteases, fosfolipases B1 (PLB), lisofosfolipase (LPL), e lisofosfolipase transacilase (LPTA) (38). Foi observado *in vitro* que a fosfolipase B1 é uma enzima que facilita a adesão do fungo no epitélio pulmonar facilitando sua sobrevivência e replicação dentro dos macrófagos (14). As fosfolipases têm sido ditas como responsáveis na degradação de membranas celulares e lise em células do hospedeiro (38).

Figura 1- Componentes da parede celular de *Cryptococcus*

Cryptococcus: (A) célula típica, (B) célula Titan. Glicuroxilomanana (GXM) Galactoxilomanana (GalXM); α -Glucanas; β -Glucanas; Mananas; Proteínas; Melanina; Quitina e Membrana. FONTE: Mukaremera et al., (2018).

Figura 2- (A) Célula Típica; (B) Célula Titan

Cryptococcus: (A) Cápsula da célula típica de 5 a 7 μm de diâmetro, (B) cápsula da célula Titan é muito espessa e compacta pode chegar a 100 μm de diâmetro. FONTE: Mukaremera et al., (2018).

1.5 Manifestações Clínicas

A neurocriptococose ocorre após a inalação de basidiósporos ou de leveduras desidratadas dos fungos. O pulmão é a principal porta de entrada dos propágulos infectantes. A infecção pulmonar pode ser assintomática em 38% dos casos podendo permanecer latente por anos ou ainda se manifestar anos mais tarde, caso o indivíduo por alguma razão tenha a imunidade comprometida (10).

A partir do foco pulmonar a infecção pode se disseminar para o (SNC) levando a quadros de meningites ou meningoencefalites aguda, subaguda ou crônica com presença de afasias (distúrbio de linguagem), perda da memória, perda da visão, convulsão e coma (10)(25). Os sintomas mais observados na neurocriptococose são cefaleias persistentes, vertigens, náuseas e febres (10)(25).

A avaliação hematológica de pacientes portadores de infecção crônica pelo HIV com neurocriptococose geralmente apresenta linfócitos T CD4⁺ com valores inferiores a 100 células/ μ L, porém graças às terapias antirretrovirais a contagem dessas células nesses pacientes vem se apresentando superior a 200 células/ μ L (39) (20). Quanto à análise do líquido cefalorraquidiano o que geralmente se observa é: pleocitose (aumento do número de leucócitos); hipoglicorraquia (baixo nível de glicose) e hiperproteínorraquia (elevação de proteínas)(10).

Muitos parâmetros sobre o perfil imune do paciente e as terapias mais adequadas aplicadas nas meningites criptocócicas vêm despertando o interesse da Sociedade de Doenças Infecciosas da América. Dados publicados entre 1999 a 2009 estabeleceram as Diretrizes de Prática Clínica o Manejo da Doença Criptocócica e as terapias ministradas nas complicações do (SNC) (20). Pacientes em estado grave devem receber: Anfotericina B desoxicolato (AmBd IV de 0,7-1,0 mg/kg/dia), ou Anfotericina B lipossomal (3-4 mg/kg/dia) por via intravenosa uma vez por dia, mais 100 mg/kg/dia de flucitosina oral uma vez por dia durante duas semanas, seguidas de 400 mg de fluconazol oral uma vez por dia durante 8 semanas. A manutenção da terapia de pacientes com atendimento ambulatorial deve ser seguida com 200 mg de Fluconazol oral por dia (20). É

imprescindível que a administração desses medicamentos seja supervisionada por uma rigorosa monitorização ao nível de toxicidade da droga, por um longo período (20).

1.6 Resposta Imune Inata

1.6.1 Neutrófilos

A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa do organismo. Neutrófilos, macrófagos, e células dendríticas (DCs) são células de grande importância na resposta ao *Cryptococcus* (34)(40).

Os neutrófilos exercem atividade fungicida através de reações oxidativas, e produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), IL1- β , IL-6 e IL-8 (41). No entanto, fatores de virulência como o manitol e a melanina produzidos pelo fungo conseguem evitar os efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio e seus intermediários (íons hidroxila e hipoclorito) dificultando à ação dos neutrófilos no combate a infecção (34)(35)(40). Além disso, os polissacarídeos, principalmente a GXM pode afetar a expressão das moléculas de superfície dos neutrófilos como a L-Selectina e o receptor de TNF (TNF-R), através de um remodelamento da superfície dos polimorfonucleares (PMN)(42)(43). Isso pode gerar uma perda funcional das L-Selectinas e do receptor de TNF (TNF-R) e dessa forma, a migração de PMN para o foco infeccioso (42)(43). Outros estudos sugerem que a manose 6-O-acetilada de GXM consegue inibir a migração dos neutrófilos, possivelmente para evitar a liberação de maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias no local da infecção (40) (44).

1.6.2 Macrófagos

Macrófagos são células fagocíticas importantes do sistema imunológico que secretam uma vasta gama de citocinas, moléculas proteicas responsáveis por desencadear sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para os diferentes tipos celulares do sistema imune (34). Quando estão expostos a

um microambiente de citocinas com predomínio de interferon gama (IFN- γ) eles se diferenciam em macrófagos ativados pela via clássica, conhecidos como macrófagos (M1) e desempenham função protetora importante contra agentes patogênicos intracelulares, além de produzirem citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-12 e TNF. Por outro lado, macrófagos expostos a um microambiente constituído por interleucinas do tipo IL-4, IL-13 e IL-10 são ativados pela via alternativa (M2), diferenciam-se em células antiinflamatórias e apresentam baixa capacidade na apresentação de antígenos (34) (40)(45) (28).

Cryptococcus é um fungo intracelular facultativo e pode sobreviver dentro dos fagócitos. Evidências sugerem que um mecanismo denominado “Cavalo de Tróia” permite que tanto o *C. neoformans* como *C. gattii* sobrevivam e se multipliquem dentro dos macrófagos migrando para outros tecidos inclusive o SNC (34)(46).

Um estudo publicado por Yang et al. (2017) demonstrou outras duas possíveis vias transversais de invasão utilizadas por *C. neoformans* e possivelmente também por *C. gattii*, a via transcelular e via paracelular (Figura 3) (34)(29)(30). A via transcelular refere-se à ligação de *C. neoformans* a receptores endoteliais de motilidade mediada por hialuronano (RHAMM) e ao receptor CD44 durante a endocitose celular (34). Esses estudos sugerem que as interações entre *C. neoformans* e os receptores expõem tirosinas que serão fosforiladas e reguladas pelas proteínas quinase Ca (PKC α) e tirosina quinase 3 (DYRK3) promovendo uma reorganização do citoesqueleto das glicoproteínas presentes nos receptores permitindo a passagem do fungo pela via transcelular (34). A via paracelular refere-se à invasão de *C. neoformans* através das junções de células endoteliais danificadas ou enfraquecidas, possivelmente pela digestão enzimática da urease e ação das manoproteínas (34). A probabilidade de invasão aumenta possivelmente após as manoproteínas ativarem o plasminogênio e a plasmina. A plasmina ativada pode se ligar e danificar a membrana e a matriz extracelular favorecendo a invasão pela via paracelular (34).

Figura 3 - Mecanismo de invasão do *Cryptococcus* no SNC

(A) Travessia Transcelular: *C. neoformans* se liga a receptores de células endoteliais de motilidade mediada por hialuronano (RHAMM) e (CD44) e induz a fosforilação das proteínas quinases $C\alpha$ ($PKC\alpha$) e da tirosina quinase 3 (DYRK3) a reorganizarem o citoesqueleto da actina do CD44 favorecendo a endocitose; (B) “Cavalo de Tróia” o fungo é fagocitado por um macrófago e atravessa a BHE; (C) Via Paracelular: As manoproteínas ativam plasminogênio e quando a plasmina é ativada danifica a membrana e a matriz extracelular permitindo ao fungo atravessar pelas junções das células endoteliais danificadas ou enfraquecidas. FONTE: Yang, Wang e Zou (2017).

1.6.3 Células Dendríticas

Células dendríticas desempenham papel importante no início da resposta imune promovendo a interface entre o sistema imune inato e adaptativo durante a infecção (40).

O polissacarídeo GXM desempenha efeitos supressores importantes nas respostas imunes, interferindo tanto na ativação quanto na maturação das DCs (28)(47)(48). Estudos de Vecchiarelli et al., (2003) mostraram que cepas mutantes acapsulares de *C. neoformans* não prejudicaram a ativação e expressão de moléculas do MHC classe I e II, CD40 e CD83; no entanto cepa capsular de *C. neoformans* foi capaz de regular negativamente moléculas do

MHC classe I e II (48). Pesquisas realizadas com camundongos infectados com *C. gattii* mostraram que as DCs expressavam níveis mais baixos de moléculas de superfície do MHC II, assim como CD86, CD83, CD80 e CCR7, como também das IL-12 e IL-23 quando comparados com camundongos infectados com *C. neoformans* (28)(49). Este estudo sugere que *C. gattii* interfere no processo de maturação das DCs afetando a liberação de citocinas de grande importância como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) envolvido no processo de maturação dessas células e podem estar relacionadas com a doença em indivíduos imunocompetentes (28)(49).

1.7 Resposta Imune adaptativa

1.7.1 Via Th1

A resposta imune adaptativa é fundamental na defesa do organismo contra *Cryptococcus spp* (4).

Células T CD4⁺naïve são ativadas e diferenciadas em vários subconjuntos como Th1, Th2 e Th 17. A ativação da via Th1 ocorre após interações das células apresentadoras de antígenos (APCs) entre os receptores de reconhecimento de padrões do hospedeiro, e os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (2)(4). No entanto, isso depende do agente infeccioso, do estímulo antigênico e do microambiente onde são produzidas as citocinas (2)(4).

As células do tipo CD4⁺ Th1 dirigem a resposta imune protetora contra *Cryptococcus spp.*, sendo caracterizada pela produção de interleucinas: IL-2, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ). A secreção de IFN- γ é induzida pela IL-12 produzida por células dendríticas, macrófagos e monócitos em resposta a infecções por patógenos intracelulares. Essas interações são importantes e resultam em um potente mecanismo de defesa contra infecções (4) (28).

Chen et al. (2005) mostraram em um modelo murino que a interação entre IFN- γ com seu receptor também é fundamental na sinalização da resposta efetora. Nesse estudo foi demonstrado que camundongos mutantes para o receptor de IFN- γ recrutavam células inflamatórias, porém eram incapazes de

conter a infecção criptocócica. Esse estudo demonstrou ser imprescindível uma sinalização adequada para o desenvolvimento de uma resposta Th1. Defeitos nessa sinalização podem comprometer de algum modo a resposta imune protetora na infecção pulmonar por *C. neoformans* (50).

1.7.2 Via Th2

Várias citocinas participam da resposta imune com perfil Th2 como: IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. A IL-4 define o perfil celular para a via Th2, enquanto a IL-10 tem o papel de inibir macrófagos, produção de IFN- γ e IL-12, ou seja, suprimir a via Th1 (28). Estudos em humanos e modelos murinos demonstram que durante a criptococose a via Th2 é regulada por IL-4 e IL-13 promovendo a quimiotaxia de eosinófilos nos pulmões e piora da doença (51).

Muller et al., (2007), num estudo experimental com camundongos BALB/c demonstrou que quando *Cryptococcus spp.* induz a produção das citocinas IL-4 e principalmente IL-13 pode levar ao desenvolvimento de macrófagos ativados alternativamente (M2) além da eosinofilia pulmonar, produção de muco e hiper-reatividade respiratória elevada. A IL-13 não só contribui para a inflamação alérgica como pode ser muito prejudicial durante a infecção por *C. neoformans* (52). Essa ativação vem sendo associada a maior risco de disseminação da criptococose (51) (52). As vias de ativação durante a infecção pelo fungo podem ser determinantes na resposta imune no hospedeiro (28).

1.7.3 Células T regulatórias (Treg)

As células T reguladoras (Tregs) empenham-se ativamente na manutenção da homeostase do organismo. Desenvolvem-se no timo e participam da regulação de linfócitos reativos que escapam da tolerância central e migram para a periferia (53)(54). As células Tregs de ocorrência natural foram caracterizadas por Sakaguchi et al. (1995) pela expressão de CD4⁺CD25⁺ e fator de transcrição Foxp3 (55). Estudos mais recentes desenvolvidos por Liu et al., (2006), com amostras clínicas descrevem o CD127 como um biomarcador melhor que o

CD25 para a identificação de células T CD4⁺ Foxp3⁺ em células Tregs humanas. Ou seja, células Tregs que expressam CD4⁺CD25⁺CD127^{low} possuem ~80% de FoxP3⁺ (56).

A função das células Tregs no contexto da infecção por *Cryptococcus spp.* ainda não foi esclarecido, no entanto o papel destas células está associado com as reduções de citocinas pró-inflamatórias. Estudos com camundongos infectados com *C. neoformans*, demonstraram que a depleção de células Foxp3⁺Tregs aumenta a população de células Th2 nos pulmões. Além dessas observações iniciais, pouco se sabe sobre o mecanismo de supressão das células Th1 exercido por células Tregs durante a infecção por *Cryptococcus spp.* (4)(33).

1.7.4 Células T gama delta

Linfócitos T que expressam receptores de células T (TCRs) alfa/beta e gama/delta junto ao complexo CD3 exercem diferentes funções durante as infecções (57)(58). Os TCRs alfa/beta são predominantes em aproximadamente 90–95% dos LT periféricos, reconhecem antígenos peptídicos apresentados via MHC I e II (58).

Células T $\gamma\delta$ apresentam características distintas das células T $\alpha\beta$ convencionais. Apresentam fenótipo principalmente CD4 / CD8 duplo negativo e não reconhecem antígenos peptídicos clássicos, produzem citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL17 além de apresentarem atividade citotóxica com liberação de granzimas e perforinas (57). As células T $\gamma\delta$ representam 1-10% dos linfócitos periféricos e estão presentes em mucosas, tecido epitelial e órgãos linfóides secundários. Respondem a um amplo espectro de antígenos endógenos e ou exógenos, ou seja, bactérias, protozoários e células infectadas (57). São linfócitos não convencionais, seus TCRs não são restritos ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), podem responder através da associação a padrões moleculares associados à patógenos e exercem tanto as funções de células da imunidade inata como da resposta imune adaptativa (57)(59). Embora apresentem um repertório de TCR limitado circulam com um fenótipo pré-

ativado. Durante a infecção podem atingir 50% do total de células T circulantes, sendo assim, são capazes de respostas imunológicas rápidas na ausência dos ligantes de TCRs (57).

Seu papel durante a infecção por *Cryptococcus* ainda é bastante controverso; alguns estudos demonstraram diversas divergências em seus resultados possivelmente pelo uso de diferentes cepas de *C. neoformans* em diferentes modelos animais. O entendimento e os sinais que regulam a plasticidade efetora dessas células precisam ser mais investigados sob diferentes condições durante a infecção por *Cryptococcus spp.* (4)(59).

1.8 Justificativa

O entendimento sobre o repertório de células T em infecções como a neurocriptococose em pacientes imunocompetentes ainda é reduzido.

O estudo da resposta imune mediada por linfócitos T no decorrer da infecção por *C. neoformans* e *C. gattii* em pacientes portadores de HIV relaciona diretamente com o número de células T CD4+. Por outro lado, fatores genéticos do hospedeiro como polimorfismos no gene de FcγR (FCGR3A 158V) são relacionados a pior evolução tanto em indivíduos HIV+ quanto aparentemente imunocompetentes. Estudos recentes vêm enfatizando a necessidade de um melhor diagnóstico diferencial em pacientes que não apresentam nenhuma comorbidade ou estado de imunossupressão conhecida que a princípio possam justificar essa infecção (60)(61).

Pesquisas clínicas e experimentais disponíveis nos permitem importante ampliação do conhecimento relativo à doença pelo *Cryptococcus spp.* Observa-se aumento da incidência de criptococose disseminada em indivíduos considerados imunocompetentes (sem imunodeficiência conhecida). No entanto a relação neurocriptococose x imunocompetência é um assunto que ainda não foi esclarecido por completo principalmente na atualidade, onde indivíduos considerados imunocompetentes (sem causa conhecida de imunodeficiência) e que apresentam criptococose disseminada têm sido observados com alguma frequência (61). Diante do exposto acima torna se relevante ampliar o

conhecimento da ocorrência dessa doença nesse grupo de indivíduos que aparentemente não apresentam nenhuma comorbidade subjacente conhecida.

A análise das subpopulações celulares dos linfócitos T CD4⁺ nesses pacientes durante a infecção torna-se importante para entendermos como a resposta imunológica está sendo dirigida ao fungo. Possivelmente alguns parâmetros da resposta imune celular estejam alterados em indivíduos imunocompetentes, predispondo-os a uma infecção oportunística pelo *Cryptococcus*, entretanto existem questões não respondidas em torno dos mecanismos de resposta no contexto da infecção que precisam ser compreendidos.

Propomos ainda avaliar a secreção de IFN gama através do ensaio de Elispot (*Enzyme Linked immuno spot*) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) após estímulos fúngicos com *C. gattii* e *C. neoformans* em amostras de sangue de indivíduos saudáveis que costumam desempenhar atividade ocupacional ou de lazer que os exponham com frequência ao nicho ecológico do fungo.

