

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E  
BIOAGENTES PATOGÊNICOS**

**Matheus Henrique dos Santos**

**Efeitos dos domínios *hinge*-transmembrana e transdução de sinal de  
GXMR-CAR na indução da ativação de células T e NK frente ao  
*Cryptococcus* spp.**

Ribeirão Preto

2022

Matheus Henrique dos Santos

**Efeitos dos domínios *hinge*-transmembrana e transdução de sinal de  
GXMR-CAR na indução da ativação de células T e NK frente ao  
*Cryptococcus* spp.**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

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

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Thiago Aparecido da Silva

Ribeirão Preto

2022

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

### FICHA CATALOGRÁFICA

dos Santos, Matheus Henrique

Efeito dos domínios *hinge*-transmembrana e transdução de sinal de GXMR-CAR na indução da ativação de células T e NK frente ao *Cryptococcus* spp. Ribeirão Preto, 2022.

104 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: da Silva, Thiago Aparecido.

1. Receptor quimérico antigênico 2. GXMR-CAR. 3. *Cryptococcus* spp. 4. Células T. 5. Células NK-92. 6. Infecções fúngicas invasivas.

Esta dissertação recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2020/09331-6 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo número 88887.510111/2020-00.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Matheus Henrique dos Santos**

Efeito dos domínios *hinge*-transmembrana e transdução de sinal de GXMR-CAR na indução da ativação de células T e NK frente ao *Cryptococcus* spp.

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

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Thiago Aparecido da Silva

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof(a) Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof(a) Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço aos meus pais, responsáveis por me darem condições para que eu pudesse trilhar meus próprios caminhos e sempre me incentivarem nas minhas escolhas acadêmicas e profissionais. À minha irmã Élica, pelo carinho e torcida e ao meu querido sobrinho Henrique, que os meus caminhos possam um dia servir de incentivo para você seguir os seus.*

*Ao meu orientador Dr. Thiago Aparecido da Silva, que me acompanhou durante esses dois anos e contribuiu de forma imprescindível com seus conhecimentos, incentivos, atenção e visão científica para minha trajetória como cientista em formação.*

*À “dona” Sandra Thomaz, um dos maiores exemplos de bondade, atenção e carinho que pude encontrar. Muito obrigado pela companhia, pelos cafés, conversas e lições de vida. Cruzar seu caminho com certeza me fez ser um ser humano melhor.*

*Ao suporte técnico da Érica, Sandra e Patrícia e a todo o Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia por fornecer as condições necessárias para auxiliar o desenvolvimento deste projeto.*

*Aos colegas de laboratório Gabriela, Patrícia, Michele, Júlia e Camily pela convivência agradável, troca de experiência e discussões científicas.*

*À minha segunda família em Ribeirão Preto, aquela que me acompanha desde a graduação, e agora, mesmo que nem todos estão presentes fisicamente, sei que sempre estaremos juntos nos incentivando e torcendo um pelo outro. Muito obrigado Loki, Hot, Queluz, Beck, Dhalsin, Soneca, Try, CVC, Inagaki, Pirenas e Barney.*

*À Jéssica, por me incentivar, apoiar e acreditar em mim em todos os momentos e por trazer paz com todo seu carinho, atenção e companheirismo.*

*À Natalia, por estar junto comigo em todas as decisões importantes que tomei nos últimos anos, por ser meu ombro amigo, minha conselheira, e por ser um dos meus maiores exemplos de pessoa por sua simplicidade, empatia e carinho. Ao Robson pela amizade,*

*companheirismo, conselhos e exemplo como profissional. Muito obrigado, meus antigos companheiros de laboratório.*

*Aos colegas e amigos de departamento, em especial à Mariana, por toda sua preocupação e companheirismo e ao pessoal da comissão de organização do curso de verão da Biocel, Letícia, Raquel, Marlon, Gustavo, João e Isabela.*

*A todos os funcionários do Departamento de Biologia Celular por sempre se fazerem presentes e auxiliarem no que fosse preciso.*

*À FAPESP pelo auxílio financeiro (processo número: 2020/09331-6) e à CAPES, processo número 88887.510111/2020-00.*

*Ao ensino superior público e à Universidade de São Paulo, por me permitirem acesso ao ensino e pesquisa de qualidade e contribuírem para minha formação como cidadão e pesquisador.*

*A todos que direta ou indiretamente participaram e contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigado.*

## RESUMO

dos Santos, M A. **Efeitos dos domínios *hinge*-transmembrana e transdução de sinal de GXMR-CAR na indução da ativação de células T e NK frente ao *Cryptococcus* spp.** 2022. 104 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) representam um sério problema de saúde pública. Dentre as doenças negligenciadas, as IFIs apresentam taxas de mortalidade em patamares semelhantes aos ocasionados pela malária ou tuberculose. A criptococose, manifestação da infecção causada por *Cryptococcus* spp., é responsável por cerca de 180.000 mortes anuais globalmente. O comprometimento do sistema imune é o maior fator de risco para o estabelecimento da infecção, e as espécies *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* são as de maior relevância clínica, podendo acometer tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes. Esses patógenos apresentam um diverso arsenal de fatores de virulência e mecanismos de escape/subversão da resposta imunológica do hospedeiro, seja impedindo ou sobrevivendo à fagocitose, ou comprometendo a diferenciação e atuação de subtipos de células T importantes no controle da infecção. Para contornar esse processo, a presente dissertação avaliou o redirecionamento de células T e natural killer (NK) para o reconhecimento de *Cryptococcus* spp. via interação com o polissacarídeo glucuronoxilomanana (GXM) presente na cápsula desse patógeno. Para isso, o receptor antigênico quimérico (CAR) com capacidade de reconhecer GXM, denominado GXMR-CAR, foi expresso em células T e NK através da transdução com partículas lentivirais. O redirecionamento e efeitos funcionais desencadeado por diferentes GXMR-CAR foi avaliado frente a *Cryptococcus* spp., sendo considerado os receptores caracterizados pelas seguintes diferenças estruturais: porções *hinge*-transmembrana, com IgG4-*hinge* e CD28-transmembrana, GXMR-IgG4-28 $\zeta$ ; *hinge*-transmembrana contendo CD8 $\alpha$  acoplado com domínio de transdução de sinal 4-1BB ou CD28, GXMR-8-BB $\zeta$  e GXMR-8-28 $\zeta$ , respectivamente. Células Jurkat foram adotadas como plataforma de expressão de GXMR-CAR e de avaliação frente a *C. gattii* R265, *C. neoformans* H99 ou isolados clínicos. Células da linhagem NK-92 foram consideradas na expressão de GXMR-CAR para avaliar o controle da infecção *in vitro* por *Cryptococcus* spp. A modificação de células Jurkat com GXMR-CAR demonstrou uma maior expressão dos construtos contendo CD8 $\alpha$  como *hinge*-transmembrana. A expressão de GXMR-8-BB $\zeta$  ou GXMR-8-28 $\zeta$  propiciou melhor taxa de expansão celular comparado com as células expressando GXMR-IgG4-28 $\zeta$ . A modificação com GXMR-CAR contendo CD8 $\alpha$  como *hinge*/transmembrana induziu a sinalização tônica em células Jurkat, e a molécula co-estimulatória 4-1BB desencadeou os maiores níveis de produção de IL-2 em comparação com CD28. Mesmo na presença da sinalização tônica, GXMR-8-BB $\zeta$  ou GXMR-8-28 $\zeta$  induziram um aumento significativo nos níveis de IL-2 após a incubação com GXM solúvel ou leveduras inativadas de *Cryptococcus* spp, enquanto a expressão de GXMR-IgG4-28 $\zeta$  não induziu a ativação das células. A inibição da via de sinalização do GXMR-CAR com o fármaco dasatinibe, inibidor de tirosina quinases da família Src, atenuou a sinalização tônica mediada por GXMR-8-137z e GXMR-8-28z. Além disso, as células modificadas com GXMR-CAR tiveram redução da taxa proliferativa após a incubação com as leveduras inativadas, fato atenuada com a adição de dasatinibe no cultivo celular. Em complemento, células Jurkat transduzidas com GXMR-8-BB $\zeta$  ou GXMR-8-28 $\zeta$  são capazes de reconhecerem diferentes sorotipos de *C. gattii* e *C. neoformans* derivados de isolados clínicos, e isso resultou na ativação celular. A expressão dos diferentes GXMR-CAR na linhagem celular NK-92 demonstrou maiores taxas de expressão dos construtos



contendo CD8a como *hinge*-transmembrana, com a frequência de células modificadas com GXMR-CAR se mantendo relativamente estável por prolongados períodos de cultivo. A atividade fungicida das células NK-92 modificadas com GXMR-8-BBζ foi avaliada frente ao *Cryptococcus* spp., e o co-cultivo das células com as leveduras resultou na produção de elevados níveis de INF-γ, além disso, a expressão de GXMR-8-BBζ medeia a sinalização tônica de células NK-92. Essas células foram capazes de aumentarem a susceptibilidade de *Cryptococcus* spp. frente a anfotericina B, enquanto o efeito fungicida e fungistático não foi alcançado. Em conclusão, a caracterização de distintos construtos de GXMR-CAR frente ao ligante, em diferentes tipos celulares, elencou os domínios de GXMR-CAR que resultaram em melhor funcionalidade do receptor na presença de *Cryptococcus* spp.

Palavras chave: Receptor antigênico quimérico, GXMR-CAR, *Cryptococcus* spp., células T, células NK-92, infecções fúngicas invasivas

**ABSTRACT**

dos Santos, M A. **Effect of hinge-transmembrane and signal transduction domains of GXMR-CAR specific to *Cryptococcus* spp. in T and NK cell activation.** 2022. xx p.

Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

Invasive fungal infections (IFIs) represent a great challenge to public health. Among neglected diseases, IFIs are responsible to cause as many deaths as malaria or tuberculosis. The clinical manifestation of *Cryptococcus* spp. infection is the cryptococcosis, and is responsible to cause around 180.000 deaths annually. The main risk factor to the development of cryptococcosis is the impairment of immune system, and the species *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* represent greater clinical relevance, accountable for cause disease whether in immunocompromised or immunocompetent individuals. These pathogens display a diverse arsenal of virulence factors and physiological mechanisms that allow evasion from the host immune response, evading phagocytosis and modulating the T cell differentiation. To overcome these characteristic of *Cryptococcus* spp, this work evaluated the redirection of T cells and natural killer cells (NK) to recognize *Cryptococcus* spp. through the interaction with the polysaccharide glucuronoxilomanana (GXM) in the *Cryptococcus* capsule. For this, the chimeric antigen receptor (CAR) specific for this structure, GXMR-CAR, was expressed in T and NK cells modified with lentiviral transduction. Different constructs of GXMR-CAR were considered to evaluate the functional properties against yeasts of *Cryptococcus* spp., and it is based in the following structural modifications: the IgG4 as hinge and CD28 as transmembrane compose the construct GXMR-IgG4-28 $\zeta$ ; CD8 $\alpha$  as hinge-transmembrane is present in the GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$ ; the co-stimulatory molecule is represented by 4-1BB (GXMR-8-BB $\zeta$ ) or CD28 (GXMR-IgG4-28 $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$ ). Jurkat cells were considered as expression platform to evaluate GXMR-CAR against the reference species *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99 or clinical isolates of *Cryptococcus* spp. The cell lineage NK-92 was used to perform *in vitro* studies evaluating the control of *Cryptococcus* spp. infection. The GXMR-CAR carrying CD8 $\alpha$  as hinge-transmembrane demonstrated greater expression in Jurkat cells and the cells modified with GXMR-8-BB $\zeta$  or GXMR-8-28 $\zeta$  showed greater cell proliferation compared with GXMR-IgG4-28 $\zeta$  during culture. Jurkat cells expressing GXMR-CAR with CD8 $\alpha$  demonstrated tonic signaling, and the co-stimulatory molecule 4-1BB was responsible to induce more levels of IL-2 compared with CD28. Besides the tonic signaling, the IL-2 production by the cells modified with GXMR-8-BB $\zeta$  or GXMR-8-28 $\zeta$  was increased upon incubation with soluble GXM or inactivated yeast of *Cryptococcus* spp, whereas the Jurkat cells expressing GXMR-IgG4-28 $\zeta$  did not trigger cell activation. When the GXMR-CAR signaling cascade is inhibited by the use of dasatinib, a Src tyrosine kinase inhibitor, the tonic signaling is attenuated. Moreover, the cell activation induced by interaction of GXMR-CAR and yeast is also attenuated by dasatinib and the proliferation of the cells treated is ameliorated when in presence of yeast. In addition, Jurkat cells modified with GXMR-8-BB $\zeta$  or GXMR-8-28 $\zeta$  are able to recognize different clinical isolates serotypes of *C. gattii* and *C. neoformans*, resulting in cell activation. The expression of GXMR-CAR in NK-92 cells demonstrated greater rates of expression of the CD8 $\alpha$ -containing constructs, and the modified population remained stable for longer periods of culture. The fungicide capacity of NK-92 expressing GXMR-8-BB $\zeta$  was

evaluated against viable yeasts of *Cryptococcus* spp. The co-culture of cells and yeast resulted in NK activation, with increasing in INF- $\gamma$  production, and we verified that GXMR-8-BB $\zeta$  mediated tonic signaling in this cell line. The modified cells were able to increase the susceptibility of *Cryptococcus* spp. to amphotericin B, whereas the fungicide and fungistatic effect were not observed. In conclusion, the functional characterization of distinct GXMR-CAR in different cell lines and against a set of ligands, indicated the importance of CAR domains that resulted in the best options of GXMR-CAR against *Cryptococcus* spp.

**Key words:** Chimeric antigen receptor, GXMR-CAR, *Cryptococcus* spp., T cells, NK-92 cells, invasive fungal infections.

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Histórico da descrição de <i>Cryptococcus</i> spp. e criptococose</b>	15
<b>1.2 Ecologia, transmissão e epidemiologia de <i>Cryptococcus</i> spp.</b>	17
<b>1.3 Patogênese da criptococose</b>	19
1.3.1 <i>Adaptação ao hospedeiro</i>	19
1.3.2 <i>Capsula polissacarídica, o principal fator de virulência de <i>Cryptococcus</i> spp.</i>	21
1.3.3 <i>Outros fatores de virulência</i>	22
<b>1.4 Resposta imune do hospedeiro e mecanismos de evasão de <i>Cryptococcus</i> spp.</b>	23
1.4.1 <i>Reconhecimento pelo sistema imune inato</i>	23
1.4.2 <i>Evasão do sistema imune inato</i>	24
1.4.3 <i>Resposta imune adaptativa</i>	26
1.4.4 <i>Subversão da resposta imune adaptativa</i>	28
<b>1.5 Tratamentos convencionais contra a infecção por <i>Cryptococcus</i> spp.</b>	29
<b>1.6 Estratégias promissoras no controle da criptococose</b>	30
1.6.1 <i>Anticorpos monoclonais</i>	31
1.6.2 <i>Terapia celular adotiva</i>	32
1.6.3 <i>Terapia com células CAR-T</i>	34
1.6.3.1 <i>Região de reconhecimento de antígeno</i>	35
1.6.3.2 <i>Região “hinge” ou espaçadora</i>	36
1.6.3.3 <i>Região transmembrana</i>	38
1.6.3.4 <i>Região intracelular de transdução de sinal</i>	38
1.6.3.5 <i>Futuras gerações do CAR</i>	41
1.6.3.6 <i>CAR no contexto de infecções fúngicas invasivas</i>	42

---

<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	45
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	45
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	45
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS/RESULTADOS</b> .....	47
<b>3.1</b>	<b>Capítulo I</b>	47
<b>3.2</b>	<b>Capítulo II</b>	58
<b>3.3</b>	<b>Capítulo III: Células GXMR-NK-CAR – Materiais e Métodos</b>	76
3.3.1	Células NK-92	76
3.3.2	Geração de células GXMR-NK-CAR	76
3.3.3	Ensaio de ativação de células GXMR-NK-CAR frente a <i>Cryptococcus</i> spp.	77
3.3.4	Ensaio <i>in vitro</i> dos efeitos fungicida e fungistático de células GXMR-NK-CAR	77
<b>3.4</b>	<b>Capítulo III: Células GXMR-NK-CAR – Resultados e Discussão</b>	78
3.4.1	GXMR-CAR contendo CD8 $\alpha$ como <i>hinge</i> /transmembrana tem maior expressão em células NK-92 comparado com GXMR-IgG4-28 $\zeta$	78
3.4.2	Células NK-92 expressando GXMR-8-BB $\zeta$ são ativadas frente à <i>Cryptococcus</i> spp., porém não controlam o crescimento fúngico	80
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	87
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	88

Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

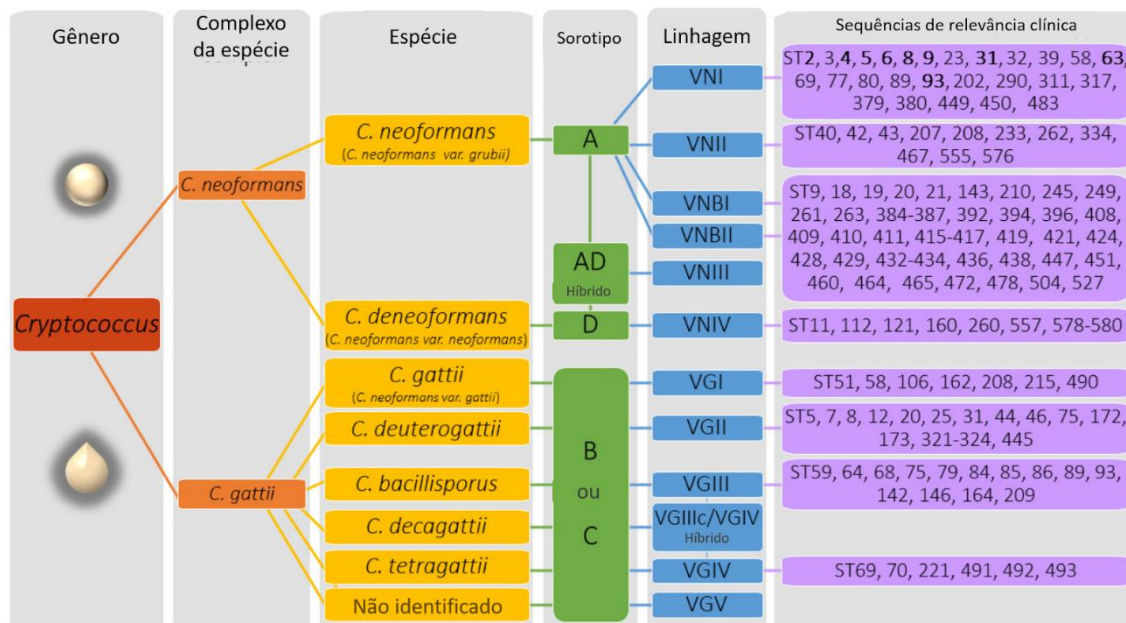
### 1.1 Histórico da descrição de *Cryptococcus* spp. e criptococose

O primeiro relato acerca de fungos do gênero *Cryptococcus* ocorreu em 1894 a partir do isolamento de microrganismos do suco de pêra, realizado por Sanfelice, que nomeou os organismos encontrados como *Saccharomyces neoformans* (SANFELICE, 1984). Ainda em 1894, Otto Busse e Abraham Buschke, a partir de amostras colhidas de uma lesão semelhante a um sarcoma na tíbia de uma paciente, isolaram e realizaram a descrição das leveduras encontradas, também as classificando dentro do gênero *Saccharomyces* (BUSSE e BUSCHKE, 1984). Posteriormente, Curtis apontou diferenças entre as leveduras isoladas por Sanfelice e aquelas descritas por Otto Busse e Abraham Buschke, das amostras nas quais vinha estudando, classificando-as como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*, sendo, posteriormente, esse o primeiro isolamento clínico de *C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2015). Esses isolados descritos por Sanfelice, Busse e Buschke, foram, posteriormente reclassificados como *Cryptococcus hominis* e *Cryptococcus neoformans*, pois a incapacidade de realizar a fermentação de carboidratos e formar ascósporos impediram a manutenção desses fungos no gênero *Saccharomyces* (MITCHELL; PERFECT, 1995). Na segunda década do século XX, Versé e, posteriormente, Stoddard e Cutler identificaram a presença de *C. neoformans* na meninge humana, contudo, esses últimos autores classificaram o agente etiológico como *Torula histolytica*, sendo causador da doença que denominaram “torulose”, classificação essa baseada na interpretação errônea de que a cápsula dessas leveduras seriam áreas de lise celular (MITCHELL; PERFECT, 1995). A partir dos estudos realizados por Rhoda Benham, tendo isolados clínicos como amostra, que se demonstrou que as infecções humanas causadas por *Cryptococcus* apresentavam correspondência com uma única espécie, porém com diferentes cepas sorológicas (BENHAM, 1935). Na década de 1950, Benham propôs a mudança do termo “torulose” para “criptococose” e a manutenção da denominação da levedura como *C. neoformans*, assim se iniciou um consenso para a terminologia dessa espécie (BENHAM, 1950). Ainda na década de 1950, Evans reforçou a heterogeneidade de *Cryptococcus neoformans* ao identificar três sorotipos (A, B e C) (EVANS, 1950); um quarto sorotipo foi identificado em 1968 e classificado como “D” (WILSON; BENNETT; BAILEY, 1968). Nessa década, o nicho ambiental de *C. neoformans* foi identificado devido a sua presença em amostras de solo, ninhos e excretas de pombos (EMMONS, 1951, 1955). Os primeiros relatos de criptococose no Brasil

ocorreram nos anos de 1941 e 1944, pelos pesquisadores Dr. Carlos da Silva Lacaz e Dr. Floriano de Almeida, respectivamente (PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