O ensaio ELISPOT permite a análise quantitativa de células secretoras das citocinas de interesse. Além disso, em situações clínicas onde o número de células é baixo (por exemplo, em pacientes linfopênicos) o número de células necessárias para avaliar a atividade das células T é inferior (cerca de dez vezes menor que o material celular utilizado em citometria de fluxo). A alta sensibilidade e especificidade do ensaio ELISPOT torna esse método confiável para o monitoramento clínico (62).

Alguns aspectos da neurocriptococose precisam ser elucidados, principalmente por ser uma doença relativamente rara em indivíduos imunocompetentes e tendo em vista o fato que o *Cryptococcus* spp. apresenta alta morbidade e mortalidade, com complicações neurológicas, nesse grupo de indivíduos.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar linfócitos T CD4⁺ e subpopulações celulares através da imunofenotipagem com emprego de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos em amostras de sangue de pacientes imunocompetentes, acometidos pela neurocriptococose.

Tendo em vista a escassez celular observada em ensaios preliminares no diagnóstico diferencial em pacientes “imunocompetentes” com neurocriptococose fez-se a opção de realizar o ensaio de ELISPOT em indivíduos controles saudáveis que desempenham atividades constantes com ou sem exposição ao fungo *C. neoformans* e *C. gattii*, concomitantemente com fungos similares como o *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* para avaliar a produção de IFN- γ .

2.1 Especificamente os objetivos foram:

- Analisar a secreção de IFN- γ das PBMCs do sangue periférico de indivíduos controles saudáveis após estímulos fúngicos de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*;
- Avaliar fenotipicamente o repertório das células T do sangue empregando anticorpos monoclonais, conjugados a fluorocromos: (CD127 BV421; TCR $\alpha\beta$ - FITC; TCR $\gamma\delta$ - PE; CD45RA - BV510; CD25 - APC; CD3 BV605; CD4 - PE - CY 7; CCR7 - PE-TR594; CD8 - APC-H7);
- Correlacionar o fenótipo das células responsivas (CD4⁺CD45RA CCR7), quanto ao estado de ativação e maturação em *naïve* (N), memória central (TMC), memória efetora (TME) e memória efetora altamente diferenciada (TEMRA);
- Análise das células (CD25⁺CD127^{high} – CD25⁺CD127^{low}) quanto ao estado de ativação e regulação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1 Casuística

3.1.1 Critérios de inclusão

Para a caracterização dos linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e subpopulações foram convidados a participar do estudo pacientes com neurocriptococose, HIV negativos, sem nenhuma outra doença ou infecção associada, hospitalizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP ou no Instituto de Infectologia do Emílio Ribas.

Para a realização do ensaio de ELISPOT foram convidados indivíduos que exerciam atividades ocupacionais ou de lazer com frequente exposição ao nicho ecológico do fungo: - sete indivíduos que praticam Ecoturismo; - dois Micologistas; - três Criadores e Tratadores de Aves; - dois Indivíduos sem exposição ocupacional e práticas de ecoturismo no nicho ecológico do fungo.

Os pacientes foram informados sobre direitos ao livre acesso às informações clínicas desse projeto em qualquer momento. O protocolo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética para Avaliação de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. (nº 1.483.420/2016), e do Instituto de Infectologia do Hospital do Emílio Ribas (nº 1.569.194/2016).

Todos os pacientes ou seus responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram avaliados três grupos de indivíduos:

- Um grupo de pacientes com neurocriptococose imunocompetentes;
- Um grupo controle saudável sem exposição ao fungo;
- Um grupo de indivíduos saudáveis com atividades frequentes de exposição ao fungo.

3.1.2 Critérios de exclusão

Constituíram critérios de exclusão menores que 18 anos e/ou maiores que 55 anos. Pacientes quanto à existência de qualquer outra comorbidade além da neurocriptococose. Tanto o grupo de pacientes como de controles foram ainda avaliados, quanto ao uso de medicações imunossupressoras, tratamento com quimioterapia e/ou gestação quando mulheres.

Este estudo foi realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) no Instituto de Medicina Tropical (IMT), no Laboratório de Investigação Médica - LIM 56 tendo como colaboradores: Laboratório de Micologia Médica – LIM/53; -Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) e Hospital das Clínicas de São Paulo (HC). O material (sangue periférico) foi coletado durante o período de internação dos pacientes, antes do início do tratamento ou logo após seu início, quando não houve tempo de modificação da resposta imunológica do paciente.

3.2 Cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*

Foram utilizadas cepas de referência ATCC (American Tissue Cell Culture) de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* nos procedimentos desenvolvidos durante o projeto. As cepas foram gentilmente doadas pela Dra. Márcia S. C. Melhem do Instituto Adolfo Lutz e pelo Prof. Dr. Meyer Wieland do Westmead Institute Medical School. Todos os estudos referentes às cepas encontram-se depositados no *Microbiology Collections* – ATCC conforme (Tabela 1).

Tabela 1 - Cepas controle ATCC de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

<i>C. neoformans</i>	ATCC	Sorotipo	<i>C. gattii</i>	ATCC	Sorotipo
VN I	148	A	VG I	179	B
VN II	626	A	VG II	178	B
VN III	628	AD	VG III	161	B
VN IV	629	D	VG IV	779	C

FONTE: *Microbiology Collections*

3.2.1 Recaracterização das Cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*

As cepas de *Cryptococcus* spp. foram obtidas da coleção de cultivos da Micoteca do Instituto Adolfo Lutz. Para assegurar a especificidade das cepas e garantir que em nenhum momento houve exposição a agentes contaminantes, além de assegurar o bom desenvolvimento do estudo consideramos ser apropriado fazer a recaracterização das cepas para evitar possíveis contratempos no decorrer do projeto. Todas as etapas referentes à produção do antígeno foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica LIM-53, do Instituto de Medicina Tropical IMT - USP.

3.2.2 Provas Bioquímicas

3.2.3 Ágar Niger

A produção de melanina é uma característica utilizada na identificação do gênero *Cryptococcus*, devido a sua capacidade de produção deste pigmento. Diante disto as cepas foram semeadas em Ágar Níger e incubadas a 30°C, durante 7 dias. O Ágar Niger possui substratos fenólicos ou difenólicos, no qual a enzima fenoloxidase ou lacase presente na levedura atua sobre esses substratos, gerando quinonas como produtos, que sofrem um processo de autopolimerização, produzindo melanina. Os fungos do gênero *Cryptococcus* expressam a melanina na parede celular, gerando um pigmento entre acastanhado a ocre, dependendo das espécies (15)(8).

3.2.4 Teste da urease

A prova de urease é uma ferramenta bioquímica utilizada para identificação do gênero *Cryptococcus* devido sua capacidade de hidrolisar a ureia do meio. Esta alteração ocorre devido à urease ser uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da ureia em amônia e carbonato, provocando aumento do pH alcalinizando e alterando a coloração do meio para um tom róseo intenso (63).

As cepas foram semeadas na superfície do meio ureia, e incubadas a 30°C por sete dias.

3.2.5 Quimiotipagem Ágar CGB (Meio Canavanina-glicina-azul de bromotimol)

O cultivo no meio com canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) é um teste utilizado na diferenciação das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*. Isolados de *C. neoformans* não se desenvolvem neste meio; por serem sensíveis a L-canavanina não consegue utilizar a glicina como fonte de carbono, além disso, não alteram o pH preservando a pigmentação original do meio. Isolados de *C. gattii* são resistentes a canavaninas e conseguem crescer nesse meio. Utilizam a glicina como fonte de carbono e nitrogênio e seu crescimento é evidenciado pela alteração da coloração do meio que passa de amarelo para azul-cobalto como resultado da liberação da amônia, durante a degradação da glicina (8)(15).

3.3 Redução de cápsula de *C. neoformans* e *C. gattii*

As cepas dos oito genótipos de *Cryptococcus* (VNI –VNIV e VGI – VGIV) foram semeadas em Ágar Sabouraud (SAB), acrescido com 2,9% de cloreto de sódio NaCl e incubadas por um período de 72 horas, em estufa a 30°C (64). Três repiques sucessivos foram necessários para a obtenção de colônias acapsulares (15). A confirmação da redução capsular foi realizada por leitura em lâminas corada com tinta da China em microscópio óptico.

3.3.1 Exoantígenos de *C. neoformans* e *C. gattii*

O preparo dos antígenos de cada genótipo de *Cryptococcus* foi realizado segundo Freitas et al., (2005) com algumas modificações para leveduras. Após a redução capsular, cada um dos oito genótipos de *C. neoformans* e *C. gattii* foram semeados em placas de Petri de (90x15) contendo Ágar Sabouraud

dextrose 4% sem adição de 2,9% NaCl (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), e incubadas a 30°C por um período de 72 horas (65)(66)(67)(68). Em seguida, foi adicionado solução de timerosal borato na diluição de 1:5000 em todos os cultivos (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, US) e mantidos em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período o sobrenadante de cada cultura foi coletado com pipeta Pasteur estéril e centrifugado 2 vezes a 4.200 G por 30 minutos. O pH foi ajustado para pH-7,2 e pH-7,4 em (PH meter model PHTEK, PHS – 3H). A dosagem de proteínas de cada preparação antigênica foi realizada em Nanodrop (Uniscience ND 1000 Spectrophotometer). Todos os antígenos foram estocados e preservados a 4°C, até sua utilização (67)(68)(69).

3.3.2 Exoantígenos de *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*

Os antígenos dos fungos *Histoplasma capsulatum* cepa (26029) e *Paracoccidioides brasiliensis* cepa (Pb 339) foram produzidos de acordo com a metodologia dos exoantígenos dos *C. neoformans* e *C. gattii*. Ambos foram obtidos da Coleção do Laboratório de Micologia (LIM 53) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brasil.

Para avaliação do estímulo dos antígenos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* frente a um ensaio de ativação celular com outros antígenos foram selecionadas cepas com base na similaridade clínica, a saber: *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Ambos foram avaliados simultaneamente com amostras de *C. neoformans* e *C. gattii* em ensaios de ELISPOT em amostras de indivíduos controles saudáveis com e sem atividades frequentes de exposições aos fungos.

3.4 Inativação e Esterilidade dos Antígenos

Todos os lotes antigênicos obtidos foram inoculados nos meios de (SAB), com e sem adição de cloranfenicol e incubados paralelamente, a 25°C e 30°C. A confirmação da inativação (ausência de crescimento), e esterilidade (ausência

de outros agentes biológicos), dessas preparações antigênicas ocorreu durante observações semanais, por um período de 30 dias.

3.5 SDS-PAGE dos antígenos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*

Os procedimentos para eletroforese vertical em gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) foi conduzido segundo metodologia proposta por Laemmli (1970) com gel de separação linear a 10% e gel de empilhamento a 3% de acrilamida com espessura de 1,0 mm empregando equipamento (Mini Protean II Electrophoresis Cell) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA)(70).

As diferentes preparações antigênicas foram desnaturadas por aquecimento a 100 °C por 5 minutos em tampão de ruptura (62 mM de Tris HCl pH 6,8) contendo 0,2% (p/v) de SDS, 50 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), 0,005% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) e 10% (v/v), de glicerol em água deionizada (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), sendo aplicados 30 µL de antígeno em cada orifício para visualização do padrão proteico de migração. Para a transferência (*Western Blotting*) foi utilizado 250 µL de antígeno em cada mini gel, separadas por pente preparativo.

A corrida eletroforética foi realizada com diferença de potencial de 100 V para percorrer o gel de empilhamento e 120 V para percorrer o gel de separação, empregando-se fonte de energia (Hoefer Power Supply, modelo SX 250, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., São Francisco, Califórnia, USA).

Para cada corrida eletroforética foi utilizado padrão de baixo peso molecular (PM), composto de: β-galactosidase (118.579 kDa), BSA (78.996 kDa), ovalbumin (53.045 kDa), carbonic anhydrase (36.881 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.643 kDa) e lysozyme (17.809 kDa) – Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA.

Ao término da corrida eletroforética, para visualização das bandas proteicas o gel foi corado pela prata (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, USA).

3.6 Separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram obtidas através da coleta de 40 mL de sangue heparinizado e diluídas em solução salina 0,9% estéril na proporção de 1:1. O sangue diluído em salina foi transferido para tubos de polipropileno tipo Falcon de 50 mL contendo solução de gradiente de concentração Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB) na proporção de 1:3 e centrifugados a 900 G por 20 minutos a 18°C. A camada celular formada na interface foi coletada com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril. As células obtidas foram centrifugadas uma vez com meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 10 min a 250 G (GIBCO). Após a contagem, as PBMCs foram lavadas novamente em 1 mL de RPMI-1640 com (SFB) e ressuspensas delicadamente em 1 mL da solução de congelamento (SFB com 10% de DMSO). Em seguida foram armazenadas no freezer -80°C até a utilização tanto para os ensaios de ELISPOT como para citometria. Para avaliação da viabilidade as células foram testadas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer.

3.6.1 Descongelamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

As PBMCs foram descongeladas em banho maria a 37°C e centrifugadas uma vez com 10 mL de RPMI-1640 com 10% de (SFB) a 250 G por 10 min. Em seguida foram ressuspensas em 1 mL de RPMI-1640 para a contagem e transferidas para a estufa a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultura com RPMI-1640 com 10% de (SFB) na condição de 1 mL do meio para cada 1x10⁶ células. Após o período de 24 horas as células foram centrifugadas uma vez por 10 min a 250 G e ressuspensas em 1 mL de RPMI-1640 com 10% de (SFB). As concentrações celulares e os estímulos fúngicos foram ajustados em acordo com as condições para a realização do ensaio ELISPOT. As células foram contadas

em câmara de Neubauer e a viabilidade celular observada com o corante azul de Tripán.

3.6.2 Ensaio de avaliação da produção de IFN- γ pelo método *Enzyme Linked Immunospot* (ELISPOT)

Foi empregado o Kit da empresa (BD™ ELISPOT Set Biosciences – 551849) para detecção da secreção de IFN- γ , em placas de 96 poços, seguindo todas as recomendações de uso de acordo com o fabricante. Para todos os ensaios foram utilizados 100 μ L de células (2×10^5 células) e 100 μ L de antígenos na concentração de 0,32 mg/mL. Como controles positivos dos experimentos foram utilizados 100 μ L de fitohemaglutinina (PHA) na concentração de 2,5 μ g/mL e forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) na concentração de 30 ng/mL com ionomicina a 20 ng/mL. O basal foi constituído apenas de 100 μ L de células com 100 μ L de RPMI-1640 com 10% (SFB). Para todas as condições o volume final em cada poço na placa foi de 200 μ L.

O anticorpo de captura anti-IFN- γ foi diluído em tampão de revestimento (PBS - pH 7,2) e utilizado na concentração final de 5 μ g/mL. A seguir foi adicionado à placa 100 μ L/poço desta solução e armazenado em geladeira a 4°C por 24 horas. Após esse período a placa foi lavada uma vez com 200 μ L da solução de bloqueio, RPMI-1640 com 10% de (SFB) e incubada por uma hora em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Logo após o descarte da solução de bloqueio foi adicionado 100 μ L/poço de antígenos na concentração de 0,32 mg/mL (ou fitohemaglutinina (PHA) na concentração de 2,5 μ g/mL e forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) na concentração de 30 ng/mL com ionomicina a 20 ng/mL) a 100 μ L de células (2×10^5 células). A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Depois desse período todas as etapas de lavagens foram realizadas e na sequência adicionados 100 μ L do anticorpo de detecção (anti-IFN- γ biotinilado) a 2 μ g/mL permanecendo incubado por duas horas em temperatura ambiente. Na sequência foi adicionado 100 μ L da enzima conjugada (Estreptavidina-HRP) na diluição de 1:100 e incubada durante uma hora em temperatura ambiente. Efetuadas todas as etapas de lavagens foi preparado o tampão do AEC (3-

amino-9-carbazol) em água MilliQ na diluição de 1:10. Esse tampão foi utilizado para a diluição do cromógeno na proporção de 1:70. Para a revelação dos pontos foram adicionados 100 µL/poço da solução do substrato do AEC (3-amino-9-carbazol). A avaliação da frequência de células secretoras de citocinas (SFC) foi monitorado por 45 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A paralisação da reação do substrato foi interrompida lavando os poços uma vez com 200 µL de água deionizada (DI). A secagem da placa foi obtida em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A leitura da placa para análise da (SFC) foi realizada em leitor de ELISPOT automatizado (AID spot ELR07IFL) com auxílio do Software AID Elispot 7.0. Para a análise estatística foi utilizado o Software (GraphPad Prism 5.0, Inc).

3.6.3 Imunofenotipagem dos linfócitos T e subpopulações CD4⁺

As células armazenadas no congelador -80°C foram descongeladas e antes da imunofenotipagem permaneceram em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por um período de 24 horas em meio de cultura com RPMI-1640 com 10% de (SFB). Após esse período foram centrifugadas uma vez com 10 mL de RPMI-1640 por 10 min a 250 G. Em seguida foram ressuspensas em 1 mL de PBS e incubadas com os anticorpos monoclonais por 25 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz (Quadro 2). Após isso, as células foram lavadas uma vez com 1 mL de isoton por cinco minutos em 250 G e ressuspensas com 300µL de isoton. A aquisição foi de 1x10⁶ células em citômetro de fluxo Fortessa (BD LSR-Fortessa™).

Quadro 2- Pannel de anticorpos para marcação dos linfócitos T CD3+CD4+

Monoclonais	Fluorocromo	Clones	Empresa
TCR AB	FITC	T1089	BD Biosciences
TCR GD	PE	B1	BD Biosciences
CD4	PeCy 7	RPA-T4	BD Biosciences
CD25	APC	M-A 251	BD Biosciences
CD3	BV605	SK7	BD Biosciences
CCR7	PE-TR 594	150503	BD Biosciences
CD45RA	BV510	HI100	BD Biosciences
CD127	BV421	HIL-7R M4	BD Biosciences
CD8	APC-H7	SK7	BD Biosciences

3.6.4 Ajuste dos parâmetros no citômetro

A aquisição das amostras de pacientes e controles foi feita através de citometria multiparamétrica em um citômetro de fluxo (BD LSR-Fortessa™). A aquisição foi ajustada para 100.000 eventos na janela dos linfócitos. Para avaliar adequadamente a compensação e determinar a população positiva por citometria de fluxo foi realizado o controle *Fluorescence Minus One* (FMO). A análise dos dados obtidos no citômetro foi determinada pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A). Os resultados foram analisados no *Software FlowJo*™ (versão 10).

3.6.5 Análise Estatística

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram feitas pelo *Software GraphPad Prism* (versão 5.0). Todos os dados referentes à imunofenotipagem dos linfócitos T CD4⁺ foram testados para avaliar o perfil de normalidade através do teste de D'Agostino & Pearson. Para aqueles que apresentaram distribuição normal entre os grupos, foi aplicado o *T test*. Para aqueles que não apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Para

os dados referentes ao ELISPOT foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Todos os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Recaracterização e redução da cápsula das cepas (ATCC) de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Antes de iniciar a obtenção dos lotes antigênicos, foi realizada a recaracterização das ATCC através de provas bioquímicas e quimiotipagem como critério de exclusão de terem sido expostas, em algum momento, a agentes contaminantes tanto no processo de manutenção, como no transporte já que as mesmas foram obtidas de uma coleção de frequente cultivos.

As cepas foram primeiramente plaqueadas em Ágar Sabouraud e posteriormente uma colônia pura foi reisolada por esgotamento em Ágar Niger. Os resultados obtidos demonstraram que 100% dos criptococos expressaram melanina na parede celular alterando a cor do meio de amarelo inicial a marrom acastanhado, hidrolisaram a ureia alterando a cor do meio de amarelo inicial a rosa. No teste de canavanina glicina azul de bromotimol (CGB) foi confirmada a diferenciação das espécies que fornece uma mudança positiva da cor de amarelo esverdeado para azul de cobalto, respectivamente *C. neoformans* e *C. gattii* (Figura 4).

Figura 4 - Recaracterização das cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Meios de cultura - (A) Agar Sabouraud, colônias brancas a creme de aspecto liso a mucoide; - (B) Ágar Níger verificação de melanina, colônias marrons; - (C) Teste da ureia confirmado pela alcalinização do meio e mudança de cor, meio rosa; -(D) Teste da CGB diferenciação das espécies, *C. neoformans* amarelo esverdeado e *C. gattii* azul cobalto. Fonte: Maciel (2021).

A redução parcial e não total da cápsula foi obtida em meio Sabouraud contendo 2,9% de NaCl (64). Após 72 horas foi observada acentuada redução dos polissacarídeos para os isolados de *C. gattii* quando comparados com *C. neoformans*. A redução da cápsula necessária foi obtida após três repiques consecutivos. A análise por microscopia óptica em lâminas coradas com tinta da China demonstra o primeiro e último repique (Figura 5).

Figura 5- Redução da cápsula de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Meio Sabouraud contendo 2,9% de NaCl. Leveduras: *C. neoformans* (VNI – VNIV) (A) antes da redução capsular (B) após redução capsular. *C. gattii* (VGI – VGIV) (C) antes da redução capsular (D) após redução capsular. FONTE: Maciel (2021).

4.2 Produção dos antígenos

Foram obtidos após redução capsular 80 lotes antigênicos a partir dos oito genótipos de *Cryptococcus*: (VNI-VNIV) e (VGI -VGIV) em caldo YPD acrescido com 40% de glicose e 2,9% de NaCl como pode ser visto na (Figura 6). Inicialmente foram produzidos lotes de antígenos inativados pelo calor (“tindalização”), inativados com inibidor de proteases e inativados com timerosal. Foram produzidos antígenos: Filtrados de cultura, antígeno livre de células (CFA) e Somático (71)(72). No processo de “tindalização” houve degradação dos antígenos Somáticos com baixas dosagens proteicas para a variedade *C. neoformans* (VNI- 0.575 - VNIV- 0.707mg/mL) e para a variedade *C. gattii* (VGI- 0.838-VGIV -1,379 mg/mL). Posteriormente foram produzidos antígenos CFA e Somático com inibidor de proteases (71)(72). Apesar de excelentes dosagens proteicas dos antígenos CFA e Somático com o inibidor de proteases, durante o processo de padronização do ensaio ELISPOT para *C. neoformans* e *C. gattii* observamos rápida degradação proteica inviabilizando os resultados esperados (dados não mostrados).

Os exoantígenos foram obtidos pós redução capsular em meio Sabouraud-dextrose 4% sem a adição de 2,9% de NaCl. Durante o período de 72 horas dos cultivos das leveduras não observamos aumento significativo da cápsula polissacarídica nesse meio de cultura (dados não mostrados).

As leituras Iniciais realizadas 20/10/2016 e finais 20/10/2019 mostraram diferenças estatísticas significativas da degradação proteica * $p=0.0155$. Consideramos degradação significativa quando atingiu valor maior que 15%.

Os lotes dos exoantígenos com melhor preservação da concentração proteica ao longo de 34 meses foram (VNI e VNIV) como pode ser visto na (Tabela 2).

Figura 6 - Organograma da produção dos antígenos *C. neoformans* e *C. gattii*

Antígenos: (A) Redução da cápsula; (B) Antígeno *Cell Free* (CFA); (C) Antígeno Somático; (D) Antígeno Metabólico; (E) Antígeno Inativado pelo Calor; (F) Antígeno Seleccionado Exoantígenos; (G) Dosagem de Proteína; (H) Ensaio Elispot. Timerosal (Etil (2-mercaptobenzoato - (2-) - O, S) mercurato (1-) de sódio) Inibidor de protease, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). Fonte: Maciel (2021).

Tabela 2- Dosagem Proteica dos Exoantígenos criptocócicos

Exoantígenos	mg/mL Leitura Inicial 20/10/16	mg/mL Leitura Final 20/08/19	Variação percentual (degradação)
NI	9,22	9,18	0,31%
NII	8,42	6,47	18,52%
NIII	8,95	7,76	10,07%
NIV	7,91	7,38	4,90%
GI	8,56	7,54	8,96%
GII	8,58	6,80	16,37%
GIII	7,01	5,71	14,47%
GIV	8,47	5,26	33,06%
Percentis 25% - 75% Medianas	8, 038 - 8, 858 8, 515	5, 900 - 7, 705 7, 090	

4.3 Gel SDS-PAGE

O SDS-PAGE (10%), dos antígenos *in natura*, revelou que o gel de *C. neoformans* (VNI– VNIV) foi fragmentado em três regiões, enquanto o gel de *C. gattii* (VGI – VGIV) foi fragmentado em duas regiões. A coloração pela prata, em concordância com os padrões de peso molecular resultou para o gel de *C. neoformans* a região um com duas bandas aparente 120 – 95 kDa, região dois com banda aparente de 35 kDa e região três com duas bandas aparentes de 27 – 28 kDa. O gel de *C. gattii* mostrou somente duas faixas, sendo a primeira com região e banda aparente de 35 kDa e a segunda com duas bandas de 25 – 28 kDa (Figura 7).

Gel realizado a partir de antígenos *in natura*. *C. neoformans* (VN I– VNIV) apresenta três regiões fragmentadas e *C. gattii* (VGI – VGIV) duas regiões fragmentadas. FONTE: Maciel (2020).

4.4 Características do grupo de pacientes e controles incluídos no estudo Elispot

Para a realização do ensaio de Elispot foram selecionadas células de 14 indivíduos saudáveis sendo: cinco Ecoturistas (Indivíduos que se expõem com frequência ao nicho ecoepidemiológico do fungo como em regiões de mata e cavernas); dois Micologistas (Profissionais no exercício da profissão em

laboratórios de micologia); três Tratadores de Aves (Indivíduos tratadores de aves em cativeiro domiciliar e criadores de galinhas) e finalmente quatro Sem exposição ocupacional ao fungo. (Ecoturistas, micologistas e tratadores de aves) conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Casuística da população saudável com exposição ou não a agentes fúngicos

Parâmetros	Ecoturistas (%)	Micologistas (%)	Tratadores de aves (%)	Sem exposição ocupacional ao fungo (%)
Nº Total	5 (36,0)	2 (14,3)	3 (21,4)	4 (28,5)
Sexo				
Feminino	3 (21,4)	2 (14,3)	1 (7,14)	4 (28,5)
Masculino	2 (14,2)	----	2 (14,2)	----
Idade (anos)				
Mediana	31	55	53	27
Média	41	55	57	27
Faixa (mínimo – máximo)	22 – 60	53 – 57	52 – 66	23 – 29

Valores expressos em média e mediana.

4.4.1 Avaliação da frequência de células secretoras de citocinas (SFC)

Os ensaios de Elispot para secreção de IFN- γ com os estímulos de *C. neoformans* e *C. gattii* demonstrou que perfis de Indivíduos com frequentes exposições a esses agentes, tanto os ecoturistas como os micologistas apresentam maior frequência de (SFC) em relação aos perfis de indivíduos com manejo de aves domésticas, conforme (Figura 8, 9 e 10). Nossos resultados também demonstram diminuição significativa de (SFC) em indivíduos sem exposições ocupacionais ao fungo, conforme (Figura 11).

Figura 8- Ecoturistas

Ecoturistas (SFC). *Cryptococcus neoformans* (N); *Cryptococcus gattii* (G).

Figura 9- Micologistas

Micologistas (SFC). *Cryptococcus neoformans* (N); *Cryptococcus gattii* (G).

Figura 10-Trato com Aves

Tratadores de Aves (SFC). *Cryptococcus neoformans* (N); *Cryptococcus gattii* (G).

Figura 11- Sem exposição ocupacional ao fungo

Sem exposição ocupacional ao fungo (SFC). *Cryptococcus neoformans* (N); *Cryptococcus gattii* (G).

O Gráfico demonstra os resultados secreção de IFN- γ dos 14 controles do estudo e os valores das medianas entre o basal e os estímulos antigênicos das variedades de *Cryptococcus*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides* e dos mitógenos utilizados como controles positivos, PMA e PHA. Nossos resultados mostram não haver diferenças significativas entre o basal e PMA. Entretanto observamos diferenças estatisticamente significantes entre o basal e a PHA (* $p < 0.05$) como pode ser visto nas (Figuras 12 e tabela 4).

O basal dos indivíduos frente aos antígenos avaliados apresentou resultados com diferenças estatísticas (** $p < 0.05$) tanto para *C. neoformans* (VNI, VNIII e VNIV), *C. gattii* (VGI, VGII e VGIII) assim como, para *Histoplasma* e *Paracoccidioides*. Já para os antígenos (VNII) e (VGIV) mostram diferença estatística (** $p < 0.05$) em relação ao basal.

Figura 12- Secreção de IFN- γ , do grupo de estudo

Controles (n=14). Secreção de IFN- γ , do grupo de estudo. Valores expressos por medianas e interquartis. Diferença estatística significativa entre o Basal e PHA * $p < 0,05$. Basal e antígenos *C. neoformans* (VNII) e *C. gattii* (VGIV) ** $p < 0,05$. Basal e antígenos *C. neoformans* variedades (VNI, VNIII e VNIV); *C. gattii* variedades (VGI, VGII e VGIII); *Histoplasma* e *Paracoccidioides* *** $p < 0,05$.

Quadro 3- Correlação cores e idades dos controles do gráfico

Ecoturistas (22-29-33-59-60)	Verde-escuro	Cinza	Vermelho	Branco	Azul-claro
Micologistas (53-57)	Ocre	Amarelo			
Tratadores de Aves (52-53-66)	Laranja	Preto	Azul-escuro		
Sem exposição ao Fungo (23-25-29-29)	Rosa	Marrom-escuro	Magenta	Verde-claro	

Controles e Idades (n=14), respectivamente. Ecoturistas (cinco) (verde-escuro, cinza, vermelho, branco e azul-claro) – Micologistas (dois) (ocre e amarelo) - Tratadores de Aves (três) (laranja, preto, e azul-escuro) - Indivíduos sem atividades de contato com os fungos (quatro) (rosa, marrom-escuro, magenta e verde-claro).

Tabela 4- Dados da secreção de IFN- γ do grupo de estudo

	Basal	PMA	PHA	NI	NII	NIII	NIV	GI	GII	GIII	GIV	Hist	PB
25%	21,60	67,50	137,5	198,3	122,9	200,7	172,5	196,9	172,9	213,0	104,2	227,6	210,9
Mediana	34,10	85,07	213,8	400,9	324,2	364,2	362,5	491,7	368,4	424,2	252,5	495,0	281,7
75%	54,13	130,0	420,1	650,0	780,5	686,3	637,1	942,2	1112	1181	837,2	715,9	1044
Média	37,94	106,1	313,6	569,9	458,5	488,8	475,6	612,7	611,9	649,0	485,8	669,4	576,7

Controles (n=14) Secreção de IFN- γ , valores expressos em média, medianas e interquartis entre os grupos. Sem diferença estatística significativa entre Basal e PMA. Diferença estatística significante entre basal e PHA (*p<0,05). Basal e antígenos *C. neoformans* (VNI, VNIII e VNIV); *C. gattii* (VGI, VGII e VGIII); *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (**p<0,05). Basal e antígenos (VNII) e (VGIV) (**p<0,05).

Em relação aos grupos de indivíduos, podemos observar clara diferença entre os grupos de indivíduos não expostos em relação aos micologistas e ecoturistas, mas não em relação aos tratadores de aves (figura 13 A, B, C e D). ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni (abaixo).

Múltiplas comparações de Bonferroni	Média $\neq$	t	Signif		95% CI da $\neq$
Não expostos vs Tratadores de aves	-129,4	1,224	Não	ns	-420.4 to 161.6
Não expostos vs Micologistas	-780,6	7,381	Sim	***	-1072 to -489.6
Não expostos vs Ecoturistas	-479,7	4,536	Sim	***	-770.7 to -188.6
Tratadores de aves vs Micologistas	-651,2	6,158	Sim	***	-942.2 to -360.2
Tratadores de aves vs Ecoturistas	-350,3	3,312	Sim	*	-641.3 to -59.21
Micologistas vs Ecoturistas	301,0	2,846	Sim	*	9.914 to 592.0

Figura 13- Secreção de IFN- γ , em relação à atividade e contato com os fungos

Secreção de IFN- γ avaliada por ELISPOT, apresentados em SFC/10⁶ células (*spot forming cells*/10⁶ células). A) Controles não expostos aos fungos; B) Tratadores de aves; C) Micologistas; D) Ecoturistas com atividades que expõem aos fungos em seu nicho ecológico. Podemos ver que os indivíduos dos grupos micologistas e ecoturistas apresentam número significativamente maior de células produtoras de IFN- γ em contato com os antígenos dos fungos testados.

4.4.2 Características do grupo de pacientes e controles incluídos no estudo para imunofenotipagem dos linfócitos T CD3⁺CD4⁺ no sangue periférico

O estudo foi conduzido com uma amostragem de oito pacientes com neurocriptococose “imunocompetentes” e sem histórico de outras infecções associadas ou conhecidas. E como grupo controle do estudo oito indivíduos saudáveis sem nenhum histórico de doença subjacente. Nosso estudo incluiu seis pacientes (75%) do sexo masculino com idades entre (28 – 52) e dois do sexo feminino (25%) com idades entre (34 – 38) anos (Tabela 5). Estes pacientes até a data da coleta de sangue encontravam se hospitalizados no Hospital das

Clínicas e Instituto de Infectologia Emílio Ribas. As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas entre o 15° e 30° dia de internação. Em paralelo foram coletadas as amostras do grupo controle. As PBMCs foram preservadas em temperatura de -80C° até sua utilização.

Tabela 5- Casuística dos pacientes e controles selecionados para o estudo

Parâmetros	Pacientes (%)	Controles(%)
N° Total	8 (100)	8 (100)
Sexo		
Feminino	2 (25)	2 (25)
Masculino	6 (75)	6 (75)
Idade (anos)		
Mediana	39.5	29
Media	39.6	32,7
Range	28 – 52	23 – 60

4.4.3 Estratégia de análise da imunofenotipagem dos linfócitos T CD3+CD4+ no sangue periférico

A caracterização fenotípica da população total dos linfócitos T e das subpopulações das células T CD4⁺ foi realizada por meio de suas características quanto ao tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) a partir da seleção dos (a) *single cells*; (b) linfócitos; (c) células TCD3⁺ e (d) células T CD3⁺CD4⁺ em seguida, dentro do compartimento CD3⁺CD4⁺ foram definidas as subpopulações em: – *naïve* CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺ (N); – memória efetora CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻ (TME); – memória central CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺ (TMC) e – memória efetora terminalmente diferenciada CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻(TEMRA). As demais subpopulações de células foram definidas quanto ao seu estado de ativação: efetora CD25⁺CD127^{high} e regulatória CD25⁺CD127^{low} (Figura 14). A imunofenotipagem foi realizada em citômetro de fluxo (BD LSR-Fortessa™) com anticorpos monoclonais para antígenos de superfície em 1x10⁶ PBMCs e analisadas pelo programa FlowJo.