A criptococose causada pelas espécies do gênero *Cryptococcus* foi considerada uma doença extremamente rara até a década de 1970, contudo, com o surgimento e o uso de drogas imunossupressoras, associado ao aparecimento da epidemia de AIDS no início dos anos 1980, houve um aumento sem precedentes na incidência da criptococose. Esses acontecimentos evidenciaram o comprometimento no sistema imunitário como o maior fator de risco no desenvolvimento da criptococose, sendo por esse motivo sua classificação entre as infecções fúngicas oportunistas. Desde a classificação proposta por Benham, que categoriza apenas *C. neoformans* e suas variantes como causadoras da criptococose, o constante avanço em técnicas moleculares levaram a classificação de novas espécies e variantes de *Cryptococcus* que possuem a capacidade de afetar tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes. Atualmente, o grupo heterogêneo do gênero *Cryptococcus* inclui mais de 70 espécies, sendo apenas algumas de importância clínica (KWON-CHUNG et al., 2014). De forma simplificada, a divisão somente entre *C. neoformans* e *C. gattii* é adotada para designar as duas principais espécies como os agentes etiológicos responsáveis por causarem a criptococose humana. Baseado na taxonomia molecular, a partir do sequenciamento do genoma e análise de fatores de virulência, o gênero *Cryptococcus* de relevância clínica pode ser classificado conforme o complexo de espécie, espécie, sorotipo, linhagem e tipo de sequência de importância clínica, como ilustrado na figura 1 (MONTROYA; MAGWENE; PERFECT, 2021).





**Figura 1. Classificação das espécies de fungos do gênero *Cryptococcus*.** Categorização ilustrativa das principais espécies de *Cryptococcus* e suas respectivas cepas com importância clínica tendo as seguintes subdivisões: gênero, complexo de espécie, espécies, sorotipo, linhagem e sequências de relevância clínica. Adaptado de (MONTROYA; MAGWENE; PERFECT, 2021).

## 1.2 Ecologia, transmissão e epidemiologia de *Cryptococcus* spp.

Os fungos do gênero *Cryptococcus* são organismos saprófitos e no ambiente são encontrados em uma grande variedade de nichos ecológicos. *C. neoformans* e *C. gattii* são encontrados de forma abundante em matéria orgânica em decomposição, no solo e buracos em árvores (BOULWARE, 2011). Há diversas espécies arbóreas distribuídas globalmente que atuam como reservatórios para *C. neoformans* e *C. gattii*, indicando a capacidade desses microrganismos em se adaptar a diferentes nichos e, por consequência, se distribuírem por diversas partes do globo (BOULWARE, 2011). Existe uma estreita relação entre a presença de leveduras de *Cryptococcus* spp. em localidades com alta frequência da circulação de pombos, sendo particularmente *C. neoformans* a espécie predominante nas excretas dessas aves, e, por esse motivo, essas aves são importantes reservatórios e facilitadores da disseminação de *Cryptococcus* spp em centros urbanos (CHOWDHARY et al., 2012). Outra característica ecológica importante do gênero *Cryptococcus* é sua interação com outros organismos do solo, como amebas, nematóides e outros vermes, sendo relatado a capacidade desse fungo de sobreviver e se multiplicar dentro desses organismos invertebrados. A interação de *Cryptococcus* spp. com esses hospedeiros “alternativos” gerou uma forte pressão seletiva sobre fatores de virulência do

fungo que, indiretamente, viabilizaram a sua sobrevivência em humanos, caracterizando esses organismos como um caso de sucesso como patógeno intracelular facultativo (MAY et al., 2016). Por exemplo, *C. neoformans* sobrevive no espaço intracelular de amebas utilizando mecanismos de subversão que também o permite sobreviver no interior de células fagocíticas humanas. (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

A principal via de entrada de *Cryptococcus* spp. em humanos ocorre via inalação de propágulos dissecados ou basidiósporos. Uma vez nas vias aéreas superiores, os propágulos, devido ao pequeno tamanho (1.5-3.5 µm), atingem o espaço alveolar, e esse ambiente úmido cria condições favoráveis para o crescimento e multiplicação das leveduras (SPRINGER et al., 2013; KWON-CHUNG et al., 2015). Ainda no espaço alveolar, leveduras de *Cryptococcus* spp. se deparam com elementos da resposta imune inata do hospedeiro, principalmente macrófagos alveolares, neutrófilos e células dendríticas com elevado potencial de realizar a fagocitose e eliminação das leveduras. Além disso, os fagócitos profissionais presentes no tecido pulmonar auxiliam na montagem de uma resposta imune adaptativa através da indução da diferenciação de linfócitos T CD4+ e CD8+ em subtipos efetores no combate de infecções fúngicas. Em paralelo com essa resposta imune celular, o tecido pulmonar é coberto por um muco surfactante que contém componentes microbicidas. Em meio a este complexo microambiente, a sobrevivência das leveduras de *Cryptococcus* se baseia na adaptação ao ambiente do hospedeiro, desenvolvimento de mecanismos de subversão da resposta imune e produção de fatores de virulência (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018).

Evidências sorológicas indicam que a infecção por *Cryptococcus* spp., em grande parte dos indivíduos, ocorre já na infância, porém a manifestação da criptococose é rara (GOLDMAN et al., 2001). Indivíduos que apresentam algum quadro de deficiência no sistema imunológico têm maior disposição ao desenvolvimento da criptococose, sendo aqueles portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) associado com a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) os que apresentam maior risco no desenvolvimento da criptococose. É estimado que cerca de 15% dos pacientes HIV/aids positivos sejam infectados por *Cryptococcus* spp. de forma oportunista e desenvolvem a criptococose (RAJASINGHAM et al., 2017). A principal complicação clínica derivada da criptococose é a meningoencefalite, responsável por, aproximadamente, 180.000 mortes anuais (RAJASINGHAM et al., 2017). A prevalência de infecções por *Cryptococcus* spp. são especialmente altas em países pobres e/ou com sistemas de saúde

precários. Na África subsaariana se concentra o maior número de casos de meningite criptocócica, enquanto a América Latina é apontada como a terceira região com maior número de casos globalmente (RAJASINGHAM et al., 2017). No Brasil, a taxa de mortalidade reportada está em torno de 45 a 65%, considerada alta e motivo de muita preocupação (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Em uma recente revisão sobre os dados epidemiológicos de criptococose no cenário nacional referente ao período de 2000 a 2012, constatou-se uma taxa de 20% de mortalidade entre indivíduos que não apresentavam aids (ALVES SOARES et al., 2019). O número de mortes causados pela infecção por *Cryptococcus* spp. globalmente é semelhante aos causados por doenças como malária e tuberculose, porém, o investimento recebido para pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos representa apenas uma fração mínima comparado com outras doenças negligenciadas (RODRIGUES, 2018). Outras condições que facilitam o acometimento de indivíduos pela criptococose estão o longo tratamento com corticoides, o transplante de órgãos, diabetes, presença de tumores com alto grau de desenvolvimento e linfocitopenia idiopática de células CD4 (KWON-CHUNG et al., 2015). Apesar da grande maioria dos pacientes com criptococose sofrer algum grau de imunossupressão, *C. neoformans* e *C. gattii* têm a capacidade de causar a criptococose em indivíduos imunocompetentes, com destaque para os casos de infecção por *C. gattii* que afetam significativamente um maior número de indivíduos saudáveis em comparação com *C. neoformans* (CHEN et al., 2000; BOULWARE, 2011).

### **1.3 Patogênese da criptococose**

#### *1.3.1 Adaptação ao hospedeiro*

O cultivo das leveduras de *Cryptococcus* spp. em condições laboratoriais resulta em células leveduriforme com diâmetro entre 4 a 7  $\mu\text{m}$ , porém a taxa de crescimento, morfologia e estrutura das leveduras podem ser alteradas drasticamente no sítio de infecção (FELDMESSER; KRESS; CASADEVALL, 2001; OKAGAKI et al., 2010). A alteração morfológica com maior efeito na patogenicidade de *Cryptococcus* spp. se refere à formação das células titans e ocorre principalmente devido à exposição das leveduras ao microambiente de infecção no hospedeiro (ZARAGOZA; NIELSEN, 2013). Essa categoria de células se tornam poliploides e apresentam um diâmetro que pode atingir impressionantes 100  $\mu\text{m}$ , além de ocorrer um aumento marcante na espessura da cápsula polissacarídica (ZARAGOZA; NIELSEN, 2013). O aumento do tamanho das leveduras

de *Cryptococcus* spp. e o maior espessamento da cápsula são fatores que impedem a atividade fagocítica e, de maneira interessante, a poliploidia das células titans é responsável pela maior resistência genética em resposta aos fatores de estresse induzidos pela resposta imunitária do hospedeiro, o que resulta na persistência da infecção por longos períodos e a disseminação para outros tecidos (ZARAGOZA et al., 2010; OKAGAKI; NIELSEN, 2012; GERSTEIN et al., 2015). Fatores como a temperatura, pH e obtenção de nutrientes essenciais são outros fatores adversos para as leveduras de *Cryptococcus* quando expostas aos diferentes microambientes no hospedeiro. Em condições ambientais, espécies fúngicas geralmente não toleram altas temperaturas, como as temperaturas fisiológicas encontradas em humanos, e em vista disso, *Cryptococcus* spp. apresentam uma série de adaptações metabólicas e ativação de vias de sinalização celular que culminam na resistência a essas condições. Sob efeitos de alteração de temperatura, as leveduras de *Cryptococcus* dispõem de alguns mecanismos reguladores, como: o aumento da produção e acúmulo do dissacarídeo trealose, que protege proteínas e membranas do aumento de temperatura (PETZOLD et al., 2006); a resposta mitocondrial contra agentes antioxidantes se mostra funcional ao crescimento em altas temperaturas (GILES et al., 2005); ativação de vias específicas de MAP (*mitogen activated protein*)-quinases envolvidas na manutenção da integridade da parede celular frente ao aumento de temperatura (KRAUS et al., 2003). Em relação ao efeito adverso da variação de pH, *Cryptococcus* spp. apresentam um mecanismo adaptativo através da via de produção da proteína Rim1, envolvida na resposta ao ambiente com pH neutro, como no espaço alveolar, ou pH alcalino, enquanto a cápsula polissacarídica confere resistência a pH ácido (OST et al., 2015; SHOURIAN; QURESHI, 2019).