Figura 14-Gates de Citometria

Estratégia de *Gates*. (A) *Singlets* (FSC-A) versus (FSC-H); (B) População total de linfócitos Ta partir dos parâmetros de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC); (C) População de linfócitos T(positivas para o CD3); (D) População de linfócitos T auxiliaadoras, que expressam CD3⁺ e CD4⁺; (E) Histograma para o marcador CD3; (F) Histograma para o marcador CD4.

4.4.4 Caracterização fenotípica dos linfócitos totais e subpopulações CD3⁺CD4⁺

O estudo da população total dos linfócitos T em amostras de sangue nos grupos de estudo mostrou diferenças estatísticas ($P=0,007$) apresentando média $15,88 \pm 5,748$ no grupo de pacientes e média $24,26 \pm 5,046$ no grupo controle (Figura 15). Os linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e a população CD4⁺TCR- $\alpha\beta$ não apresentaram diferenças estatísticas. A média da população T CD3⁺CD4⁺ no grupo de pacientes foi de $45,99 \pm 23,11$ e no grupo controle $54,43 \pm 12,50$. A população de células CD4⁺TCR- $\alpha\beta$ mostrou média de $93,50 \pm 2,419$ e $93,20 \pm 2,169$ entre pacientes e controles, respectivamente (Figuras 16, 17).

Nossos resultados mostram ainda que as subpopulações dentro do compartimento T CD3⁺CD4⁺ mostraram aumento da população de células CD4⁺TCR- $\gamma\delta$ para os pacientes com diferenças estatísticas significativas ($P<0,001$) (Figura 18).

As células T regulatórias CD25⁺CD127^{low} apresentaram diferenças estatísticas significativas ($P=0,013$) enquanto as células T efetoras CD25⁺CD127^{high} mostraram diferença estatística significativa ($P=0,001$), como pode ser visto nas (Figuras 19 e 20), respectivamente. Embora não tenhamos realizado a marcação do Foxp3, podemos afirmar que as células CD25⁺CD127^{low} apresentam um fenótipo com perfil regulatório a partir da expressão e marcação do CD127 (56).

O fator nuclear FoxP3 é uma proteína importante envolvida na regulação negativa para a expressão da molécula CD127 (56). Os resultados dos estudos de Liu et al.(2006) mostraram que FoxP3 está presente em 86,6% das células clássicas (CD25⁺CD127^{low/-}), em 22,9% das células (CD25⁺CD127⁺) e apenas 1,8% no fenótipo (CD127⁺ CD25⁻) (56).

Os resultados quanto ao estado de memória dos linfócitos T CD4⁺ mostram diferenças estatísticas significativas entre as subpopulações para os fenótipos naive ($P=0,001$) e TMC ($P<0,001$) no grupo de pacientes (Figura 21 e 22), respectivamente. O fenótipo TEMRA mostrou diferença estatística ($P=0,005$) com média $22,25 \pm 11,43$ para os pacientes e controles média $7,979 \pm 4,607$. O

fenótipo TME difere estatisticamente ($P < 0,001$) com média no grupo de pacientes $57,44 \pm 19,05$ e controles $27,30 \pm 6,825$ como pode ser visto nas (Figuras 23 e 24), respectivamente. As análises foram realizadas a partir da expressão do marcador CD45RA e CCR7 (73) (74) (75) (76).

Figura 155- Análise dos linfócitos T totais

Os valores de linfócitos totais no gráfico são apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Pacientes $15,88 \pm 5,748$ e controles $24,26 \pm 5,046$. $P < 0,01$.

Figura 166 - Análise das células T CD4⁺

Os valores dos linfócitos T CD3⁺CD4⁺ no gráfico são apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Pacientes $45,99 \pm 23,11$ e controles $54,43 \pm 12,50$.

Figura 17 - Análise das células T CD4⁺αβ

Os valores de linfócitos T CD4⁺TCRαβ no gráfico são apresentados em média ± desvio padrão. Pacientes 93,50 ± 2,419 e controles 93,20 ± 2,169.

Figura 18 - Análise das células T CD4⁺TCRγδ

Os valores de linfócitos T CD4⁺TCRγδ são mostrados em mediana e interquartis: Pacientes (mediana – 0,1250) e percentis (0,1125 – 0,1825). Controles (mediana – 0,0680) e percentis (0,04975 – 0,0900). P<0,001.

Figura 19 - Análise das células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low}

Os valores de linfócitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (Treg) são mostrados em mediana e interquartis: Pacientes (mediana –1,515) e percentis (1,400 –1,853). Controles (mediana –1,085) e percentis (0,9650 –1,275). $P < 0,05$.

Figura 20 - Análise das células T CD4⁺CD25⁺CD127⁺

Os valores de linfócitos T CD4⁺CD25⁺CD127⁺ são mostrados em mediana e interquartis: Pacientes (mediana – 0,2800) e percentis (0,2400 – 0,5900). Controles (mediana –0,0720) e percentis (0,0270 –0,1208). $P < 0,01$.

Figura 21- Análise das células T CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺ (N- Naïve)

Os valores de linfócitos T CD4⁺ *naïve* são mostrados em mediana e interquartis: Pacientes (mediana – 4,660) e percentis (2,650 – 18,69). Controles (mediana – 38,45) e percentis (29,48 – 47,05). P<0,005.

.

Figura 202- Análise das células T CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺(TMC)

Os valores de linfócitos T CD4⁺ (TMC) são mostrados em mediana e interquartis: Pacientes (mediana=10,70) e percentis (7,248–12,00). Controles (mediana=25,50) e percentis (20,90–28,78). $P<0.001$.

Figura 21-Análise das células T CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻(TME)

Os valores de linfócitos T CD4⁺ (TME) no gráfico são apresentados em média ± desvio padrão. Pacientes 57,44 ± 19,05 e controles 27,30 ± 6,825. $P<0,001$.

Figura 224-Análise das células TCD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻(TEMRA)

Os valores de linfócitos T CD4⁺ TEMRA no gráfico são apresentados em média ± desvio. Pacientes 22,25 ± 11,43 e controles 7,979 ± 4,607. $P<0,01$.

4.4.5 Características Clínicas de pacientes com neurocriptococose “Imunocompetente”

A avaliação do perfil demográfico e hematológico foi realizado a partir da coleta de dados clínicos laboratoriais de 12 pacientes incluindo os oito pacientes que participaram do estudo da imunofenotipagem dos linfócitos T.

A idade desses pacientes situa-se na faixa de 28 – 52 anos de idade e nove (75%) são do sexo masculino, com mediana de 43 e média de 41,8 anos. Apenas três dos pacientes (25%) são do sexo feminino com faixas de idade entre 32 – 38 anos, mediana 34 e média de 34,7 anos.

O perfil hematológico revelou anemia em nove (75%) dos 12 pacientes; quando avaliados de acordo com o sexo observamos que sete no grupo masculino (77,8%) e dois (66,7%) no grupo feminino apresentaram essa alteração. Os pacientes um e onze apresentaram leucopenia seguida de neutropenia, enquanto o paciente dez apresentou leucocitose e neutrofilia. Eosinofilia e plaquetopenia foi observada apenas no paciente três. O paciente sete foi o único que apresentou eosinopenia. A linfopenia foi observada em (44,4%) dos homens apenas nos pacientes um, cinco, sete e nove (Quadro 4).

Quadro 4- Casuística e correlação clínica dos pacientes com neurocriptococose

PAC.	Idade Sexo	Hb	Leucócitos	Linfócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Monócitos	Basófilos	Plaquetas
1	44 - M	10,7	2,50	0,8	1,4	0,2	0,2	0,0	260
2	34 - F	8,7	5,90	1,5	3,7	0,1	0,5	0,1	174
3	38 - F	6,9	6,10	1,1	6,2	0,7	0,4	0,1	122
4	28 - M	10,6	9,30	2,1	6,0	0,5	0,6	0,2	444
5	49 - M	10,3	4,50	0,7	3,3	0,2	0,3	0,1	162
6	33 - M	12,8	7,46	2,62	3,50	0,44	0,86	0,04	396
7	40 - M	8,6	5,94	0,84	4,58	0,03	0,47	0,02	182
8	45 - M	9,3	8,31	1,68	6,15	0,08	0,24	0,08	226
9	52 - M	9,1	4,48	0,62	3,34	0,07	0,44	0,01	284
10	43 - M	14,1	17,42	2,44	13,72	0,34	0,84	0,08	359
11	43 - M	14,6	3,23	1,85	0,93	0,07	0,36	0,02	207
12	32 - F	12,2	8,31	2,69	5,02	0,09	0,48	0,03	262

Pacientes (PAC)-Masculino (M) - Feminino (F) - Valores de referência: hemoglobina (Hb): 13,0 até 18,0 g/dL - Anemia – hemoglobina para homens abaixo de 14 g/dL e mulheres abaixo de 12 g/dL - Leucócitos: 4,0 até 11,0 mil/mm³ - Linfócitos 0,9 até 3,4mil/mm³ -Neutrófilos: 1,6 mil/mm³ até 7,0 mil/mm³ - Eosinófilos: 0,05 até 0,5 mil/mm³ - Basófilos 0,0 até 0,2- Monócitos: 0,2 até 0,9 mil/mm³ - Plaquetas: 140 até 450 mil/mm³

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

5.1 Antígeno

Cryptococcus ao contrário de outros fungos patogênicos possui cápsula polissacarídica espessa que é essencial à sua sobrevivência. Os polissacarídeos podem interferir com a fisiologia das células hospedeiras inibindo a proliferação de células T e a maturação de células apresentadoras de antígenos (15) (77). De acordo com a literatura a cápsula é imunomoduladora e bem pouco imunogênica (15)(66)(78). Apesar dos polissacarídeos protegerem o fungo, uma cápsula grande poderia prejudicar importantes funções vitais da célula durante a replicação (15) (77). Dados na literatura sugerem que durante o brotamento a cápsula sofra um rearranjo produzindo um túnel, esse mecanismo elaborado pode levar a uma ruptura da rede capsular para o broto surgir (77).

Diante disso nos pareceu interessante produzir um antígeno acapsular, com a finalidade de estudar a resposta imune após o estímulo fúngico em PBMCs de indivíduos controles com atividade ocupacional de exposição ao fungo. Nosso foco inicial foi produzir um antígeno que mantivesse a concentração proteica acima de 3,0 mg/mL.

Os antígenos foram produzidos seguindo protocolos anteriormente estudados e bem definidos por outros pesquisadores, porém, com adaptações e objetivo em se obter a redução parcial dos polissacarídeos da cápsula do fungo.

A produção de antígenos de *Cryptococcus* foi realizada segundo Freitas (2005), porém modificado para leveduras (67). Para a redução parcial dos polissacarídeos do fungo foi utilizado o meio ágar Sabouraud dextrose com NaCl a 2,9%. A manutenção da redução capsular, expansão e obtenção de um maior número de células fúngicas foi obtido com o meio Sabouraud dextrose a 4% sem adição 2,9% de NaCl. Segundo estudos o meio rico em glicose resulta na diminuição concomitante do tamanho da cápsula e da expressão dos genes CAP10, CAP59 CAP60 e CAP64 envolvidos com a síntese da cápsula (15)(65)(66). Desse modo evitamos a redução total dos polissacarídeos que são comunicantes com estruturas mais internas da célula fúngica e de componentes

antigênicos presentes na parede celular, que atuam no reconhecimento e estímulo de secreção da citocina IFN- γ .

A composição química da parede celular fúngica normalmente é composta de 50 – 60% de glucanos (polímeros de glicose) especialmente (β - 1,3) sendo o principal constituinte da parede interna, 20 – 30% de glicoproteínas (β -1,6) ramificada que ligam os componentes da parede interna e externa, 10 – 20% de mananas (cadeias de várias moléculas de manose) e quitina (polímero de N-acetilglucosamina) (79) (80)(81). Os glucanos fúngicos contêm principalmente a ligação β -1,3 e uma pequena porção, em torno de 10%, das ligações com ramos variados em β -1,6 e β -1,4 (79) (80)(81).

Visão geral dos componentes da parede celular dos fungos

A - levedura de *Candida* e as estruturas: Mananas, β -1,6 glucanos, β -1,3 glucanos, quitina e proteína. **B** - *Pneumocystis spp.* **C** – *Aspergillus*, melanina e conídios. **D** - *Aspergillus fumigatus*, galactosaminoglicano (GAG), galactomanana e hifas. **E** - Cápsula de *Cryptococcus*, GalXM e GXM. **F**- *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis*, α -1,3 glucanos. FONTE: Erwig e Gow (2016).

As manoproteínas na superfície da parede celular são polipeptídeos altamente glicosilados, ou seja, glicoprotéicos, sendo que em torno de 50 a 95% é composto por carboidratos (80) (81). As manoproteínas têm um domínio funcional rico em serina e treonina em C- terminal que forma uma âncora de

fixação para o glicosilfosfatidilinositol (âncora que se anexa a proteínas da membrana celular ou β -1,6 glucanos na parede celular) (80)(81). A âncora é clivada dentro do glicano C – terminal e o remanescente é transferido para formar uma ligação glicosídica com o β 1,6 glucano ramificado, que por sua vez, glicosidicamente ligado ao complexo β 1,3 glucano quitina compõe as fibras da parede interna. As estruturas desses módulos demonstram que esses processos ocorrem fora da membrana plasmática(80)(81)(82).

A manosição que ocorre nessa região da serina e treonina é de extrema importância, pois facilita o reconhecimento pelas células apresentadoras de antígenos através desses receptores de manose expostos; isso demonstra uma crucial contribuição da manosição para a imunogenicidade (78) (83). As MPs são antígenos chave que estimulam as respostas das células T, por gerarem tanto reações de hipersensibilidade de tipo tardio (DTH), bem como foi observada em estímulo experimental para a produção de citocinas em camundongos imunizados com *C. neoformans* como a fração antígeno filtrado de cultura de *C. neoformans* (CneF) demonstrado por Murphy (1988), ou ainda que dessensibilizam a quimiotaxia dos neutrófilos como a fração (MP-4) (15)(83) (84).

Nesse estudo a IL-2 foi mensurada como indicador do estímulo dos LT. As proteínas foram purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho sequencial, cromatografia de troca aniônica e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC); o gel de eletroforese dodecilsulfato-poliacrilamida de sódio (SDS-PAGE) revelou as frações: 98 e 88 de kDa sendo denominados de MP-98 e MP-88, respectivamente (15)(83)(85). As proteínas MP-98 e MP-88 compartilham sequências de sinal N-terminal como serina / treonina que são ricas em regiões C-terminais onde possivelmente ocorre a glicosilação na âncora do glicosilfosfatidil inositol (GPI) (15) (78) (83) (85). Os (GPI) servem para anexar as proteínas à membrana celular ou β -1,6 glucanos na parede celular (83). Essas características estruturais direcionam o transporte da proteína para a superfície celular. Quando a clivagem da proteína funcional da âncora ocorre, isso leva à secreção da proteína para o meio externo. Esses eventos podem estar relacionados com a descoberta de que aproximadamente

metade das proteínas que são manoproteínas são encontradas em sobrenadantes de culturas de *Cryptococcus* (83)(85). Além disso, quando as manoproteínas não são secretadas, elas permanecem na parede interna de *C. neoformans*; isso é uma característica marcante do *Cryptococcus* em relação à *Candida albicans*, por exemplo, onde sua manoproteína de 65 kDa fica localizada na parede celular externa sendo exposta na superfície (83).

Outros fungos como *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* também apresentam estruturas funcionais semelhantes às regiões ricas em serina e treonina onde ocorre a glicosilação similar aos *Cryptococcus* (81) (83) (86) (87).

O projeto genoma já identificou mais de 40 regiões N-terminais ricas em serina / treonina ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), no entanto até o momento apenas algumas proteínas com esses domínios funcionais são conhecidas (83).

Kang et al. (2018) avaliando a composição da parede celular fúngica de *Aspergillus fumigatus* por espectroscopia de NMR de estado sólido verificou que a quitina e α -1,3 glucana constroem uma estrutura hidrofóbica cercada por uma matriz hidratada de β -glucanas, diversamente ligados e coberta por uma camada dinâmica de glicoproteínas e α -1,3-glucana. A distribuição de dois domínios de α -1,3 glucanas demonstra as funções duplas desta molécula: contribuir para a rigidez da parede celular e a virulência fúngica (79)(88)(89).

GXM é o principal componente da cápsula polissacarídica e o principal fator de virulência criptocócica (15). Estudos clínicos e experimentais com cepas acapsulares de *C. neoformans* cada vez mais evidenciam não haver dificuldade na capacidade de ativação de células dendríticas, bem como na indução e expressão de TNF- α , IL-1- β , IL-12 e IFN- γ ; por outro lado isolados com cápsulas inibem a liberação de IL-12 estimulando um aumento bastante significativo de IL-10 (90). Estes resultados sugerem que os componentes capsulares possivelmente produzem anergia através da regulação positiva para IL-10 e regulação negativa para a via Th1 demonstrando como o polissacarídeo interfere na imunidade mediada por células (15) (91) (91)(92).

O estudo de antígenos fúngicos tem assumido notável importância, principalmente no que diz respeito à aplicabilidade dos mesmos, como reagentes

biológicos na avaliação da resposta imune celular e/ou humoral, de indivíduos acometidos por doenças causadas por fungos (67).

Ao avaliarmos por Elispot a ativação de linfócitos T dos indivíduos saudáveis, que desempenharam em algum momento atividades com exposição aos fungos observamos a secreção de IFN- γ frente aos estímulos fúngicos tanto para *Cryptococcus* e *Histoplasma* bem como, em menor intensidade para *Paracoccidioides* de forma estatisticamente significativa como provável reconhecimento de memória, já que estes indivíduos atuam como micologistas, ou ecoturistas, com epidemiologia compatível, ou seja, estão em constante contato com estes agentes etiológicos, ou seja, os micologistas por trabalharem com amostras clínicas e ambientais e os ecoturistas por estarem em contato direto com o nicho ecológico dos fungos. Em contrapartida, tratadores de aves apresentaram um perfil mediano de secreção de IFN- γ não só para *Cryptococcus*, como também para o *Histoplasma* provavelmente por ambos agentes patogênicos dividirem o mesmo substrato, ou seja, estão presentes em excreta de aves. Um tratador de aves, apesar da epidemiologia para estes agentes fúngicos apresentou perfil baixo da secreção de IFN- γ , provavelmente devido à idade. Segundo os perfis obtidos verificamos que quanto maior a intensidade de exposição, bem como idade dos indivíduos maior a expressão da secreção de IFN- γ . Um fato que nos chama a atenção são indivíduos que mesmo com raras atividades de exposição ao fungo respondem após estímulo com *Cryptococcus* com diferença estatística significativa quando comparadas ao basal.

Corroborando com nossos resultados o estudo de Kawakami et al. (1996) avaliaram camundongos tratados e não tratados com anticorpo monoclonal anti IFN- γ (mAb) e os resultados obtidos sugerem que o IFN- γ endógeno protege camundongos da infecção por *C. neoformans* induzindo uma resposta inflamatória celular e potencializa a depuração de microrganismos dos pulmões evitando a disseminação para o sistema nervoso central (93) (94).

Almeida et al (2001) avaliaram a linfoproliferação de células T CD4⁺ esplênicas de camundongos e demonstraram que a cápsula de *C. neoformans* induz um padrão de resposta Th2 com níveis elevados de produção de IL-4 e IL-

10 regulando negativamente a resposta imune celular protetora na infecção fúngica. (95).

Estudo de Wagner et al. (2015) com cepa virulenta de *C. neoformans* demonstrou que a proteção contra a infecção está associada à geração de uma resposta imune do tipo Th1 e ativação de macrófagos M1. Quando os macrófagos estão expostos a um microambiente de citocinas dominantes tais como IFN- γ eles se diferenciam em macrófagos ativados classicamente, conhecidos como macrófagos M1. Além disso, os macrófagos ativados classicamente (M1) são importantes na depuração de *C. neoformans*, e dependem do transdutor de sinal ativador da transcrição 1 (STAT1) (96) (88).

Muller et al., (2007) demonstrou em modelo murino que citocinas IL-4 e principalmente IL-13, leva ao desenvolvimento de Macrófagos ativados pela via alternativa (M2) (52). Camundongos que expressavam altas concentrações de IL-13 resultaram com carga fúngica significativamente elevada no pulmão quando comparados aos camundongos IL-13 - / -. A IL-13 não só contribui para a inflamação alérgica como é muito prejudicial durante a infecção por *C. neoformans*. Ainda nesse estudo a infecção com *C. neoformans* em animais IFN- γ - / - mostraram números elevados de macrófagos ativados pela via alternativa, segundo os pesquisadores estes resultados podem estar associados à suscetibilidade para a criptococose (52). Esses estudos evidenciam a importância de um sistema imune íntegro e o fundamental papel das citocinas envolvidas no microambiente durante a infecção. Animais imunizados com *Cryptococcus* respondem possivelmente de forma específica produzindo IFN- γ contendo a infecção. Por outro lado, animais *nocautes* para citocinas a exemplo da IFN- γ evoluem para quadros mais graves da doença (52).

Nossos resultados sugerem que possivelmente nosso grupo de estudo controle tenham desenvolvido resposta imunológica de memória antígeno específica quando observamos a intensa secreção de IFN- γ nos ensaios de Elispot o que provavelmente pode estar relacionado ao fato das frequentes exposições ao fungo a que essas pessoas se submetem e a boa imunidade. Embora possa haver reatividade cruzada durante provas diagnósticas, ou reconhecimento de porções da parede em comum que compõem as estruturas

do *Cryptococcus* e outros agentes fúngicos, as características estruturais da glicosilação e manosiilação de *Cryptococcus* resultam na exposição das manoproteínas na superfície celular o que pode levar à secreção das proteínas para o meio externo. Algumas manoproteínas secretadas apresentam imunogenocidade e estimulam respostas imunes mediadas por células (78).

Nossos resultados evidenciam que o *Cryptococcus* está disperso de forma comum no ambiente, ou seja, não está restrito somente a pessoas com intensa exposição ao fungo. Estudo realizado por Rocha et al., (2012), com antígenos de *Cryptococcus*, bem como por Miller e Puck (1984) demonstraram que indivíduos sem exposição contínua a *C. neoformans* também apresentaram resposta linfoproliferativa (72)(97).

Um estudo conduzido nos Estados Unidos com 40 amostras clínicas de pacientes com neurocriptococose entre 1991 e 1999 se mostrou significativamente superior ao número de casos ao indicado por estudos anteriores (98). Nova York registrou na década de 1990 mais de 1000 casos de infecções criptocócicas por ano pelos sorotipos A e D se destacando como principal local da ocorrência da doença (98). Nossos resultados ainda sugerem a necessidade de pesquisas mais detalhadas sobre como o fungo vem se comportando no ambiente e como as pessoas estão expostas a estes agentes patogênicos.

Diante dos resultados obtidos observamos que o método Elispot pode ser utilizado para avaliar a secreção de IFN- γ em PBMCs de pacientes com criptococose e de acordo com os níveis de secreção dessa citocina direcionar possíveis atuações na conduta clínica.

5.2 Imunofenotipagem

A meningite criptocócica é uma infecção que ocorre principalmente em indivíduos imunossuprimidos e frequentemente associada à infecção pelo HIV⁺ (61). Apesar da incidência da meningite criptocócica estar relacionada a estados de imunossupressão, estudos/relatos vêm demonstrando aumento dessas

ocorrências em indivíduos considerados imunocompetentes com infecção tanto pela variedade *C. neoformans* como por *C. gattii* (61) (99).

Para um melhor entendimento da neurocriptococose estudos mais específicos precisam ser conduzidos e pautados principalmente sobre a real participação dos linfócitos T no curso da infecção. Assim, nosso objetivo foi contribuir para esse entendimento através da caracterização da população de linfócitos T (CD3⁺CD4⁺) e as subpopulações com análises sobre o estado de ativação e regulação das células T responsivas em- *naïve* (N), - memória central (TMC), - memória efetora (TME) e - efetora terminalmente diferenciada (TEMRA) em pacientes aparentemente imunocompetentes e indivíduos controles sadios.

Nossos resultados apresentaram diferenças significativas na população dos linfócitos totais e células T $\gamma\delta$ no grupo de pacientes, mas sem diferença estatística significativa para a população T CD4⁺ quando comparado com indivíduos sadios.

Resultados semelhantes têm sido observados durante a infecção e período de tratamento da criptococose disseminada por *C. neoformans* e/ou *C. gattii* como descritos por Ruan et al (2017) em paciente adulto com doença disseminada por *C. neoformans* e contagem de células T CD4⁺ normal. Da mesma forma, descrito por Suchitha et al. (2012) em paciente adulto afetado por *C. gattii* (100)(101).

A realização de um estudo retrospectivo na China envolvendo 154 pacientes HIV negativos com criptococose disseminada demonstrou que 103 pacientes sem nenhuma outra comorbidade associada à doença mostraram contagem normal de linfócitos TCD4⁺ (99).

Segundo estudos, quadros de linfopenia durante a infecção disseminada na criptococose podem estar relacionados com altas concentrações de GXM circulante. Os polissacarídeos do fungo interferem na liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1- β e IFN- γ , inibindo a liberação de IL-12 e estimulando um aumento bastante significativo de IL-10 (72) (90). Além disso, vários fatores podem contribuir com o estado de supressão percebido durante a neurocriptococose, como fatores de virulência do fungo, presença de citocinas e intensidade de estímulos conferidos pelas APCs aos linfócitos T.

Estudos adicionais e recentes demonstram que as células T $\gamma\delta$ podem aumentar os níveis de expressão na ausência de neutrófilos e possivelmente exercer regulação negativa para respostas Th1 durante a infecção por *C. neoformans*. (4) (57). Por outro lado a presença das células T $\gamma\delta$ também está associada a respostas imunes protetoras, pois na ausência de neutrófilos são capazes de respostas imunológicas rápidas para conter a infecção (4) (57). Além disso, parece que as células T $\gamma\delta$ desenvolvem um papel imunorregulador em respostas exacerbadas da via Th1 causadas por células NKT e possivelmente atuem no equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2 no curso das infecções (102).

Embora não possamos afirmar, o aumento significativo das células $\gamma\delta$ e a diminuição dos linfócitos totais observado em nossos resultados podem estar relacionados tanto com o papel efetor quanto o regulador desenvolvido por essas células durante a infecção. Até o momento há poucos estudos e muitas controvérsias sobre o papel efetor das células T $\gamma\delta$ durante a infecção por *Cryptococcus* spp(4) (57).

Outra função importante a ser considerada é o papel das células Tregs no contexto da infecção. As Tregs desempenham função homeostática para assegurar a modulação das respostas imunológicas frente a diversas doenças autoimunes e infecções fúngicas (4)(55)(103)(104). Estudos sobre o papel dessas células têm evidenciado que elas desenvolvem função mediadora e possivelmente os efeitos reguladores são devido às intensas respostas imunes Th2 durante a infecção por *Cryptococcus* (4)(103)(104).

O perfil T regulatório demonstrado em nossos resultados com aumento significativo da população ($CD4^+CD25^+CD127^{low}$) no grupo de pacientes podem ser evidências dessa regulação bem como o aumento significativo demonstrado pelo fenótipo de ativação ($CD4^+CD25^+CD127^{+ high}$). Importante enfatizar que de acordo com estudos apresentados por Venet et al., (2009), pacientes em sepse desenvolvem um perfil regulatório com aumento abundante da população ($CD25^+CD127^{low}$) e diminuição da subpopulação ($CD25^-CD127^+$) em linfócitos T $CD4^+$ (105) (106). Desse modo a monitoração da população Treg e das outras subpopulações de linfócitos T durante a neurocriptococose pode ser de máxima

importância e orientar a escolha da melhor terapia a ser adotada para esses pacientes.

Quando analisamos as subpopulações dentro do compartimento T CD4⁺ quanto ao estado de memória observamos aumento significativo na expressão das células (TME), (TEMRA) e subsequente diminuição das células (TMC) e *naïve* no grupo de pacientes.

Existem várias hipóteses sobre a origem das células T de memória, alguns estudos defendem que são subgrupos distintos e a diferenciação ocorre de forma linear onde os estágios de diferenciação são definidos a partir da força do sinal via TCR e concentração de antígenos partindo da população (TMC) para (TME) e depois (TEMRA) (74).

As (TEMRA) são células com função efetora pouco eficiente e altamente diferenciada, secretam TNF e IL-6 apresentam pouca replicação e nos estágios finais de diferenciação re-expressam o CD45RA⁺. (107). São possivelmente derivadas das (TME) e estão mais presentes em indivíduos com mais idade e em decorrência das inúmeras infecções vivenciadas ao longo da vida (74) (107). O aumento significativo das (TEMRA) observado em nossos resultados no grupo de pacientes pode estar relacionado com a exposição prolongada dos linfócitos T com o fungo, o que possivelmente suprime a função efetora dessas células durante a infecção nesses pacientes (75).

Células (TME) surgem no início da infecção, têm função de memória efetora imediata secretam IFN- γ e IL-2 e estão presentes nos tecidos periféricos inflamados. (74) (76).

As (TMC) são células com vida mais longa e capacidade de se renovarem, têm alto potencial proliferativo e secretam principalmente IL-2. Não possuem função efetora, no entanto quando expressam o receptor CCR7⁺ as TMC migram para os linfonodos rapidamente onde se proliferam e se diferenciam em células efetoras em resposta ao estímulo antigênico conhecido. São células mais sensíveis aos estímulos de antígenos e menos dependentes de co-estimulações, assim como, apresentam maior capacidade de interação com (DCs) e linfócitos B (73)(74).

Alguns estudos demonstram que estímulos fracos possivelmente privam os linfócitos T em adquirir o fenótipo (ME) e favoreçam a origem de linfócitos (TMC) (73)(74)(76).

Segundo essas investigações a diferenciação das células T de memória ao longo da resposta imune tem sido atribuída à complexa heterogeneidade das APCs, ao assumirem características distintas das APCs presentes nos estágios iniciais da infecção. Desse modo passam a disponibilizar menos antígenos e reduzir a produção de citocinas, assim como, à expressão de moléculas co-estimulatórias (74)(76).

Em infecções persistentes uma sinalização fraca dirigida aos linfócitos parece ser essencial para não gerar exaustão dos linfócitos T e importante na geração tanto de células (TME) como (TMC). Portanto um equilíbrio entre os estímulos parece ser crucial tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção para a geração de ambas as populações celulares (TME) e (TMC) (74) (76).

A partir das investigações em torno desses mecanismos do curso natural de desenvolvimento das células T de memória podemos evidenciar que o aumento da expressão das (TME) observados em nossos pacientes seja devido aos intensos e constantes estímulos antigênicos em função da carga fúngica, assim como a diminuição das (TCM) pode estar relacionada com a necessidade de essas células exercerem suas funções protetoras e de memória prolongada em condições onde haja maior depuração fúngica e controle da infecção.

A neurocriptococose é uma infecção grave e tanto o *C. neoformans* como o *C. gattii* conferem persistência no hospedeiro através dos fatores de virulência e interações diversas com interferências em células da resposta imune inata e adaptativa o que pode levar a possíveis distúrbios da função homeostática do sistema imunológico alterando os mecanismos de transição natural dessas células. Ainda há muitas hipóteses sobre a diferenciação dos linfócitos T de memória durante a resposta imune.

O assunto ainda é bastante controverso e mais estudos são necessários para o entendimento da proliferação e diferenciação celular tanto dos linfócitos

T efetores como dos linfócitos T de memória em pacientes aparentemente imunocompetentes durante a neurocriptococose.

6 ANEXOS

ANEXO A - Antígenos de *Cryptococcus*: Filtrado de Cultura (FC) inativados com timerosal borato

O preparo dos antígenos filtrado de cultura, dos genótipos (VNI-VNIV) e (VGI-VGIV) de *Cryptococcus* foi obtido após redução da cápsula. Cada genótipo acapsular de *Cryptococcus* foi semeado em Erlenmeyer, contendo 250 mL de caldo YPD, acrescido com 40% de glicose e 2,9% de NaCl (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Em seguida foram incubados em Shaker (Thermo Scientific Max Q – 4000) por 72 horas a 30°C. Após o período de 72 horas os antígenos foram divididos em dois lotes. No primeiro lote foi adicionado solução de timerosal borato na diluição de 1:5000 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) e no segundo lote foi adicionado inibidor de protease Fenil metil sulfonil fluoreto (FMSF) na concentração de 4,4 mg/mL. Os antígenos preparados com timerosal permaneceram em repouso por 24 horas e os preparados com inibidor de proteases permaneceram em repouso por 48 horas, todos em temperatura ambiente. Após esse período as culturas foram centrifugadas por 60 minutos a 4.200 G e o sobrenadante coletado.

O pH foi ajustado para 7.2 – 7.4 (PH meter model PHTEK, PHS – 3H). A dosagem de proteína de cada preparação antigênica foi realizada em Nanodrop (Uniscience ND 1000 Spectrophotometer) (Tabela 1). Os antígenos foram armazenados e mantidos sobre refrigeração a 4°C (67)(68)(69)(72).

ANEXO A, Tabela 1- Dosagem protéica do antígeno filtrado de cultura (Ag FC)

Antígeno FC, inativado com timerosal	mg/mL
NI	2,600
NII	1,414
NIII	1,560
NIV	0,555
GI	1,813
GII	0,804
GIII	2,098
GIV	1,594

*(Ag FC) Antígeno filtrado de cultura.

ANEXO B – Antígenos de *Cryptococcus*: Cell Free (CFA) e Somático (So) Inativados com timerosal borato

O *pellet* do cultivo celular acapsulado obtido do filtrado de cultura em caldo YPD foi dividido em dois lotes: Uma parte para produção dos antígenos CFA e a outra parte para a produção dos antígenos somáticos. Para a preparação dos antígenos CFA o *pellet* foi ressuspensão em 15 mL de Tampão fosfato (PBS- pH 7,2) e homogeneizado duas vezes durante 15 minutos com intervalos de repouso de 30 minutos no vórtex (Vortex Gene 2 – Scientific Industries, USA), para a obtenção dos epítomos ligados a membrana celular. Em seguida os antígenos CFA foram centrifugados por 20 minutos em 4.200 G e adicionada solução de timerosal borato na diluição de 1:5.000 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) permanecendo em repouso por 24 horas. Após esse período os antígenos foram novamente centrifugados por 20 minutos em 4.200 G e o sobrenadante coletado. O pH ajustado para pH entre 7.2 – 7.4 (PH meter model PHTEK, PHS – 3H). A dosagem proteica foi realizada em Nanodrop (Uniscience ND 1000 Spectrophotometer), (Tabela 2). Os antígenos foram armazenados e mantidos sobre refrigeração a 4°C (72)(71).