Outro fator importante na sobrevivência das leveduras de *Cryptococcus* spp. durante a infecção é a obtenção de nutrientes, com destaque para o íon ferro, que participa de diversas reações metabólicas e também na produção de fatores de virulência (KRONSTAD; HU; JUNG, 2013). *C. neoformans* contém diversas proteínas capazes de obterem íons ferro a partir de tecidos e fluídos, como ferro permeases, ferroxidases e proteínas quelantes, como a Cig1 (ZARAGOZA, 2019). Estudos recentes sugerem que *Cryptococcus* spp. também apresentam uma característica comumente encontrada em infecções bacterianas, denominado de *quorum sensing* (detecção de quórum), responsável por modular a virulência de acordo com a densidade populacional através da comunicação parácrina. Essa modulação da virulência permite que uma determinada população de

leveduras, mais susceptível aos efeitos fungicidas oriundos do hospedeiro, se comunique, através da produção de moléculas específicas, com outras populações sob baixo efeito fungicida, gerando uma cooperação entre populações e induzindo a regulação gênica e expressão de fatores de virulência, que por fim pode levar a uma rápida progressão da população no sítio da infecção e consequente disseminação para outros tecidos. Uma série de moléculas e receptores foram descritos como mediadores modulatórios do tamanho das leveduras, taxa de crescimento e expressão de moléculas de adesão e fatores de virulência, todos de importância na patogenicidade de *Cryptococcus* spp. (LEE et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2013).

### 1.3.2 *Capsula polissacarídica, o principal fator de virulência de Cryptococcus spp.*

A mais relevante característica clínica presente em fungos do gênero *Cryptococcus* é a presença de uma cápsula polissacarídica e é considerado como o principal fator de virulência desse gênero de fungos (MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2006). Essa estrutura é majoritariamente composta pelo polissacarídeo glucuronoxilomanana (GXM), correspondendo a cerca de 90% de toda sua composição, sendo formada por uma cadeia linear de mananas, com ligações  $\alpha(1,3)$ , que é ramificada por resíduos de xilose, através de ligações  $\beta(1,2)$  e  $\beta(1,4)$ , e também por resíduos de ácido glucurônico, ligações  $\beta(1,2)$ , além de o carbono seis da cadeia linear poder ser O-acetilado (CHERNIAK et al., 1980; MERRIFIELD; STEPHEN, 1980; KOZEL et al., 2003). A variação na ramificação da cadeia linear de GXM cria modificações estruturais, que originam diferenças antigênicas utilizadas na classificação sorológica de diferentes cepas, refletindo a relevância estrutural de GXM na identificação de epítomos específicos (BELAY et al., 1997). Há dois outros componentes principais na cápsula polissacarídica, presentes em menor quantidade, representados pela galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (CASADEVALL et al., 2019).

A presença da cápsula polissacarídica não é vital para a sobrevivência das leveduras, já que algumas cepas mutantes para a formação da cápsula são cultivadas *in vitro*, porém, a virulência é drasticamente perdida (CHANG; KWON-CHUNG, 1994). O encapsulamento confere resistência às leveduras contra células fagocíticas devido a cápsula mascarar os principais epítomos reconhecidos por essas células, que se encontram na parede celular (KOZEL; MASTROIANNI, 1976; KOZEL; GOTSCHLICH, 1982). Além disso, a capacidade de modular a espessura da cápsula confere maior resistência a

radicais oxidativos e eventos de desidratação para as leveduras (O et al., 2008), sendo, nesses casos, as cepas consideradas como hiper virulentas (WILDER et al., 2002). Além de representar o maior constituinte dentre os componentes da cápsula, o GXM também é secretado por *Cryptococcus* spp. A alta concentração de GXM no soro de pacientes e a ausência de infiltração de células da imunidade nos sítios de infecção são características marcantes da disseminação da infecção por *Cryptococcus* spp. (DONG; MURPHY, 1996). Essa condição ocorre devido a capacidade do GXM afetar diretamente diversos mecanismos da resposta imune ao atuar na atividade de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Por exemplo, GXM tem propriedade quimioatraente sobre neutrófilos, impedindo a migração da célula imune para o tecido ao induzir uma baixa expressão de moléculas de adesão, como L-selectinas e E-caderinas, além de também promover uma diminuição da expressão de TNF- $\alpha$  por células da imunidade inata (ZHAO MING DONG; MURPHY, 1993; DONG; MURPHY, 1996). Após a estimulação com GXM, macrófagos podem ser direcionados à apoptose via aumento na expressão de Fas e posterior interação com o ligante de Fas (FasL) (VILLENA et al., 2008) ou, até mesmo, há indução da apoptose através do aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) com posterior produção de óxido nítrico (NO) que leva a morte celular de uma maneira caspase-3 independente (CHIAPELLO et al., 2008).

### 1.3.3 Outros fatores de virulência

A definição de fator de virulência pode ser entendida como elementos produzidos pelo patógeno que causam danos ao hospedeiro direta ou indiretamente (PIROFSKI; CASADEVALL, 2015). A partir dessa definição, enzimas de degradação como lipases e proteases produzidas por *Cryptococcus* spp., com efeitos nocivos ao tecido do hospedeiro, são exemplos clássicos de fatores de virulência no contexto da criptococose. As ureases são enzimas de degradação que são particularmente importantes na infecção por *Cryptococcus* spp.; essas enzimas são produzidas em grande quantidade pelas leveduras e apresentam atividade catalítica na conversão de CO<sub>2</sub> em amônia. A amônia, por sua vez, facilita a dispersão das leveduras para o tecido cerebral, dando condições para que a barreira hematoencefálica seja transposta através de um aumento na expressão de adesinas pelo endotélio que favorece a adesão das leveduras ou pelo efeito tóxico direto da amônia no endotélio que afrouxa as junções intercelulares (COX et al., 2000; OLSZEWSKI et al., 2004). Outro tradicional fator de virulência encontrado em

*Cryptococcus* spp. é a melanina. Leveduras mutantes incapazes de produzirem esse pigmento têm sua virulência reduzida causada pela alteração na taxa de crescimento em ambientes específicos (SALAS et al., 1996). Além disso, a melanina confere às leveduras uma proteção contra variações de temperatura, radiação ionizante e fatores de estresse (WANG; CASADEVALL, 1994a; ROSAS; CASADEVALL, 1997; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006), e eleva a resistência às drogas antifúngicas convencionais na terapia da criptococose (WANG; CASADEVALL, 1994b). Considerando as propriedades da melanina como fator de virulência, a produção desse pigmento tem importância no escape da resposta imune no tecido pulmonar pelas leveduras e disseminação para outros tecidos, além de apresentar propriedades imunomoduladoras sobre a atividade fagocítica e gerar resistência a radicais oxidativos nos fagossomos de células do hospedeiro (LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999; NOVERR et al., 2004; MEDNICK; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2005).

#### **1.4 Resposta imune do hospedeiro e mecanismos de evasão de *Cryptococcus* spp.**

##### *1.4.1 Reconhecimento pelo sistema imune inato*

No tecido pulmonar as leveduras de *Cryptococcus* spp. se deparam com uma importante linha de defesa do hospedeiro que é representada principalmente por macrófagos alveolares. Através de diversos receptores de reconhecimento de padrões (RRP), como receptores de Dectina-1, Mincle, CD-14, receptores de manose e receptores do tipo toll (TLR, *toll like receptor*), que essas células da imunidade inata identificam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS, *pathogen-associated molecular pattern*) presentes em *Cryptococcus* spp. Nesse caso, GXM (reconhecido por TLR-2, TLR-4 e CD14), DNA (TLR-9),  $\beta$ -glucanos e mananas (receptores de Dectina e manose), quitina (receptores de manose) e glicerol/glico-lipídeos (Mincle) são os principais PAMPs relatados para *Cryptococcus* spp. (CAMPUZANO; WORMLEY, 2018; ELSEGEINY; MARR; WILLIAMSON, 2018). Macrófagos alveolares reconhecem as leveduras e as fagocitam, formando fagolisossomo que, através da acidificação interna, leva à degradação das leveduras. A ação fagocítica mediada por essas células no início da infecção é determinante no sucesso do controle da infecção, visto que esses macrófagos desempenham papel importante também na produção de quimiocinas responsáveis no recrutamento de neutrófilos e células dendríticas para o tecido pulmonar

(HE et al., 2003). Durante o curso da infecção, macrófagos alveolares podem apresentar dois distintos fenótipos: polarização para o subtipo M1, sendo essa população de suma importância na eliminação das leveduras através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; e polarização para o perfil M2, que está associado a uma deficiente resposta antifúngica, o que favorece a multiplicação intracelular do patógeno e persistência da infecção (WAGER; WORMLEY, 2014). A polarização de macrófagos para os subtipos M1 ou M2 depende de estímulos mediados por citocinas no microambiente de infecção, sendo a polarização para o perfil M1 dependente da prevalência de IFN- $\gamma$ , enquanto a prevalência de citocinas IL-10 e/ou IL-4 direciona as células para o perfil M2 (DAVIS et al., 2013). Células dendríticas também desempenham um papel importante nos estágios iniciais da infecção por *Cryptococcus* spp., preponderantemente na apresentação de antígenos para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa específica. Mediante fagocitose de leveduras de *Cryptococcus* e degradação lisossomal via eventos oxidativos ou não oxidativos, as células dendríticas passam a expressar moléculas co-estimulatórias e produzir citocinas pró-inflamatórias, isso evidencia o processo de maturação das células dendríticas que contribui no processamento de antígenos fúngicos a serem apresentados às células T naíve via o complexo de MHC de classe I e II (BAUMAN; NICHOLS; MURPHY, 2000; SYME et al., 2000; WOZNIAK; VYAS; LEVITZ, 2006).