O *pellet*, do segundo lote do cultivo celular foi utilizado para a produção dos antígenos somáticos. O *pellet* foi macerado três vezes com adição de nitrogênio líquido com pistilo em gral estéril. Em seguida os antígenos foram ressuspensos em 15 mL de Tampão fosfato (PBS - pH 7,2) e centrifugados a 4.200 G, por 20 minutos. Foi adicionado solução de timerosal borato 1:5.000 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) e mantido a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período os antígenos foram novamente centrifugados por 20 minutos em 4.200 G e o sobrenadante coletado. O pH foi ajustado para 7.2 – 7.4 (PH meter model PHTEK, PHS – 3H). A dosagem proteica foi realizada em Nanodrop (Uniscience ND 1000 Spectrophotometer) (Tabela 2). Os antígenos foram armazenados e mantidos sobre refrigeração a - 4°C (67)(68)(69)(71)(72).

ANEXO B, Tabela 2- Dosagem proteica do antígeno (CFA) e (So) inativado com timerosal

Antígeno CFA, inativado com timerosal	mg/mL	Antígeno So inativado com timerosal	mg/mL
NI	2,915	NI	4,21
NII	1,084	NII	8,3
NIII	1,497	NIII	3,98
NIV	0,817	NIV	7,7
GI	1,644	GI	5,54
GII	2.440	GII	7,8
GIII	1,261	GIII	10,3
GIV	1,638	GIV	7,14

Cell Free (CFA) e somático (So).

ANEXO C - Antígenos *Cryptococcus*: Filtrado de cultura, *Cell Free* (CFA) e Somático com inibidor de proteases

Reproduzimos os antígenos, filtrado de cultura, CFA, e somático usando o mesmo protocolo como descrito acima em (Antígenos de *Cryptococcus*: *Cell Free* (CFA) e Somático Inativados com timerosal) (ANEXO B). Para a produção destes antígenos não foi adicionado solução de timerosal borato 1:5000, utilizamos o inibidor de proteases (FMSF) na concentração final de 4,4 mg/mL deixando permanecer em fase estacionária por 48 horas. Após o período de 48 horas as culturas foram centrifugadas por 60 minutos a 4.200 G e o sobrenadante coletado. O pH foi ajustado para 7.2 – 7.4 (PH meter model PHTEK, PHS – 3H). A dosagem de proteína de cada preparação antigênica ocorreu em Nanodrop (Uniscience ND 1000 Spectrophotometer) (Tabela 3). Os antígenos foram armazenados e mantidos sobre refrigeração a - 4°C (67)(68)(69) (71)(72).

ANEXO C, Tabela 3- Dosagem proteica do antígeno (CFA) e (So) inativado com inibidor de protease

Antígeno CFA, inativado com FMSF	mg/mL	Antígeno So inativado com FMSF	mg/mL
NI	4,673	NI	3,89
NII	6,260	NII	7,847
NIII	9,881	NIII	7,331
NIV	11,078	NIV	6,248
GI	7,602	GI	5,596
GII	10,523	GII	4,072
GIII	6,505	GIII	8,018
GIV	13,703	GIV	9,474

Cell Free (CFA) e somático (So). Fenil metil sulfonyl fluoreto (FMSF).

ANEXO D - Antígenos *Cryptococcus*: Filtrado de Cultura, *Cell Free* (CFA) e Somático inativado pelo calor (tindalização)

Os antígenos, filtrado de cultura e CFA, foram obtidos como descrito no item (Antígenos de *Cryptococcus*: Filtrado de Cultura inativados com Timerosal) (ANEXO A). Entretanto para a inativação dos antígenos foi utilizada a técnica de tindalização, ou seja, inativação pelo calor. As culturas obtidas pós cultivo em Erlenmeyer em caldo YPD acrescido com 40% de glicose e 2,9% de NaCl (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), foram incubados em Shaker (Thermo Scientific Max Q – 4000) por 72 horas a 30°C. Em seguida foram colocadas em autoclave, sem fechamento total (rosquear) e mantidas por um período de 30 minutos. Este processo foi repetido por três dias subsequentes (esterilização fracionada). Os antígenos foram centrifugados por 20 minutos a 4.200 G. O sobrenadante foi coletado e o pH ajustado para 7.2 – 7.4 (PH meter model PHTEK, PHS – 3H). A dosagem proteica foi realizada em Nanodrop (Uniscience ND 1000 Spectrophotometer) (Tabela 4). Os antígenos, filtrado de cultura e CFA inativados pelo calor, foram armazenados e mantidos sobre refrigeração a 4°C (67)(68)(69) (71) (72).

ANEXO D, Tabela 4- Dosagem proteica do antígeno (FC), (CFA) e (So) inativado pelo calor

Antígeno FC, inativado pelo calor	mg/mL	Antígeno CFA, inativado pelo calor	mg/mL	Antígeno So, inativado pelo calor	mg/mL
NI	6,237	NI	2,806	NI	0,635
NII	0,914	NII	0,989	NII	0,707
NIII	0,625	NIII	2,144	NIII	0,663
NIV	0,894	NIV	2,5	NIV	0,575
GI	0,850	GI	2,473	GI	1,379
GII	0,593	GII	2,586	GII	1,093
GIII	1,698	GIII	2,465	GIII	1,304
GIV	4,404	GIV	2,627	GIV	0,838

Filtrado de cultura (FC), *Cell Free* (CFA) e Somático (So)

ANEXO E - Antígenos de *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*

Os antígenos dos fungos *Histoplasma capsulatum* cepa (26029) e *Paracoccidioides brasiliensis* cepa (Pb 339) foram produzidos de acordo com a metodologia dos exoantígenos dos *C. neoformans* e *C. gattii*. Os antígenos de *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* foram semeados em placas de Petri de (90x15) contendo Ágar Sabouraud dextrose 4% sem adição de 2,9% NaCl (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), e incubadas a 30°C por um período de 15 dias (65)(66)(67)(68). Em seguida, foi adicionado solução de timerosal borato na diluição de 1:5000 em todos os cultivos (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, US) e mantidos em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período o sobrenadante de cada cultura foi coletado com pipeta Pasteur estéril e centrifugado duas vezes a 4.200 G por 30 minutos. O pH foi ajustado para pH-7,2 e pH-7,4 em (PH meter model PHTEK, PHS – 3H). A dosagem de proteínas de cada preparação antigênica foi realizada em Nanodrop (Uniscience ND 1000 Spectrophotometer) (Tabela 5). Todos os antígenos foram estocados e preservados a 4°C, até sua utilização (67)(68)(69).

ANEXO E, Tabela 5- Dosagem proteica dos antígenos *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*

<i>H. capsulatum</i> Cepa (26029)	mg/mL	<i>Paracoccidioides</i> <i>brasiliensis</i> Cepa (339)	mg/mL
<i>H. capsulatum</i>	2,70	PB	7,46

Paracoccidioides brasiliensis (PB).

ANEXO F - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS SOBRE A PESQUISA**

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS CELULARES AFETADOS PELOS DISTÚRBIOS DA APOPTOSE E CLONOTIPAGEM DAS CÉLULAS T ANTÍGENO-ESPECÍFICAS EM PACIENTES PORTADORES DE NEUROCRIPTOCOCOSE**

PESQUISADOR: Dewton de Moraes Vasconcelos

CARGO/FUNÇÃO: Médico pesquisador associado ao LIM 56 HCFMUSP

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências – LIM 56

1. **Convite à participação:** Convidamos o (a) Sr (a) para participar desta pesquisa que busca explicar o motivo de pessoas aparentemente saudáveis apresentarem neurocriptococose.
2. **Justificativa e objetivos do estudo:** A neurocriptococose é uma infecção causada por fungos do gênero *Cryptococcus* spp. que causa um tipo de meningite ou meningoencefalite (infecção da meninge e do cérebro). É uma doença pouco comum em pessoas que não apresentam nenhuma falha de defesa do organismo, no entanto por alguma razão desconhecida pessoas com imunidade aparentemente normal são afetadas pela doença. Por esse motivo o Departamento/Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, juntamente com Laboratório de Investigação Médica (LIM-56), da Faculdade de Medicina da USP, está desenvolvendo uma pesquisa para compreender porque essas pessoas desenvolvem a neurocriptococose. Convidamos o Sr (a) para participar desta pesquisa e compor o grupo de pacientes que são afetados pela doença. Como grupo controle serão convidados pacientes afetados pela neurocriptococose infectados pelo HIV, sabidamente um fator de risco para o desenvolvimento dessa forma de doença.
3. **Descrição dos procedimentos que serão realizados.** Caso concorde em participar desta pesquisa, após avaliação clínica de rotina feita pelo médico, será coletado um volume de 40 mL de sangue por punção de veia periférica do antebraço, de acordo com o acompanhamento ambulatorial de rotina. A coleta de sangue será por punção de veia periférica do antebraço com sistema comercial estéril de tubos a vácuo. Esse sangue será levado a um laboratório especializado, onde as células serão separadas e analisadas em diversos exames. O estudo do líquido cefalorraquidiano (LCR) será executado a partir do material excedente do líquido cefalorraquidiano que tenha sido coletado para a realização de procedimentos necessários para diagnóstico e tratamento do paciente quando hospitalizado; a coleta de líquido cefalorraquidiano será executada por punção ao nível

lombar, durante procedimento diagnóstico e evolutivo de rotina, por meio de punção com agulha específica para esta função, com mandril que obstrui o lúmen da agulha, de modo a se evitar possíveis contaminações e extravasamento do LCR do espaço sub-aracnoideo para o exterior. Essas coletas serão realizadas por profissionais capacitados e em condições técnicas adequadas de esterilidade.

4. **Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos do item 3:** Como em qualquer coleta de sangue pode haver um pequeno desconforto local e a formação de pequeno hematoma. As medidas habituais para com a coleta de sangue serão tomadas para que isto não aconteça. Sempre que possível essa coleta será realizada em conjunto com os exames de rotina evitando assim uma coleta extra. A coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR) será sempre realizada durante coleta de rotina diagnóstica e/ou terapêutica. Como efeitos colaterais da coleta de líquido cefalorraquidiano pode ocorrer ocasionalmente cefaleia pós-puncional, que ocorre habitualmente quando são coletados volumes maiores do LCR; a recolocação do mandril antes da retirada da agulha reduz o risco da cefaleia e de pequenos sangramentos, advindos dos vasos aracnoideos; outra complicação rara é a ocorrência de meningite pós-punção, que pode ocorrer em caso de contaminação durante o procedimento. As medidas habituais, tanto posturais, técnicas quanto de antisepsia serão utilizadas para evitar que essas complicações ocorram.
5. **Benefícios esperados para o participante:** O voluntário não terá nenhum benefício adicional por participar deste protocolo, mas estará contribuindo enormemente para o melhor conhecimento dos fatores relacionados ao desenvolvimento da doença, que poderá trazer benefícios para si próprio e para outros pacientes com o mesmo tipo de doença futuramente.
6. **Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa:** O acompanhamento dos pacientes assegura a assistência a eventuais problemas de saúde que possam ocorrer com o paciente durante o período de vigência do protocolo e após o término do mesmo, na sistemática habitual do HCFMUSP.
7. **É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição:** Estou ciente de que posso suspender o consentimento para a utilização de minhas amostras na pesquisa a qualquer momento, sem que este fato implique qualquer forma de constrangimento entre mim e meu médico, que se dispõe a continuar me tratando em quaisquer circunstâncias.
8. **Direito de confidencialidade** – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

9. **Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores:** Os indivíduos participantes terão pleno acesso aos seus dados na pesquisa, bem como esclarecimento por parte dos investigadores, a qualquer momento que acharem necessário;
10. **Despesas e compensações:** Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
11. **O material biológico (sangue e líquido céfalo-raquidiano) obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011.** O pesquisador utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. As amostras serão armazenadas e permanecerão sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais. Caso haja necessidade de utilização de alguma amostra armazenada para novas pesquisas, essas serão utilizadas somente mediante aprovação prévia pela CAPPesq e, quando for o caso, pela CONEP.
12. **Garantia de acesso:** Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos, que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, no Instituto de Medicina Tropical, Prédio 2, 3º andar, cujo telefone é (11) 98376-5615 ou (11) 3061-7499. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq); Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, CEP: 05403-010 – tel: (11) 2661-6442, FAX: (11) 2661-6492 – E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br
13. Eu discuti com o Dr. *Dewton de Moraes Vasconcelos* sobre a minha decisão em participar nesta pesquisa. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

14. Aceito o convite de participar do estudo e declaro que acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS CELULARES AFETADOS PELOS DISTÚRBIOS DA APOPTOSE E CLONOTIPAGEM DAS CÉLULAS T ANTÍGENO-ESPECÍFICAS EM PACIENTES PORTADORES DE NEUROCRÍPTOCOCOSE. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do paciente ou de seu representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

ANEXO G - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP HC **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS CELULARES AFETADOS E CLONOTIPAGEM DAS CÉLULAS T ANTÍGENO-ESPECÍFICAS EM PACIENTES PORTADORES DE NEUROCRÍPTOCOCOSE

Pesquisador: Dewton de Moraes Vasconcelos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49413815.8.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.483.420

Apresentação do Projeto:

A neurocriptococose é uma doença que acomete principalmente, pacientes imunodeprimidos. Aproximadamente 6 a 10% dos pacientes com AIDS desenvolverão meningite criptocócica e aproximadamente 40% apresentarão a doença como a primeira infecção oportunista relacionada à AIDS. A infecção criptocócica em pacientes HIV positivos está normalmente associada a uma importante diminuição da contagem de LT CD4+, com valores inferiores a 100 células/mcL. A mortalidade aguda (durante a terapia inicial com drogas antifúngicas) da criptococose em pacientes HIV positivos é de 10 a 20%, sendo que 30 a 60% dos pacientes morrem ao final de 12 meses. Apesar da inegável associação entre baixa contagem de células TCD4+ e infecção pelo HIV, existem outras causas capazes de determinar linfopenia TCD4+; dentre elas podemos citar o tratamento imunossupressor, infecção múltipla no momento da contagem celular, imunodeficiência congênita, sarcoidose, alcoolismo, diabetes, tuberculose, transplante entre outros. O presente projeto pretende investigar em amostras clínicas uma comparação rápida entre a expressão de regiões variáveis do TCR em células do local da lesão e de um compartimento não afetado do corpo pode ser o enfoque mais apropriado. Com essa finalidade, tanto a amplificação por PCR com primers específicos para as famílias de genes V quanto a coloração com anticorpos monoclonais específicos para as regiões variáveis da cadeia dos TCRse avaliação por citometria de

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.483.420

fluxo podem ser utilizadas. Esse último enfoque é usualmente mais reprodutível que a quantificação por PCR, que pode sofrer desvios por diferenças na eficiência dos primers e pela natureza exponencial da amplificação. Além disso, a citometria de fluxo permite a determinação da utilização dos TCRs em cada célula individualmente, ao invés de uma extrapolação baseada na proporção dos transcritos de genes V do TCR amplificados do "pool" inteiro de células T. Utilizando-se citometria multiparamétrica, a quantificação da utilização das cadeias variáveis dos TCRs pode ser facilmente obtida em subtipos individuais de linfócitos T definidos pela expressão de diversos antígenos diferentes. Por exemplo, a análise por citometria de fluxo das cadeias variáveis dos TCRs pode ser combinada com a coloração de marcadores de ativação e do estado de "naïve" ou de memória central ou efetora, citocinas intracelulares e células apoptóticas, entre outras características. Os Critério de Inclusão: Os pacientes estudados consistirão de portadores de neurocriptococose que já vêm sendo selecionados no ambulatório de imunodeficiências primárias (ADEE-3033) do Departamento de Dermatologia, de pacientes advindos do Departamento de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP ou do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Será avaliado um grupo controle composto de indivíduos portadores de infecção persistente pelo HIV portadores de neurocriptococose. Critério de Exclusão: Esses pacientes serão avaliados quanto à existência de qualquer doença de base ou uso de medicação imunossupressora, que constituem critérios de exclusão. Amostra total de 60 sujeitos, sendo que 20 com HIV+ e neurocriptococose, 20 com HIV- e neurocriptococose e 20 controles.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O presente estudo tem como objetivo avaliar pacientes com neurocriptococose quanto ao repertório de segmentos variáveis das cadeias beta dos receptores das células T dos pacientes no sangue periférico e no tecido alvo (líquido céfalo-raquidiano); Objetivo Secundário: Correlacionando o fenótipo das células responsivas, quanto ao estado de ativação (naïve ou de memória) (CD45 RA e CD45 RO, CD62L, CD25, CD69, CD38 e expressão de moléculas do CPH de classe II); Correlacionando com o padrão de resposta imunológica celular (T1, T2, T17 e Treg) por meio de marcadores de superfície; Correlacionando com a apoptose induzida pela ativação e com a expressão de CD95 e de seu ligante; Comparar com células T de indivíduos normais, responsivos ao antígeno de Criptococo..