#### 1.4.2 Evasão do sistema imune inato

O principal mecanismo de *Cryptococcus* spp. na evasão da fagocitose realizada por células da imunidade inata do hospedeiro se baseia no espessamento da cápsula polissacarídica e formação das células titans. Essa modificação estrutural da cápsula é induzida por diversos fatores que levam ao espessamento da cápsula, como a disponibilidade de CO<sub>2</sub>, limitação de íon ferro, soro de mamíferos, pH básico e limitação de nutrientes, sendo essa uma das primeiras respostas induzida em *Cryptococcus* em diferentes categorias de hospedeiros (GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985; VARTIVARIAN et al., 1993; FELDMESSER; KRESS; CASADEVALL, 2001; ZARAGOZA; FRIES; CASADEVALL, 2003; CHRISMAN et al., 2011). De fato, a dinâmica capsular acarreta em um rearranjo estrutural importante no curso da infecção e está associado ao nível de virulência das leveduras, pois, dessa forma, epítomos antigênicos tem seu reconhecimento comprometido, impedindo uma atuação efetora pelo



sistema imune do hospedeiro, o que propicia a disseminação das leveduras (MCFADDEN et al., 2007). A fagocitose e internalização de leveduras de *Cryptococcus* spp. por si só não impede seu crescimento e multiplicação devido a sua característica como patógeno intracelular facultativo, com isso, as leveduras sobrevivem e se multiplicam dentro ou fora de células fagocíticas (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). Para sobreviver ao severo ambiente lisossomal, as leveduras são capazes de promover a alcalinização do pH e a atenuação da ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, mecanismo mediado pelas enzimas catalases, superóxido desmutases, glutathione peroxidase, proteínas quinases C, tioredoxinas, Inositol e proteínas fosfoesfingolípido-fosfolipases C1 (SHOURIAN; QURESHI, 2019). Como citado anteriormente, as propriedades antioxidantes da capsula polissacarídica também atuam na sobrevivência das leveduras mediante o processo de fagocitose (ZARAGOZA et al., 2008). Esses mecanismos de virulência de *Cryptococcus* spp. sobre células da imunidade inata foram protagonistas durante o surto de infecção por uma cepa de *C. gattii*, afetando indivíduos imunocompetentes, que foi denominado de surto do noroeste do pacífico, em que se caracterizou pelos achados que demonstraram uma notável habilidade das leveduras de multiplicarem rapidamente em células fagocíticas e, em seguida, extravasarem para o ambiente extracelular (DATTA et al., 2009). Essa subversão realizada por *Cryptococcus* spp. está associada a um outro fenômeno específico desse fungo, denominado “divisão de trabalho”, em que as leveduras cessam o crescimento e adquirem uma morfologia caracterizada pela extensiva tubularização mitocondrial em resposta as espécies reativas de oxigênio e, com isso, a modificação dessa organela citoplasmática leva a uma maior produção de fatores resistentes às ações microbicidas das células fagocíticas permitindo que leveduras vizinhas se repliquem no espaço intracelular (VOELZ et al., 2014; MAY et al., 2016). A replicação das leveduras no interior de células fagocíticas leva a extrusão das mesmas pelos mecanismos de lise celular ou pelo processo denominado vomocitose, que se refere a fusão do fagossomo com a membrana celular e liberação ao ambiente extracelular das leveduras fagocitadas, com ausência de dano à célula do hospedeiro (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006). A capacidade replicativa de *Cryptococcus* spp. no interior da célula viabiliza sua disseminação para outros órgãos, como usualmente ocorre para o sistema nervoso central, fenômeno denominado como “cavalo de Tróia” em que as leveduras são carregadas pelas células fagocíticas para outros tecidos (KECHICHIAN; SHEA; DEL POETA, 2007).

### 1.4.3 Resposta imune adaptativa

A montagem de uma resposta imune adaptativa, que garante uma resposta celular específica ao patógeno, é essencial no controle da infecção causada por *Cryptococcus* spp. A resposta imune adaptativa é orquestrada em órgãos linfoides secundários onde as células apresentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cell*), como células dendríticas, secretam mediadores pró-inflamatórios que induzem a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e células natural killer (NK), juntamente com a apresentação de antígenos fúngicos por meio de moléculas de MHC. Esse processo depende do perfil de ativação de APC, que geralmente está associado ao tipo de PRR envolvido no reconhecimento das leveduras, e é determinante na indução de um perfil específico de linfócitos T durante a sua ativação, impactando no tipo de resposta a ser montada (HUANG et al., 2009).

Células dendríticas com perfil pró-inflamatório direcionam a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para os perfis T-helper 1 (Th2) e Th17, enquanto as células dendríticas tolerogênicas induzem a diferenciação de perfil Th2 e células T-regulatórias (Treg) (JIANG, 2016). Células Th1 são extremamente importantes no controle da infecção por *Cryptococcus* spp., devido à produção de IFN- $\gamma$  induzir a polarização de macrófagos para o subtipo M1, e também por direcionar células B a produzirem anticorpos opsonizantes. (JIANG, 2016). A presença de células Th1 com atividade efetora evita que células fagocíticas apresentem uma predisposição a serem susceptíveis/persistentes a infecção por *Cryptococcus* spp. (JIANG, 2016). Em relação às células Th17, há uma importante contribuição na resposta de perfil pró-inflamatório com recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção, e a produção de IL-17 é um fator chave na indução de células epiteliais de mucosa a produzirem defensinas e peptídeos antimicrobianos (HARDISON et al., 2010; VALDEZ et al., 2012). No contexto de infecção por *Cryptococcus* spp., o papel de células Th17 ainda não está totalmente esclarecido, porém o estudo em modelos experimentais indicam que as células Th17 desempenham um papel protetor na criptococose (MOVAHED et al., 2018). Assim como as células T CD4<sup>+</sup>, as células T CD8<sup>+</sup> são induzidas à diferenciação através da apresentação de antígenos fúngicos processados e apresentados em moléculas de MHC-I por células dendríticas. Com isso, as células dendríticas são determinantes na diferenciação de células T em perfis T-citotóxica 1 (Tc1), Tc2 e Tc17 (MOVAHED et al., 2018). As células Tc1 são grandes produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e GM-CSF que induzem a ativação de neutrófilos e

macrófagos elevando a atividade fungicidas dessas células (KUMARESAN; DA SILVA; KONTOYIANNIS, 2017). Além disso, essas células são capazes de reconhecerem, via MHC-I, os peptídeos fúngicos em células fagocíticas infectadas e, com isso, secretam vesículas citotóxicas contendo granzimas K e perforinas, além desse conjunto de enzimas terem efeito citotóxico diretamente sob as leveduras (LIN et al., 2005). De forma análoga às células Th17, as células Tc17 também são caracterizadas pela alta produção de IL-17 que conferem um efeito protetor contra as infecções fúngicas, com o envolvimento de neutrófilos e fatores protetores secretados pelas células epiteliais de mucosa.

Apesar de serem classificadas como pertencentes ao sistema imune inato, as células NK possuem mecanismos efetores específicos de células do sistema imune adaptativo como, por exemplo, a presença de memória imunológica (NARNIMANCINELLI; VIVIER; KERDILES, 2011; HU; TIAN; ZHANG, 2019). No contexto de infecções fúngicas, as células NK desempenham papéis importantes no reconhecimento e eliminação das leveduras de *Cryptococcus* spp. Células NK expressam uma série de receptores de ativação em sua superfície, receptores de citotoxicidade natural (NCR, *natural cytotoxicity receptors*), que são hábeis em reconhecer células aberrantes e patógenos com reflexo na ativação das células NK (SCHMIDT; TRAMSEN; LEHRNBECHER, 2017). Foi demonstrado que o receptor NKp30 reconhece diretamente *Candida albicans* e *C. neoformans* via  $\beta$ -glucanos presentes na parede celular, o que medeia a liberação de perforinas com efeito citotóxico sobre as leveduras (LI et al., 2013). O receptor, NKp46, também participa do reconhecimento e eliminação de espécies fúngicas, devido a ação citotóxica verificada sobre *Candida glabrata* (VITENSHEIN et al., 2016). De forma oposta às células T CD8+ que utilizam da liberação de granzimas e perforinas para exercer ação citotóxica contra espécies fúngicas, as células NK desempenha uma resposta antifúngica através da liberação de principalmente perforinas diretamente na sinapse entre a célula e levedura (MA et al., 2004). Os receptores NKp30 e NKp46 são importantes indutores de ativação das células NK e também na produção de IFN- $\gamma$ , que atua como imunomodulador na polarização de macrófagos e ativação de neutrófilos, além de acelerar a maturação de células dendríticas responsáveis pela ativação e diferenciação de células Th1 (BOEHM et al., 1997; JIANG, 2016).

Como dito anteriormente, o primeiro contato com *Cryptococcus* spp. ocorre geralmente na infância. Foi constatado a presença de anticorpos anti-GXM em indivíduos adultos ou crianças, independente do histórico de exposição prévia a nichos de

*Cryptococcus* spp., indicando a importância do desenvolvimento de respostas humorais (DESHAW; PIROFSKI, 1995; CHEN et al., 1999). De fato, estudos demonstram um papel importante da resposta mediada por anticorpos na proteção contra a infecção causada por *Cryptococcus* spp., uma vez que uma maturação deficiente de células B para a produção de anticorpos está associada ao aumento da susceptibilidade de indivíduos saudáveis ou HIV-positivos frente a criptococose (GUPTA et al., 1987; SUBRAMANIAM et al., 2009). Os anticorpos podem desestabilizar diretamente a estrutura da cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp, inviabilizando seu crescimento e facilitando a ação microbicida de células fagocíticas e o reconhecimento por linfócitos T específicos e células NK (A et al., 2007); além disso, é descrito que os isotipos IgA, IgG e IgM específicos para *Cryptococcus* spp. estão associados no contexto de respostas protetoras contra a criptococose (MUKAREMERA; NIELSEN, 2017).

#### 1.4.4 Subversão da resposta imune adaptativa

Complementando os mecanismos de escape do sistema imune inato, *Cryptococcus* spp. possuem diversas maneiras de também evadir e modular a resposta adaptativa do hospedeiro. Por exemplo, algumas moléculas PAMPs expressas pelo fungo, como GXM, quitina e  $\beta$ -glucanos, podem influenciar a ativação de células dendríticas, diminuindo a expressão de moléculas de MHC II e fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B, que levam a indução de uma resposta do tipo Th2 (MAY et al., 2016). É descrito que a produção de urease por *Cryptococcus* spp. é também responsável por induzir o perfil não protetivo de resposta Th2, verificado pelo aumento do recrutamento de células dendríticas imaturas, aumento nos níveis de IL-4 e IL-13 e a presença de macrófagos M2 no sítio de infecção em modelos murinos (OSTERHOLZER et al., 2009). A produção da molécula lipídica prostaglandina E2 (PGE2) por essas leveduras tem sido associada à inibição da produção de IL-17 durante a diferenciação de células Th17, implicando em uma persistência da infecção (VALDEZ et al., 2012). Por fim, a persistência da infecção, aliada ao intrínseco remodelamento estrutural da cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp. interfere na resposta imune humoral, pois reduz a especificidade e afinidade de anticorpos contra polissacarídeos da cápsula e parede celular dessas leveduras (GOLDMAN et al., 2000).