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

riscos relativos a punção para coleta de líquor (meningite pos líquor, cefaleia), porem o pesquisador infora que a coleta se dará para diagnostico e portanto procedimento de rotina.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.483.420

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem fundamentado e metodologia adequada aos objetivos propostos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE escrito em linguagem clara e dirigido ao paciente.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_460204.pdf	14/03/2016 10:44:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_consentimento_livre_esclarecido_Neurocripto_atual.pdf	14/03/2016 10:44:05	Dewton de Moraes Vasconcelos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada_Criptococose.pdf	17/09/2015 16:33:22	Dewton de Moraes Vasconcelos	Aceito
Outros	Registro_online_Neurocriptococose.pdf	04/09/2015 15:49:02	Dewton de Moraes Vasconcelos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto criptococo - clonotipagem.docx	29/01/2015 15:13:01		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.483.420

SAO PAULO, 08 de Abril de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO H- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP ER

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS - IIER
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
Elaborado pela Instituição Coparticipante														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS CELULARES AFETADOS E CLONOTIPAGEM DAS CÉLULAS T ANTÍGENO-ESPECÍFICAS EM PACIENTES PORTADORES DE NEUROCRÍPTOCOCOSE														
Pesquisador: Dewton de Moraes Vasconcelos														
Área Temática:														
Versão: 1														
CAAE: 49413815.8.3001.0061														
Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P														
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 1.569.194														
Apresentação do Projeto:														
Introdução:														
<p>A neurocriptococose é uma doença que acomete, principalmente, pacientes imunodeprimidos. Aproximadamente 6 a 10% dos pacientes com AIDS desenvolverão meningite criptocócica e aproximadamente 40% apresentarão a doença como a primeira infecção oportunista relacionada à AIDS. A infecção criptocócica em pacientes HIV positivos está normalmente associada a uma importante diminuição da contagem de LT CD4+, com valores inferiores a 100 células/L. Apesar da inegável associação entre baixa contagem de células TCD4+ e infecção pelo HIV, existem outras causas capazes de determinar linfopenia TCD4+; dentre elas podemos citar o tratamento imunossupressor, infecção múltipla no momento da contagem celular, imunodeficiência congênita, sarcoidose, alcoolismo, diabetes, tuberculose, transplante entre outros.</p> <p>A relação criptococose x imunocompetência é um assunto que ainda não foi esclarecido por completo principalmente na atualidade, onde indivíduos considerados imunocompetentes (sem causa conhecida de imunodeficiência) e que apresentam criptococose disseminada têm sido observados com alguma frequência. Levitz & North, 1997 ao avaliarem a resposta linfoproliferativa das células mononucleares de pacientes com neurocriptococose e de indivíduos controle frente ao antígeno homólogo do fungo e frente à Candida sp observaram que as células dos dois grupos</p>														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165</td> <td>CEP: 01.246-900</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Cerqueira César</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SAO PAULO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (11)3896-1406</td> <td>Fax: (11)3896-1406</td> <td>E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br</td> </tr> </table>			Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165		CEP: 01.246-900	Bairro: Cerqueira César			UF: SP	Município: SAO PAULO		Telefone: (11)3896-1406	Fax: (11)3896-1406	E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br
Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165		CEP: 01.246-900												
Bairro: Cerqueira César														
UF: SP	Município: SAO PAULO													
Telefone: (11)3896-1406	Fax: (11)3896-1406	E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br												
Página 01 de 05

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER

Continuação do Parecer: 1.569.194

estudados apresentam um perfil muito semelhante. Por outro lado, quando a produção de citocinas *in vitro* foi avaliada (produção de IL-4, IL-10, IL-2 e IFN- γ), os autores observaram que a produção de IFN- γ estava diminuída, ocorria mais tardiamente que a observada com as células de indivíduos saudáveis e a produção de IL-4 estava aumentada. Existem evidências de que algum parâmetro da imunidade celular de pacientes com criptococose deva estar alterado em relação ao indivíduo normal, fato que predisporia estes indivíduos à infecção oportunista pelo *C. neoformans*. Entretanto, os mecanismos subjacentes a esta aparente imunodeficiência antígeno-específica são ainda desconhecidos.

Hipótese:

A despeito da ausência de qualquer relato na literatura a respeito da regulação da resposta imunológica através da apoptose em doenças fúngicas, tal processo tem sido descrito como importante na regulação da resposta imunológica a antígenos próprios e, recentemente, em alguns distúrbios caracterizados por imunodeficiência. Dessa forma, a possibilidade dos fenômenos apoptóticos serem importantes nos distúrbios da resposta imune dos pacientes portadores de neurocriptococose pareceu-nos óbvia. No tocante às doenças fúngicas os únicos trabalhos encontrados referem-se à histoplasmose pulmonar murina. Nesses trabalhos encontraram-se evidências de seleção do repertório de V β nos diferentes períodos da infecção, sendo que as células T V β 4+ e V β 6+ foram preponderantes entre o 7o e o 14o dias de infecção, justamente o período crítico da doença. A depleção dessas células nos camundongos prejudicou sua capacidade de resolver a infecção. Assim, devido ao fato de haver um distúrbio na memória imunológica, parcialmente dependente de fenômenos apoptóticos sobre os linfócitos torna-se importante também avaliarmos se existe um desvio na seleção dos receptores idiotípicos das células T, que poderia também influir na capacidade de reconhecimento e efetuação da resposta imunológica dirigida ao fungo. Por haver um tipo de seleção do repertório desses receptores, que diferencia as células "naïve" das células de memória, este tipo de enfoque permite importante ampliação do conhecimento relativo a essa área, sendo de fundamental importância para o entendimento da doença, assim como da resposta imune específica ao fungo de indivíduos normais.

Metodologia Proposta:

Em amostras clínicas uma comparação rápida entre a expressão de regiões variáveis do TCR em células do local da lesão e de um compartimento não afetado do corpo pode ser o enfoque mais apropriado. Com essa finalidade, tanto a amplificação por PCR com primers específicos para as famílias de genes V quanto a coloração com anticorpos monoclonais específicos para as regiões variáveis da cadeia dos TCRs e avaliação por citometria de fluxo podem ser utilizadas. A citometria

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER

Continuação do Parecer: 1.569.194

de fluxo permite a determinação da utilização dos TCRs em cada célula individualmente, ao invés de uma extrapolação baseada na proporção dos transcritos de genes V do TCR amplificados do "pool" inteiro de células T. Utilizando-se citometria multiparamétrica, a quantificação da utilização das cadeias variáveis dos TCRs pode ser facilmente obtida em subtipos individuais de linfócitos T definidos pela expressão de diversos antígenos diferentes. Por exemplo, a análise por citometria de fluxo das cadeias variáveis dos TCRs pode ser combinada com a coloração de marcadores de ativação e do estado de "naïve" ou de memória central ou efetora, citocinas intracelulares e células apoptóticas, entre outras características.

Critério de Inclusão:

Os pacientes estudados consistirão de portadores de neurocriptococose que já vêm sendo selecionados no ambulatório de imunodeficiências primárias (ADEE-3033) do Departamento de Dermatologia, de pacientes advindos do Departamento de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP ou do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Será avaliado um grupo controle composto de indivíduos portadores de infecção persistente pelo HIV portadores de neurocriptococose. Tamanho da Amostra no Brasil: 60

Critério de Exclusão:

Esses pacientes serão avaliados quanto à existência de qualquer doença de base ou uso de medicação imunossupressora, que constituem critérios de exclusão.

Metodologia de Análise de Dados:

Parâmetros Imunológicos Celulares: ensaio de linfoproliferação, dosagem de citocinas e quimiocinas, caracterização de receptores de células T e determinação de subpopulações celulares e marcadores de ativação celular em linfócitos e monócitos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O presente estudo tem como objetivo avaliar pacientes com neurocriptococose quanto ao repertório de segmentos variáveis das cadeias beta dos receptores das células T dos pacientes no sangue periférico e no tecido alvo (líquido céfalo-raquidiano);

Objetivo Secundário:

Correlacionando o fenótipo das células responsivas, quanto ao estado de ativação (naïve ou de memória) (CD45 RA e CD45 RO, CD62L, CD25, CD69, CD38 e expressão de moléculas do CPH de classe II); Correlacionando com o padrão de resposta imunológica celular (T1, T2, T17 e Treg) por meio de marcadores de superfície; Correlacionando com a apoptose induzida pela ativação e com

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER

Continuação do Parecer: 1.589.194

a expressão de CD95 e de seu ligante; Comparar com células T de indivíduos normais, responsivos ao antígeno de *Criptococo*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Mínimos

Benefícios:

O voluntário não terá nenhum benefício adicional por participar deste protocolo, mas estará contribuindo enormemente para o melhor conhecimento dos fatores relacionados ao desenvolvimento da doença, que poderá trazer benefícios para si próprio e para outros pacientes com o mesmo tipo de doença futuramente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto pretende trazer melhor compreensão dos fatores relacionados à suscetibilidade a infecções graves e invasão do SNC pelos *Cryptococcus* spp, em pacientes portadores de neurocriptococose afastada qualquer doença de base ou uso de medicação imunossupressora.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta: o TCLE incluindo o "direito de confidencialidade; folha de rosto assinada pelo pesquisador e diretor da instituição proponente da pesquisa e o Termo de Anuência da instituição.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado, ver considerações abaixo.

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá entregar uma cópia do Parecer de Aprovação do CEP à Seção de Pesquisa e Trabalhos Científicos da Divisão Científica e aguardar o documento denominado "Autorização Para o Início do Estudo".

O pesquisador principal fica informado de apresentar a este CEP os relatórios parciais e o final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3896-1406 Fax: (11)3896-1406 E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.569.194

Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_P ROJETO_460204.pdf	14/03/2016 10:44:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_consentimento_livre_esclarecido_Neurocripto_atual.pdf	14/03/2016 10:44:05	Dewton de Moraes Vasconcelos	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_P ROJETO_460204.pdf	04/12/2015 10:43:27		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_P ROJETO_460204.pdf	17/09/2015 16:41:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_atualizado_neurocripto.docx	17/09/2015 16:41:00	Dewton de Moraes Vasconcelos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada_Criptococose.pdf	17/09/2015 16:33:22	Dewton de Moraes Vasconcelos	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_P ROJETO_460204.pdf	04/09/2015 15:50:05		Aceito
Outros	Registro_online_Neurocriptococose.pdf	04/09/2015 15:49:02	Dewton de Moraes Vasconcelos	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_P ROJETO_460204.pdf	22/06/2015 13:11:45		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto criptococo - clonotipagem.docx	29/01/2015 15:13:01		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 01 de Junho de 2016

Assinado por:
TÂMARA NEWMAN LOBATO SOUZA
(Coordenador)

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3896-1406 Fax: (11)3896-1406 E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

ANEXO I - Ficha clinica do paciente

Nome: _____	
Naturalidade: _____	Procedência: _____
Telefone _____	
Data de nascimento: ____/____/____	Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino
Idade: _____	Peso: _____ Kg Cor: ☐ Branco ☐ Negro ☐ Pardo ☐ Amarelo
Profissão: _____	
Escolaridade: _____	
Endereço: _____	Reside em: ☐ Zona Rural ☐ Zona Urbana
Tem ou teve exposição frequente com aves? ☐ Sim ☐ Não ☐ Sem informação	
Tipo de exposição: ☐ Pássaros ☐ Pombas ☐ Galinheiros	
Local e tempo de exposição: _____	
Tem contato com árvores de eucalipto? ☐ Sim ☐ Não ☐ Sem informação	
Local e tempo de exposição: _____	
Costuma fazer passeios em parques? ☐ Sim ☐ Não ☐ Sem informação	
Qual parque? _____	
Comorbidade? ☐ Sim ☐ Não ☐ Sem informação	
Qual (ais)? _____	
Usa regularmente alguma medicação? ☐ Sim ☐ Não ☐ Sem informação	
Qual medicação? _____	
Já teve alguma infecção por fungos? ☐ Sim ☐ Não ☐ Sem informação	
Qual? Tomou medicação anti fúngica? ☐ Sim ☐ Não ☐ Sem informação	
Qual? _____	
Data da Internação: ____/____/____	
Data da primeira coleta _____	
Levedura: Latex: _____	Tinta da China: ____
Quadro Clínico: _____	
Principais sintomas na internação (SNC):	
☐ cefaleia ☐ náuseas e vômito ☐ febre ☐ confusão mental	
☐ parestesia ☐ sonolência ☐ paresia ☐ disartria ☐ alteração de memória ☐ outros	

ANEXO J- Ficha do Aluno

04/05/2021	
Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação
Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina FICHA DO ALUNO
<hr/>	
5133 - 10074388/1 - Isabel Alves Feitosa Maciel	
Email:	biomed.isabelmaciel@usp.br
Data de Nascimento:	01/05/1963
Cédula de Identidade:	RG - 17.269.917-4 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Universidade Nove de Julho - São Paulo - Brasil - 2011
<hr/>	
Curso:	Doutorado Direto
Programa:	Medicina (Dermatologia)
Área:	Dermatologia
Data de Matrícula:	31/05/2016
Início da Contagem de Prazo:	31/05/2016
Data Limite para o Depósito:	26/05/2021
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Jose Antonio Sanches Junior - 31/05/2016 até 25/08/2016. Email: jasanches@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Dewton de Moraes Vasconcelos - 26/08/2016 até o presente. Email: dmvascon@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, 11/04/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 23/07/2018
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 31/05/2016
<hr/>	
Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).	
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/03/2021	
Impresso em: 04/05/2021 09:22:32	

04/05/2021

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
FICHA DO ALUNO

5133 - 10074388/1 - Isabel Alves Feitosa Maciel

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MDT5745-1/3	Micoses Sistêmicas Emergentes e Re-emergentes: Análise Crítica com Ênfase no Diagnóstico Laboratorial	22/08/2016	18/09/2016	60	4	100	A	N	Concluída
IMT5110-2/2	Princípios Básicos de Biologia Molecular Aplicada (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Universidade de São Paulo)	01/09/2016	05/10/2016	90	6	100	A	N	Concluída
MCM5874-3/2	Processos Inflamatórios e Alérgicos	17/10/2016	30/10/2016	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BMI5881-5/1	Regulação da Resposta Imune (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/03/2017	03/05/2017	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCG5825-5/1	Pedagogia Médica e Didática Especial	06/03/2017	07/05/2017	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
BMI5864-5/1	Morte Celular e o Sistema Imune (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/04/2017	30/04/2017	120	8	100	B	N	Concluída
MPR5765-1/4	Políticas e Sistemas de Saúde	11/04/2017	05/06/2017	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MIP5722-6/2	Pesquisa Bibliográfica Automatizada em Bases de Dados de Medicina Clínica e Especializada em Doenças Infecciosas e Parasitárias	30/10/2017	19/11/2017	45	3	100	A	N	Concluída
MPT5793-3/1	Citogenômica I	07/11/2017	01/01/2018	120	8	100	A	N	Concluída
MPE5750-2/1	Avaliação Clínico-laboratorial da Imunocompetência	05/06/2018	25/06/2018	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
VPS5717-7/3	Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	12/03/2019	25/03/2019	30	2	100	A	N	Concluída
ICB5709-7/1	Ensaio Pedagógico (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	12/03/2019	15/04/2019	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
PRI5021-2/3	Preparação Pedagógica (Instituto de Relações Internacionais - Universidade de São Paulo)	26/03/2019	27/05/2019	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese
Disciplinas:	12	24
Estágios:		
Total:	12	24

Créditos Atribuídos à Tese: 176

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/03/2021

Impresso em: 04/05/2021 09:22:32

ANEXO K- Cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Infectologia
 Laboratório de Micologia
 Coleção de Fungos Patogênicos

CFP/INI

GQ LAB - Garantia da Qualidade dos Laboratórios

TÍTULO	FORNECIMENTO DE LINHAGENS - CFP
--------	---------------------------------

CÓDIGO F MIC 28

PALAVRA CHAVE

FORMULÁRIO PARA EMISSÃO DE LINHAGENS FÚNGICAS – CFP / GUIA DE REMESSA

REVISÃO 01

Nº da Solicitação: 6 /2017

Nº do Envio: <u>6</u> /2017

DADOS SOBRE O SOLICITANTE

Nome completo do destinatário: Isabel Alves Feitosa Mariel
 Instituição de ensino/pesquisa: USP
 Endereço completo:
 Telefone :
 E-mail:

DADOS SOBRE A CEPA E CARACTERÍSTICAS GERAIS

Taxon	Registro CFP	Reg. outra coleção	Características
C. neoformans VNI	55	WM 148	VNI, SOROTIPO A
C. neoformans VNII	56	WM 626	VNII, SOROTIPO A
C. neoformans VNIII	57	WM 628	VNIII, SOROTIPO AD
C. neoformans VNIV	58	WM 629	VNIV, SOROTIPO D
C. gattii VGI	59	WM 179	VGI, SOROTIPO B
C. gattii VGII	60	WM 178	VGII, SOROTIPO B
C. gattii VGIII	61	WM 161	VGIII, SOROTIPO B
C. gattii VGIV	62	WM 779	VGIV, SOROTIPO C

Meio de cultivo recomendado: Sabouraud Dextrose 2%
 Temperatura e tempo de incubação: 25°C por 48h
 Nível de risco biológico: risco 2
 Forma de encaminhamento: ☒ Cultura em tubo ☐ Frasco-ampola
 Data da remessa: 15/12/2017
☐ Aérea ☒ Pessoa a pessoa ☐ Transportadora
 Preparado por: Mônica Elias
Recomendação: caso as cepas fornecidas venham a ser utilizadas em publicação devem ser mencionadas pelo registro CFP e indicada sua origem INI/FIOCRUZ.