### 1.5 Tratamentos convencionais contra a infecção por *Cryptococcus* spp.

As opções de tratamento atuais contra infecções causadas por *Cryptococcus* spp. se baseiam na utilização de três principais drogas: polienos, como a anfotericina B, azoles, como o fluconazol e análogos de pirimidina, como a flucitosina (5-FC) (MAY et al., 2016). Dentre esses compostos, a utilização de anfotericina B é considerado padrão e comumente a primeira escolha de intervenção, porém, apresenta baixa eficiência no controle da criptococose, principalmente em pacientes imunocomprometidos pela aids. Mesmo com acesso à terapia antirretroviral, o tratamento com anfotericina B não impediu uma taxa de mortalidade entre 35 a 40% com o desenvolvimento de meningite criptocócica nesses indivíduos (BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013; SIDDIQI et al., 2014; MAY et al., 2016). O tratamento utilizando a anfotericina B desoxicolato tem sido a primeira escolha de abordagem por mais de meio século. Essa droga tem como mecanismo de ação a atuação em moléculas de ergosterol da parede celular fúngica que causa a formação de poros na membrana e induzem a morte celular por danos oxidativos (BELENKY; CAMACHO; COLLINS, 2013; ANDERSON et al., 2014). Devido à alta toxicidade ao hospedeiro causada pela anfotericina B, têm sido desenvolvido novas formulações com o intuito de se reduzir esse efeito negativo. Por exemplo, formulações de lipossomos revestidos com anfotericina B apresentaram reduzida citotoxicidade em dosagens suficientes para manter seu efeito antifúngico (STONE et al., 2016). De forma frequente, o uso da anfotericina B é combinado com a flucitosina, que atua através dos seguintes mecanismos de ação: flucitosina é convertida em 5-fluorodeoxirudina monofosfato por enzimas do patógeno, que então inibe a ação da enzima timidilato sintetase na síntese de DNA ou a flucitosina é convertida em 5-fluorodina trifosfato, que, ao ser incorporada ao RNA, prejudica a síntese proteica (MAY et al., 2016). A associação de anfotericina B e flucitosina apresenta maior eficácia contra a infecção causada por *Cryptococcus* spp., com relevante efeito na sobrevivência de pacientes quando comparado com a terapia convencional somente com anfotericina B (MAY et al., 2016), porém, essa associação de antifúngicos ainda resulta em efeitos citotóxicos causados pela anfotericina B, além da disponibilidade de flucitosina nas localidades com maior incidência da criptococose ser limitada (LOYSE et al., 2013). Na tentativa de atenuar os efeitos deletérios causados pelo uso de anfotericina B, é proposto a combinação de fluconazol e flucitosina como manutenção do tratamento após um período inicial com anfotericina B, dessa forma, essa droga tem seu período de administração reduzido para apenas 1

semana (TENFORDE et al., 2018). O fluconazol pode ser administrado via oral e apresenta excelente capacidade de penetrar no sistema nervoso central e seu mecanismo de ação se baseia na inibição da enzima 14 $\alpha$ -demetilase, que atua na conversão de lanosterol para ergosterol (MAY et al., 2016). Entretanto, o uso de fluconazol nas fases iniciais de tratamento não é indicado, visto que apresenta efeito fungistático ao invés de fungicida, sendo menos efetivo na eliminação das leveduras (IYER et al., 2021).

Uma nova problemática tem sido observada no tratamento da criptococose, que é a resistência fúngica a essas três classes de drogas. *Cryptococcus* spp. apresentam uma extraordinária plasticidade genômica que culmina em uma ampla adaptabilidade fisiológica, o que confere alta resiliência ao tratamento com antifúngicos (IYER et al., 2021). Em isolados de *C. neoformans* expostos por longo período à anfotericina B, observou-se mutações na síntese de esteróis, impedindo o mecanismo de ação dessa droga (KELLY et al., 1994). Outros estudos constataram que mutações pontuais em genes específicos de *Cryptococcus* spp. levaram ao bloqueio do mecanismo de ação da flucitosina; essa resistência antifúngica ocorreu em estudos *in vitro* a partir de isolados clínicos (MAY et al., 2016). A resistência ao tratamento com fluconazol também ocorre, e isso é devido ao aumento da expressão do gene ERG11 (responsável pela síntese da enzima 14 $\alpha$ -demetilase) ou pelo aumento da capacidade de proteínas de membrana em promover o efluxo do fluconazol (IYER et al., 2021).

## 1.6 Estratégias promissoras no controle da criptococose

Dado as atuais limitações nas opções disponíveis para o tratamento das infecções causadas por *Cryptococcus* spp., novas estratégias terapêuticas têm sido exploradas para elevar a eficácia terapêutica e reduzir efeitos citotóxicos aos pacientes. Neste contexto, estratégias terapêuticas explorando moléculas imunomoduladoras ou componentes da resposta imune são os alvos mais atraentes, principalmente para pacientes imunocomprometidos acometidos por infecções fúngicas (SAM et al., 2018). Nesse campo investigativo, as terapias com citocinas, agonistas de citocinas, vitaminas, remodelagem do mecanismo de ação de drogas existentes, terapia com vacinas, anticorpos monoclonais, terapia celular adotiva e engenharia de células do sistema imune, são as principais vertentes em estudo ao redor do mundo. Dentre essas, darei destaque para as três últimas, pois se relacionam intimamente com a dissertação em foco.

### 1.6.1 Anticorpos monoclonais

Em um trabalho pioneiro que explorou o uso de anticorpos monoclonais específicos para o GXM presente na cápsula de *C. neoformans* (CASADEVALL et al., 1998), verificou-se que o clone 18B7 foi capaz de modular a expressão gênica e metabolismo do fungo que resultou no aumento da susceptibilidade de *C. neoformans* às drogas antifúngicas (MCCLELLAND et al., 2010). Em um estudo clínico de fase I avaliando os efeitos do 18B7 em pacientes HIV/aids positivos apresentando meningite criptocócica, o 18B7 demonstrou ser seguro ao paciente e sem efeito citotóxico e resultou na redução dos níveis de GXM no soro desses pacientes, porém exibiu baixa difusão para o sistema nervoso central (LARSEN et al., 2005). Infelizmente, devido à falta de apoio industrial, os ensaios clínicos com o anticorpo monoclonal 18B7 não se estenderam às fases de estudo II/III (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010). Com outro alvo de reconhecimento da parede celular de *Cryptococcus* spp., o grupo do pesquisador Marcio L. Rodrigues, da fundação Oswaldo Cruz e Universidade Federal do Rio de Janeiro, têm explorado a produção de anticorpos monoclonais contra oligômeros de quitina presentes na superfície de *C. neoformans* e *Candida albicans* (FIGUEIREDO et al., 2021). Esse anticorpo está com depósito de patente, e demonstrou, *in vitro*, que a combinação do anticorpo anti-quitina associado com doses subinibitórias de anfotericina B foi possível a inibição do crescimento fúngico e também permitiu o controle da infecção por *C. neoformans* em modelo experimental (FIGUEIREDO et al., 2021).

Em outro estudo, ensaios clínicos de fase II foram realizados com o anticorpo monoclonal Mycograb (Efungumab), desenvolvido para ter especificidade para a proteína Hsp90, associada à parede celular de diversas espécies fúngicas, incluindo *Cryptococcus* spp. (MATTHEWS et al., 2003). Mycograb foi desenvolvido para agir de forma sinérgica com a anfotericina B, e demonstrou bons resultados, reduzindo a mortalidade de 18% (grupo controle) para 4% associada à infecção por *Candida* spp. (PACHL et al., 2006). Entretanto, o processo de produção desse anticorpo não foi autorizado pela agência regulatória europeia (EMA, *european medicines agency*) para a comercialização (SAM et al., 2018). Além disso, a capacidade do Mycograb de atuar sinérgicamente com o mecanismo de ação da anfotericina B tem levantado questionamentos pela comunidade científica (RICHE et al., 2012). Outro anticorpo monoclonal voltado para o reconhecimento de espécies fúngicas foi desenvolvido pelo grupo do professor Sandro R. de Almeida, da Universidade de São Paulo, denominado mAbP6E7, e após ser

humanizado, demonstrou um papel terapêutico em infecções causadas por *Sporothrix schenckii* e *S. brasiliensis* (DE ALMEIDA et al., 2017). Apesar desses anticorpos não estarem disponíveis para o tratamento, a pesquisa em seu desenvolvimento e caracterização abre espaço para possíveis aplicações de suas estruturas em outros contextos, como será abordado posteriormente.

### 1.6.2 Terapia celular adotiva

O uso da terapia celular adotiva e modificação de células do sistema imune para o reconhecimento específico de patógenos são estratégias presentes na fronteira do conhecimento e com alto potencial de subverter os mecanismos de escape encontrados nas infecções fúngicas invasivas. Nesse contexto, a abordagem envolvendo o uso da terapia celular adotiva com células T, já aplicada no contexto de pacientes com câncer, pode ser extrapolada para o tratamento de infecções fúngicas invasivas (KUMARESAN et al., 2015; YANG; ROSENBERG, 2016). Pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), são altamente susceptíveis às infecções fúngicas oportunistas, com um aumento drástico na taxa de mortalidade causada pela infecção fúngica (PAGANO et al., 2007; NEOFYTOS et al., 2009; KONTOYIENNIS et al., 2010). A terapia celular adotiva envolve o isolamento de linfócitos T autólogos e posterior expansão *ex vivo* mediante estímulo com antígenos específicos e, uma vez que essas células são expandidas e ativadas, são reinfundidas no paciente. De fato, a transferência adotiva haploidêntica de linfócitos T CD4+ com perfil de ativação Th1 resultou na proteção contra a aspergilose invasiva em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas, onde 9 de 10 pacientes acometidos com aspergilose invasiva tiveram resolução da infecção após receberem apenas uma dose dos linfócitos ativados (PERRUCCIO et al., 2005). Em um recente estudo clínico, Gottlieb et al. (2021) reportam o uso profilático da transferência adotiva de células T autólogas antígeno-específicas para uma série de vírus, como AdV, influenza, EBV, CMV, VZV e BKV e também contra *Aspergillus*, em pacientes submetidos a TCTH alogênico (GOTTLIEB et al., 2021). Ao final do estudo, nenhum paciente submetido ao procedimento desenvolveu infecção causada por *Aspergillus*, apesar de a maioria dos pacientes ter sinalizado infecção por CMV, EBV e BKV; porém, a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD, *graft versus host disease*) foi uma problemática encontrada no transplante alogênico de células (GOTTLIEB et al.,



2021). De fato, a transferência adotiva de células T aparenta ser mais efetiva em casos onde a profilaxia contra GVHD não é necessária (PAPADOPOULOU et al., 2016).