Curador da CFP

Recebido por (ass.)
 Nome:
 Data: 15/12/2017

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wu B, Hussain M, Zhang W, Stadler M, Liu X, Xiang M. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*. 2019;10(3):127–40.
2. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):275–88.
3. Ashton PM, Thanh LT, Trieu PH, Van Anh D, Trinh NM, Beardsley J, et al. Three phylogenetic groups have driven the recent population expansion of *Cryptococcus neoformans*. *Nat Commun*. 2019;10(1):1–10.
4. Mukaremera L, Nielsen K. Adaptive Immunity to *Cryptococcus neoformans* Infections. *J Fungi*. 2017;3(4):64.
5. Pizani A et al. Criptococose Em Pacientes Hiv Positivos: Revisão Sistemática Da Literatura. *Rev Saúde UniToledo*. 2017;1(1):90–106.
6. Hou X, Kou L, Han X, Zhu R, Song L, Liu T. Pulmonary cryptococcosis characteristics in immunocompetent patients—A 20-year clinical retrospective analysis in China. *Mycoses*. 2019;62(10):937–44.
7. Montagna MT, De Donno A, Caggiano G, Serio F, De Giglio O, Bagordo F, et al. Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from environmental sources and genetic comparison with clinical isolates in Apulia, Italy. *Environ Res*. 2018;160:347–52.
8. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res*. 2006;6(4):574–87.
9. Freij JB, Freij BJ. The earliest account of human cryptococcosis (busse-buschke disease) in a woman with chronic osteomyelitis of the tibia. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(11):1278.
10. Grupo de Consenso de Criptococose. Consenso em criptococose - 2008. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(5):524–44.
11. Castellá G, Abarca ML, Cabañes FJ. Cryptococcosis and domestic animals. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25(1):S19–24.
12. Engelthaler DM, Malik R. Jet-Setting Koalas Spread. 2019;(May):1–14.
13. McGill S, Malik R, Saul N, Beetson S, Secombe C, Robertson I, et al. Cryptococcosis in domestic animals in Western Australia: A retrospective study from 1995-2006. *Med Mycol*. 2009;47(6):625–39.
14. Li SS, Mody CH. *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc*. 2010;7(3):186–96.
15. Zaragoza O, Rodrigues ML, Jesus M De, Frases S, Casadevall A, Micología S De, et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus Neoformans*. *Adv Appl Microbiol*. 2009;68(09):133–216.
16. Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20(3):507–44.
17. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL, et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil: Analysis o. 2003;41(1):73–7.

- 18.Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. J Bras Patol e Med Lab. 2004;40(5):293–8.
- 19.Original A. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga , MG – Brasil. Rev Med Gerais. 2011;21(1):19–24.
- 20.Perfect J, Dismukes W, Dromer F, Goldman D, Graybill J, Hamill R, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2010;50(3):291–322.
- 21.Galanis E, MacDougall L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. Emerg Infect Dis. 2010;16(2):251–7.
- 22.Araújo Júnior EC, Táparo C V., Uchida CY, Marinho M. *Cryptococcus*: Isolamento ambiental e caracterização bioquímica. Arq Bras Med Vet e Zootec. 2015;67(4):1003–8.
- 23.Ribeiro MF de P, Silva AM da, Fernandes WS, Mello MM de. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos (*Columba livia*) em praças públicas de São José dos Campos-SP. J Heal Sci Inst. 2017;35(1):23–30.
- 24.Chee HY, Kim YK. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var . *grubii* (serotype A) from Pigeon Drop- pings in Korea. Mycobiology. 2003;31(3):162–5.
- 25.Chen SCA, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* infections. Clin Microbiol Rev. 2014;27(4):980–1024.
- 26.Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(49):17258–63.
- 27.Price MS, Betancourt-Quiroz M, Price JL, Toffaletti DL, Vora H, Hu G, et al. *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. MBio. 2011;2(3):1–10.
- 28.Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL. *Cryptococcus* and phagocytes: Complex interactions that influence disease outcome. Front Microbiol. 2016;7:1–16.
- 29.Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2009;77(1):120–7.
- 30.Alvarez M, Casadevall A. Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. Curr Biol. 2006;16(21):2161–5.
- 31.Levitz SM. Innate Recognition of Fungal Cell Walls. PLoS Pathog. 2010;6(4):e1000758.
- 32.Dambuza IM, Drake T, Chapuis A, Zhou X, Correia J, Taylor-Smith L, et al. The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis. PLOS Pathog. 2018;14(5):e1006978.
- 33.Mukaremera L, Lee KK, Wagener J, Wiesner DL, Gow NAR, Nielsen K. Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. Cell Surf. 2018;1:15–24.
- 34.Yang C, Wang J, Zou L. Innate immune evasion strategies against Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans*. Exp Ther Med. 2017;(16):5243–50.

- 35.Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans. *Acta Biochim Pol.* 2009;56(2):211–24.
- 36.Liu TB, Perlin DS, Xue C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence.* 2012;3(2):173–81.
- 37.Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *Am J Pathol.* 2004;164(5):1761–71.
- 38.Santangelo R, Zoellner H, Sorrell T, Wilson C, Donald C, Djordjevic J, et al. Role of Extracellular Phospholipases and Mononuclear Phagocytes in Dissemination of Cryptococcosis in a Murine Model Role of Extracellular Phospholipases and Mononuclear Phagocytes in Dissemination of Cryptococcosis in a Murine Model. *Am Soc Microbiol.* 2004;72(4):2229–39.
- 39.Wake R, Govender NP. Cryptococcosis in apparently immune-competent patients: taxonomy, epidemiology, pathophysiology and treatment. *South African J Infect Dis.* 2016;31(2):32–4.
- 40.Campuzano A, Wormley FL. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination. *J fungi.* 2018;4(1):33.
- 41.Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol.* 2005;129(5):569–82.
- 42.Ellerbroek PM, Ulfman LH, Hoepelman AI, Coenjaerts FEJ. Cryptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium. *Cell Microbiol.* 2004;6(6):581–92.
- 43.Dong ZM, Murphy JW. Cryptococcal polysaccharides induce L-selectin shedding and tumor necrosis factor receptor loss from the surface of human neutrophils. *J Clin Invest.* 1996;97(3):689–98.
- 44.Ellerbroek PM, Lefeber DJ, van Veghel R, Scharringa J, Brouwer E, Gerwig GJ, et al. O -Acetylation of Cryptococcal Capsular Glucuronoxylomannan Is Essential for Interference with Neutrophil Migration . *J Immunol.* 2004;173(12) 7513-20.
- 45.Arora S, Olszewski MA, Tsang TM, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2011;79(5):1915–26.
- 46.Sorrell TC, Juillard PG, Djordjevic JT, Kaufman-Francis K, Dietmann A, Milonig A, et al. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: Evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. *Microbes Infect.* 2016;18(1):57–67.
- 47.Pietrella D, Perito S, Bistoni F, Vecchiarelli A. Cytotoxic T Lymphocyte Antigen Costimulation Influences T-Cell Activation in Response to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2001;69(3):1508–14.
- 48.Vecchiarelli A, Pietrella D, Lupo P, Bistoni F, McFadden DC, Casadevall A. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. *J Leukoc Biol.* 2003;74(3):370–8.
- 49.Huston SM, Li SS, Stack D, Timm-McCann M, Jones GJ, Islam A, et al. *Cryptococcus gattii* Is Killed by Dendritic Cells, but Evades Adaptive Immunity by Failing To Induce Dendritic Cell Maturation . *J Immunol.* 2013;191(1):249–61.

50.Chen G, McDonald R a, Wells JC, Huffnagle GB, Lukacs NW, Toews GB. The Gamma Interferon Receptor Is Required for the Protective Pulmonary Inflammatory Response to *Cryptococcus neoformans*. *Society*. 2005;73(3):1788–96.

51.Elsegeiny W, Marr KA, Williamson PR. Immunology of cryptococcal infections: Developing a rational approach to patient therapy. *Front Immunol*. 2018;9:651.

52.Muller U, Stenzel W, Kohler G, Werner C, Polte T, Hansen G, et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*. 2007;179(8):5367–77.

53.Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. Vol. 133, *Cell*. 2008. p. 775–87.

54.Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - A brief history and perspective. *Eur J Immunol*. 2007;37:116–23.

55.Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor α -Chains (CD25) Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases'. 1995,155 (3) 1151-1164.

56.Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701–11.

57.Shiromizu CM, Jancic CC. $\gamma\delta$ T lymphocytes: An effector cell in autoimmunity and infection. *Front Immunol*. 2018;9:1–8.

58.Mesquita Júnior D, Antônio Pereira Araújo J, Tieko Takao Catelan T, Wagner Silva de Souza A, de Melo Cruvinel W, Eduardo Coelho Andrade L, et al. Artigo de Revisão Sistema Imunitário-Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Vol. 50, *Rev Bras Reumatol*. 2010, Vol.50 (5)552-580.

59.Paul S, Singh AK, Shilpi, Lal G. Phenotypic and functional plasticity of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in inflammation and tolerance. *Int Rev Immunol*. 2014;33(6):537–58.

60.Goldman JD, Vollmer ME, Luks AM. Cryptococcosis in the Immunocompetent Patient. *Resiratory Care*. 2010;55(11):1499–503.

61.Garelnabi M, May RC. Variability in innate host immune responses to cryptococcosis. Vol. 113, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018,113(7):e180060.

62.Calarota SA, Baldanti F. Review Article Enumeration and Characterization of Human Memory T Cells by Enzyme-Linked Immunospot Assays. 2013; 637649.

63.Firacative C, Trilles L, Meyer W. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex. *PLoS One*. 2012;7(5)e37566.

64.Cavalcante SC, Freitas RS, Vidal MSM, Dantas KC, Levi JE, Martins JEC. Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(1):41–7.

65.Dykstra MA, Friedman L, Murphy JW. Capsule size of *Cryptococcus neoformans*: Control and relationship to virulence. *Infect Immun*. 1977;16(1):129-35.

- 66.Okabayashi K, Kano R, Watanabe S, Hasegawa A. Expression of capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 2005;160(1):1-7.
- 67.de Freitas RS. Phenotypic characterization of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates and antigenic standardization for histoplasmosis diagnosis. *Rev. Inst. Med. trop.* vol.47 (6) 2005.
- 68.Passos AN, Kohara VS, de Freitas RS, Vicentini AP. Immunological assays employed for the elucidation of an histoplasmosis outbreak in São Paulo, SP. *Braz J Microbiol*. 2015;45(4):1357-1361.
- 69.de Freitas RS, Kamikawa CM, Vicentini AP. Fast protocol for the production of *Histoplasma capsulatum* antigens for antibody detection in the immunodiagnosis of histoplasmosis. *Rev Iberoam Micol* 2018;35(1):27-31.
- 70.Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 15;227(5259):680-685.
- 71.Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Paniago AMM, Hahn RC, et al. Serology of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7) e2986.
- 72.Rocha KC, Pinhal C, Cavalcanti S, Sm Vidal M, Toscano M, Moraes-Vasconcelos D, et al. Lymphocyte transformation assay for *C. neoformans* antigen is not reliable for detecting cellular impairment in patients with Neurocryptococcosis. 2012;12-278.
- 73.Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708–12.
- 74.Lanzavecchia A, Sallusto F. Lead and follow: The dance of the dendritic cell and T cell. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1201–2.
- 75.Harari A, Vallelian F, Pantaleo G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur J Immunol*. 2004;34(12):3525–33.
- 76.Caserta S, Kleczkowska J, Mondino A, Zamoyska R. Reduced Functional Avidity Promotes Central and Effector Memory CD4 T Cell Responses to Tumor-Associated Antigens. *J Immunol*. 2010;185(11):6545–54.
- 77.McFadden D, Zaragoza O, Casadevall A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol*. 2006;14(11):497–505.
- 78.Levitz SM, Nong SH, Mansour MK, Huang C, Specht CA. Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T cell responses to *Cryptococcus neoformans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10422-7.
- 79.Kang X, Kirui A, Muszyński A, Widanage MCD, Chen A, Azadi P, et al. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–12.
- 80.Lipke PN, Ovalle R. Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *J Bacteriol*. 1998;180(15):3735–40.
- 81.Barreto-Bergter E, Figueiredo RT. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:1–17.
- 82.Erwig LP, Gow NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev*

Microbiol. 2016;14(3):163–76.

83. Levitz SM, Specht CA. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(4):513–24.

84. Murphy JW. Influence of cryptococcal antigens on cell-mediated immunity. *Rev Infect Dis.* 1988;432–5.

85. Huang C, Nong S, Mansour MK, Specht CA, Levitz SM. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-cell responses. *Infect Immun.* 2002;70(10):5485–93.

86. Bates S, MacCallum DM, Bertram G, Munro CA, Hughes HB, Buurman ET, et al. *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem.* 2005;280(24):23408–15.

87. Vartivarian SE, Reyes G H, Jacobson ES, James PG, Cherniak R, Mumaw VR, et al. Localization of Mannoprotein in *Cryptococcus neoformans*. Vol. 171, *Journal of Bacteriology*. McGuire Veterans Administration Medical Center; 1989;(12):6850–6852.

88. Leopold Wager CM, Hole CR, Campuzano A, Castro-Lopez N, Cai H, Caballero Van Dyke MC, et al. IFN- γ immune priming of macrophages in vivo induces prolonged STAT1 binding and protection against *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* 2018;14(10):1–27.

89. Wozniak KL, Levitz SM. Isolation and purification of antigenic components of *Cryptococcus*. *Methods Mol Biol.* 2009;470(10):71–83.

90. Vecchiarelli A, Retini C, Monari C, Tascini C, Bistoni F, Kozel TR. Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. *Infect Immun.* 1996;64(7):2846–9.

91. Kozel TR, Vecchiarelli A, Retini C, Pietrella D, Monari C, Tascini C, et al. Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes . Downregulation by Cryptococcal Polysaccharide of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1 Secretion from Human Mono. 1995;63(8):2919–23.

92. Walenkamp a M, Chaka WS, Verheul a F, Vaishnav V V, Cherniak R, Coenjaerts FE, et al. *Cryptococcus neoformans* and its cell wall components induce similar cytokine profiles in human peripheral blood mononuclear cells despite differences in structure. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;26(3–4):309–18.

93. Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, Saito A. IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol.* 1996;104(2):208–14.

94. Kawakami K, Qifeng X, Tohyama M, Qureshi MH, Saito A. Contribution of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) in host defence mechanism against *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(3):468–74.

95. Almeida GM, Andrade RM, Bento CAM. The Capsular Polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* Activate Normal CD4 + T Cells in a Dominant Th2 Pattern . *J Immunol.* 2001;167(10):5845–51.

96. Wager CML, Hole CR, Wozniak KL, Olszewski MA, Mueller M, Wormley FL. STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2015;83(12):4513–27.

97. Miller GPG, Puck J. In vitro human lymphocyte responses to *Cryptococcus neoformans*. Evidence for primary and secondary responses in normals and infected subjects. *J Immunol.*

1984;133(1):166-72.

98.Steenbergen JN, Casadevall A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) isolates in New York City. *J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1974–6.

99.Zhu LP, Wu JQ, Xu B, Ou XT, Zhang QQ, Weng XH. Cryptococcal meningitis in non-HIV-infected patients in a Chinese tertiary care hospital, 1997-2007. *Med Mycol.* 2010;48(4):570–9.

100.Suchitha S, Sheeladevi CS, Sunila R, Manjunath G V. Disseminated Cryptococcosis in an Immunocompetent Patient: A Case Report. *Case Rep Pathol.* 2012;2012:1–3.

101.Ruan Q, Zhu Y, Chen S, Zhu L, Zhang S, Zhang W. Disseminated cryptococcosis with recurrent multiple abscesses in an immunocompetent patient: A case report and literature review. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):4–9.

102.Ma H, May RC. Chapter 5 Virulence in *Cryptococcus* Species. Vol. 67, *Advances in Applied Microbiology.* 2009;67:131-90.

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

104.Wiesner DL, Smith KD, Kotov DI, Nielsen JN, Bohjanen PR, Nielsen K. Regulatory T Cell Induction and Retention in the Lungs Drives Suppression of Detrimental Type 2 Th Cells During Pulmonary Cryptococcal Infection. *J Immunol.* 2016;196(1):365–74.

105.Siqueira-Batista R, Gomes AP, Azevedo SFM, Vitorino RR, De Mendonça EG, De Sousa FO, et al. CD4+CD25+ T lymphocytes and regulation of the immune system: Perspectives for a pathophysiological understanding of sepsis. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2012;24(3):294–301.

106.Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25 +CD127-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 2009;35(4):678–86.

107.Di Mitri D, Azevedo RI, Henson SM, Libri V, Riddell NE, Macaulay R, et al. Reversible Senescence in Human CD4 + CD45RA + CD27 – Memory T Cells . *J Immunol.* 2011;187(5):2093-100.