Células NK, como mencionado anteriormente, podem desempenhar papel importante no controle de infecções fúngicas invasivas, sem a necessidade prévia de ativação por outros componentes do sistema imune, pois é intrínseca a capacidade do reconhecimento de estruturas fúngicas e a ação citotóxica direta contra esses patógenos. Assim como células T, as células NK também podem ser aplicadas na terapia celular pela transferência adotiva, além disso, uma importante vantagem de células NK alogênicas é a baixa probabilidade do desenvolvimento de GVHD, fazendo dessas células uma alternativa promissora para a terapia celular (LUPO; MATOSEVIC, 2019). No contexto de infecções fúngicas, atualmente não há ensaios clínicos em andamento com células NK. Porém, em modelo murino afetado pela aspergilose pulmonar, foi avaliada a transferência adotiva autóloga de células NK expandidas *in vitro*, onde os autores verificaram atividade fungicida mediada pelo engajamento do receptor Dectina-1, capaz de reconhecer  $\beta$ -1,3-glucanos, que induziu a produção e liberação de perforinas, contribuindo no controle significativo da carga fúngica pulmonar, demonstrando uma possível viabilidade translacional da transferência adotiva de células NK no controle de infecções fúngicas (SOE et al., 2020). Com a finalidade de subverter alguns problemas associados ao uso de células primárias, como a necessidade de alta quantidade de células em curto período de tempo, o uso de linhagens celulares se mostra como uma alternativa. Nesse sentido, a linhagem NK-92 têm sido considerada, uma vez que é amplamente caracterizada e de fácil manuseio, além de poder ser criopreservada em banco de células especificados para boas práticas de fabricação (GMP, *good manufacture practices*) (TONN et al., 2001). Por se tratar de uma linhagem celular imortalizada, existem precauções a nível de biossegurança na aplicação da terapia, portanto, essas células são irradiadas previamente ao uso clínico. Um recente estudo que procedeu com duas infusões de células NK-92, tendo 15 pacientes em tratamento contra o câncer, não reportou efeito adverso decorrente do uso dessa linhagem celular (TONN et al., 2013). Há algumas diferenças importantes entre as células NK-92 e as células NK primárias, sendo uma das mais evidentes a ausência da expressão de CD16 em células NK-92, molécula importante para o desenvolvimento de resposta citotóxica dependente de anticorpos (ADCC). Em um estudo recente, Schimidt et al. (2021) mostraram *in vitro* a ação antifúngica de células NK-92 contra uma série de espécies, como *Aspergillus* spp., *Candida* spp.,

mucormycetes, e *Fusarium* spp., através da liberação de grânulos citotóxicos, indicando o potencial fungicida das células NK-92 (SCHMIDT et al., 2021).

### 1.6.3 Terapia com células CAR-T

O advento da engenharia de linfócitos T com receptores quiméricos antigênicos (CAR, *chimeric antigen receptor*) criou novas oportunidades de aplicação da terapia celular adotiva, fato que revolucionou as estratégias de imunoterapias. Os CARs são receptores quiméricos constituídos por regiões originadas de diferentes proteínas presentes em células da imunidade. O princípio da expressão do CAR em células T se baseia na mimetização de eventos essenciais na sinalização celular que desencadeiam a ativação de células T no fenômeno da sinapse imunológica entre o complexo TCR-MHC e moléculas co-estimulatórias. Para isso, o CAR é delineado por uma região extracelular de reconhecimento de antígeno, que será responsável por iniciar uma modificação conformacional no CAR com o propósito de induzir, na sua porção citoplasmática, a ativação de moléculas responsáveis por mediar uma cascata de sinalização que ativa células T, sendo a ocorrência desses eventos de forma independente de moléculas de MHC. Assim, o CAR é constituído em 4 domínios: [1] região extracelular de ligação ao antígeno, usualmente formada por fragmentos variáveis de cadeia única derivado de anticorpo monoclonal (*scFv*, *single chain variable fragment*); [2] *hinge* ou espaçadora, uma região que interliga o *scFv* com uma porção ancorada na membrana celular; [3] porção transmembrana; [4] domínio intracelular de transdução de sinal, composto por uma ou mais moléculas co-estimulatórias (e.g. CD28 e/ou 4-1BB) em associação com a cadeia zeta da molécula de CD3 derivada do TCR. Os primeiros registros envolvendo a modificação de linfócitos T com receptores quiméricos são do final da década de 80 (KUWANA et al., 1987; GROSS et al., 1989; GROSS; WAKS; ESHHAR, 1989), porém, nos últimos anos essa terapia teve maior notoriedade devido ao sucesso de sua aplicação no combate a cânceres de origem hematológica. No ano de 2017, a agência de regulamentação estadunidense (FDA, *food and drug administration*) aprovou o primeiro produto terapêutico baseado em células CAR-T, Tisagenlecleucel (Kymriah), voltado ao tratamento de leucemia linfoblástica aguda (MULLARD, 2017). Ainda no mesmo ano, houve a aprovação do Axicabtagene ciloleucel (Yescarta) para o tratamento de linfomas não-Hodgkin (NEELAPU et al., 2017). Posteriormente, se observou uma série de ensaios clínicos envolvendo células CAR-T que resultaram na aprovação de novos produtos para

diferentes alvos: aprovação do uso de Tisagenlecleucel, também para o tratamento de linfomas não Hodgkin (2018) (SCHUSTER et al., 2019); Brexucabtagene autoleucel (Tecartus), para o tratamento de linfomas de células do manto (2020) (DENLINGER; BOND; JAGLOWSKI, 2022); Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi) para linfomas não-Hodgkin (2021) (DENLINGER; BOND; JAGLOWSKI, 2022); Axicabtagene ciloleucel para o tratamento de linfomas foliculares (2021) (DENLINGER; BOND; JAGLOWSKI, 2022); Idecabtagene vicleucel (Abecma), para mieloma múltiplo (2021) (MUNSHI et al., 2021). Em 2019 foi realizado o primeiro tratamento com células CAR-T no Brasil, em um paciente com linfoma não-Hodgkin, e o tratamento resultou em completa remissão das células cancerígenas. No início de 2022, a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) aprovou a comercialização do Tisagenlecleucel (Kymriah) no Brasil. Em fase final, há a implementação do maior programa de terapia com células CAR-T na América Latina, com a criação de centros especializados no desenvolvimento, produção e aplicação desse tratamento, em virtude da parceria entre a Universidade de São Paulo, Hemocentro de Ribeirão Preto, Instituto Butantã, FAPESP e governo estadual.

Impulsionado pelo êxito da terapia com células CAR-T na área oncológica, cada vez mais o interesse acadêmico e da indústria se volta em desenvolver novos CARs com aplicação em áreas distintas da oncologia, como: doenças autoimunes, desordens metabólicas, doenças derivadas de células senescentes e doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias e espécies fúngicas (AGHAJANIAN; RURIK; EPSTEIN, 2022). Há diversos estudos focados na otimização do CAR que favoreça aspectos metabólicos, efetores, persistência e proliferação das células modificadas com esses receptores (VAN DER STEGEN; HAMIEH; SADELAIN, 2015; ZHAO et al., 2015). Tem sido verificado que mínimas diferenças no *design* do CAR influenciam na eficácia da terapia celular, e o avanço na construção de novos CAR se baseia na investigação das regiões de reconhecimento de antígeno, *hinge*, transmembrana e regiões co-estimulatórias (AJINA; MAHER, 2018). Nesse sentido, os tópicos seguintes abordarão especificamente as estruturas que compõem o CAR e suas implicações, além das perspectivas do uso dessa terapia no contexto de infecções fúngicas.

#### 1.6.3.1 Região de reconhecimento de antígeno

A região de reconhecimento de antígeno confere ao CAR a especificidade e sensibilidade de ligação ao alvo. Na maioria das construções de CAR, essa região é

formada a partir da cadeia variável pesada (VH, *variable heavy*) e cadeia variável leve (VL, *variable light*) derivadas de anticorpos monoclonais e que foram conectadas via uma sequência peptídica flexível baseada em repetições de glicina e serina (e.g. (Gly<sup>4</sup>Ser)<sup>3</sup>) que origina o scFv (GIL; SCHRUM, 2013). Outros domínios de reconhecimento podem ser utilizados além dos scFv, como, por exemplo, o uso do domínio de ligação a carboidratos do receptor Dectina-1 voltado ao reconhecimento de  $\beta$ -glucanos da parede celular de *Aspergillus* (KUMARESAN et al., 2014).

Diversas características da porção de reconhecimento do antígeno impactam a funcionalidade do CAR, como a importância do nível de afinidade pelo antígeno. Uma baixa afinidade pelo antígeno resulta em falha no desencadeamento da cascata de sinalização oriunda do CAR, enquanto uma afinidade exacerbada leva a um estado de hiperativação celular, favorecendo a exaustão e morte celular (CHMIELEWSKI et al., 2004; HUDECEK et al., 2013). A porção de reconhecimento do CAR deve apresentar, de forma desejada, uma incapacidade de interagir com antígenos encontrados em tecidos saudáveis, com isso é impedido ao máximo efeitos de *off-target*. Na situação onde o CAR é delineado para redirecionar células tendo patógenos como alvos, os epítomos estão geralmente ausentes nas células de humanos. Um exemplo claro disso é o desenvolvimento, pelo nosso grupo de pesquisa, de um CAR com afinidade para GXM, polissacarídeo exclusivo de fungos, a partir do scFv derivado do anticorpo monoclonal 18B7. Em adição aos aspectos da afinidade e especificidade da porção de reconhecimento do CAR, a localização do epítomo alvo e sua densidade na superfície da célula alvo devem ser considerados, bem como a interação entre os scFv resultando na clusterização do CAR que é um fator indutor da ativação celular com ausência do antígeno, evento denominado sinalização tônica (AJINA; MAHER, 2018).

#### 1.6.3.2 Região “hinge” ou espaçadora

O componente extracelular do CAR que conecta a região de ligação ao antígeno com a porção da molécula do CAR ancorada na membrana é denominado de *hinge* ou espaçador. Essa estrutura tem a propriedade de impedir eventos de interação estérica e conferir flexibilidade à região extracelular de modo a facilitar o reconhecimento do antígeno pelo domínio de ligação do CAR (STERNER; STERNER, 2021). Além disso, também é atribuído a essa região a capacidade de afetar a expressão do CAR e interferir no desencadeamento dos eventos de sinalização que levam à ativação (HUDECEK et al.,

2015). A seleção da molécula a compor essa região depende, principalmente, da posição e acessibilidade do epítipo alvo, sendo *hinges* mais longos facilitadores do reconhecimento de epítopos próximos à membrana da célula alvo, enquanto *hinges* curtos são mais efetivos na ligação a epítopos mais distantes da membrana da célula alvo (GUEST et al., 2005; HUDECEK et al., 2015). Contudo, na prática, a escolha do *hinge* adequado para cada CAR acaba sendo de maneira empírica, sendo essa região comumente derivada das porções extracelulares de moléculas como CD8 $\alpha$ , CD28, IgG1 ou IgG4 (STOIBER et al., 2019). Um problema associado ao uso de *hinge* derivado de imunoglobulinas está no possível reconhecimento dessa molécula por receptores Fc (Fc $\gamma$ R), levando a ativação inespecífica de células expressando o CAR com esse tipo de *hinge* (STOIBER et al., 2019). De fato, estudos mostraram que células T expressando CAR constituído por *hinge* originado de imunoglobulinas tiveram baixa persistência e morte celular induzida por ativação devido a interações inespecíficas no pulmão (HUDECEK et al., 2015), e também foi detectado citotoxicidade contra alvos não específicos (ALMÅSBÄK et al., 2015).

Apesar de *hinges* derivados de CD8 $\alpha$  ou CD28 serem comumente escolhidos em ensaios clínicos, os efeitos particulares dessas sequências não estão totalmente esclarecidos, dado que frequentemente essas moléculas são utilizadas também na porção transmembrana do CAR. Em um estudo que comparou duas construções contendo o CD8 $\alpha$  ou CD28 como *hinge*/transmembrana, se verificou que células expressando CAR com CD8 $\alpha$  produziram níveis reduzidos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e maior resistência a eventos de morte celular induzida por ativação causada por exposição contínua ao antígeno *in vitro*, no entanto, a eficácia no combate de células cancerígenas foi equivalente em modelo experimental (ALABANZA et al., 2017). Por fim, a sinalização tônica também pode ser desencadeada pela molécula do *hinge*, contudo, essa atribuição exclusiva ao *hinge* pode ser precipitada devido as dificuldades em excluir o envolvimento do scFv e da porção transmembrana nesse evento. Por exemplo, a mudança do *hinge* de IgG4 para CD8 $\alpha$  em um CAR específico para proteína tirosina quinase Met (c-Met) anulou a sinalização tônica nas células modificadas, ao passo que, em um segundo CAR, específico para mesotelina, a mesma alteração de moléculas no *hinge* não aboliu a sinalização tônica (FRIGAULT et al., 2015).

### *1.6.3.3 Região transmembrana*

A região transmembrana do CAR é constituída de uma sequência de aminoácidos com caráter hidrofóbico e a função é ancorar o CAR na membrana plasmática das células modificadas, interligando a porção extracelular com o domínio de sinalização intracelular. As sequências comumente utilizadas na montagem da região transmembrana são aquelas derivadas de moléculas como CD4, CD8 $\alpha$ , CD28 e CD3 $\zeta$  (STOIBER et al., 2019). Raramente a região transmembrana é substituída exclusivamente na construção de novos CARs, portanto, as implicações funcionais atribuídas a essa estrutura do CAR ainda não são bem compreendidas. Entretanto, estudos sugerem que a porção transmembrana pode impactar na expressão do CAR, estabilidade, formação da sinapse imunológica e interagir com outros componentes da membrana celular ou mesmo formar dímeros com outras moléculas do CAR (BRIDGEMAN et al., 2010; MORIN et al., 2015; MULLER et al., 2021). Nos primeiros construtos de CAR, sequencias derivadas do CD3 $\zeta$  foram frequentemente utilizadas como região transmembrana de CAR de primeira geração, pois eram capazes de se associarem a moléculas de TCR, que, por fim, culminava em potentes sinais de ativação (BRIDGEMAN et al., 2010). Essa estratégia foi superada com o desenvolvimento das novas gerações do CAR, causado pela adição de moléculas co-estimulatórias na porção intracelular que desencadeavam fortes sinais de ativação com ausência do engajamento do TCR. Além disso, a incorporação do CD8 $\alpha$  ou CD28 na região transmembrana aumentou a expressão do CAR comparado com construtos de primeira geração, tornando as duas moléculas as mais comumente utilizadas (STOIBER et al., 2019). Considerando os relatos na literatura, deve-se salientar que a região transmembrana do CAR pode impactar a sua funcionalidade através do nível de expressão e intensidade do sinal de ativação, portanto, a avaliação funcional da região transmembrana do CAR associada com os outros domínios é fortemente desejada no estudo das diferentes construções de CAR.

### *1.6.3.4 Região intracelular de transdução de sinal*

A porção de transdução de sinal do CAR é elemento chave na funcionalidade do receptor, com a finalidade de iniciar a ativação celular após o engajamento da porção extracelular com o ligante. Essa região do CAR é estudada de forma intensa para entender os efeitos das moléculas co-estimuladoras na efetividade funcional do CAR. A categorização do CAR em “gerações” é baseada nas características da região de

sinalização intracelular. A primeira geração do CAR é caracterizada pela adição de apenas um domínio de transdução de sinal, derivado primariamente dos *motifs* de ativação de imunoreceptores baseados em tirosina (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) presentes na cadeia zeta da molécula de CD3, pertencente ao complexo TCR (IRVING; WEISS, 1991; Z et al., 1993). Células T modificadas com a primeira geração de CAR demonstraram sinais de ativação decorridos da produção de citocinas, proliferação celular e atividade antitumoral em modelos experimentais, porém a robustez da atividade efetora das células expressando o CAR necessitava ser otimizada (BROCKER; KARJALAINEN, 1995). A necessidade de alavancar a ativação celular advinda do CAR de primeira geração ficou evidente em estudos clínicos realizados em pacientes com câncer de ovário e de células B, ao se constatar uma deficiência das células CAR-T em apresentar uma resposta antitumoral robusta (KERSHAW et al., 2006; JENSEN et al., 2010). Com isso, a criação do CAR de segunda geração, com a presença de moléculas co-estimulatórias agindo de forma sinérgica com a sinalização proveniente do CD3 $\zeta$ , demonstrou uma melhora marcante na produção de IL-2 e capacidade proliferativa em células CAR-T contendo a sequência citoplasmática da molécula CD28 acoplada com o domínio de ativação de CD3 $\zeta$  (FINNEY et al., 1998; KRAUSE et al., 1998). Posteriormente, outras moléculas co-estimulatórias, como o 4-1BB (CD137), foram consideradas na montagem do CAR, e também demonstraram uma indução significativa dos níveis de IL-2 e aumento na taxa proliferativa de células T modificadas, comparado com CAR de primeira geração (IMAI et al., 2004). Estudos subsequentes, *in vivo*, confirmaram a superioridade do CAR de segunda geração na mediação de uma resposta anti-tumoral efetora (BRENTJENS et al., 2007; CARPENITO et al., 2009; MILONE et al., 2009) e, posteriormente, as terapias aprovadas pelo FDA para comercialização utilizam CARs de segunda geração contendo CD28 ou 4-1BB como moléculas co-estimulatórias (PAN et al., 2022). Considerando os sinais co-estimulatórios derivados do CD28 e 4-1BB, apesar de ambos engajarem vias parecidas, existem diferenças na via de sinalização desencadeada por cada molécula que, potencialmente, repercute em níveis funcionais distintos das células expressando o CAR. De forma geral, o sinal de ativação oriundo de CD28 ocorre majoritariamente via a fosforilação de *motifs* específicos por proteínas quinases da família Src que levam ao engajamento da via P13K-AKT-mTor (LINDNER et al., 2020). No caso da porção citoplasmática de 4-1BB, há sítios de ligação para as proteínas adaptadoras TRAF1, TRAF2 e TRAF3 (*tumor necrosis*

*factor receptor-associated factor*) que modulam o recrutamento da via canônica e não canônica do fator de transcrição nuclear Kb (NF-Kb) e de MAP-quinases (LINDNER et al., 2020). Com o sinal co-estimulatório de ambos CD28 ou 4-1BB ocorre a ativação de células T com elevados níveis de IL-2, síntese de moléculas associadas à proliferação celular e anti-apoptóticas (CAPPELL; KOCHENDERFER, 2021). Geralmente, o sinal co-estimulatório derivado de CD28 promove uma ativação mais pronunciada de células CAR-T, com maior produção de citocinas, diferenciação celular em fenótipo efetor e maior atividade citolítica, enquanto células T expressando CAR com 4-1BB tende a sofrer diferenciação celular para um perfil de memória, com menor atividade efetora e pronunciado perfil metabólico oxidativo (KAWALEKAR et al., 2016; LINDNER et al., 2020). A persistência *in vivo* de células CAR-T contendo CD28 como molécula co-estimuladora se mostrou limitada devido a elevada taxa de morte celular induzida por ativação (BRENTJENS et al., 2013). Por outro lado, células CAR-T expressando 4-1BB como molécula co-estimuladora apresentaram elevada persistência, sendo detectado células CAR-T em pacientes tratados mesmo depois de anos das infusões e isso, possivelmente, decorre do aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas da família BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) e diminuição de perfis de exaustão (PORTER et al., 2015; LI et al., 2018). Dados clínicos obtidos de ensaios multicentralizados, com ênfase no tratamento de linfoma de células B com células CAR-T, mostraram que a molécula co-estimuladora CD28 foi associada a níveis superiores de neurotoxicidade, comparado com 4-1BB (CAPPELL; KOCHENDERFER, 2021). De forma abrangente, estudos clínicos e pré-clínicos não apontam a superioridade dentre as moléculas co-estimuladoras CD28 e 4-1BB, pelo motivo de ambas demonstrarem eficácia no controle tumoral e as diferenças funcionais observadas entre CAR contendo distintas moléculas co-estimuladoras podem estar associadas aos outros componentes do CAR e ao contexto de aplicação clínica.

Diversas moléculas alternativas surgiram como alternativas ao CD28 e 4-1BB, demonstrando resultados promissores em estudos pré-clínicos, como ICOS (GUEDAN et al., 2014), CD27 (SONG; POWELL, 2012), MYD88, CD40 (MATA et al., 2017) e OX40 (HOMBACH et al., 2012). Esses avanços viabilizaram a construção de CARs de terceira geração, no qual é considerado duas moléculas co-estimuladoras visando explorar possíveis vantagens na funcionalidade do CAR. Realmente, alguns estudos pré-clínicos demonstraram a superioridade do CAR de terceira geração em relação a seus antecessores (ZHONG et al., 2010; GUEDAN et al., 2018), enquanto outros relatos concluíram a



ausência de superioridade funcional (YI et al., 2018) ou, até mesmo, um retrocesso do CAR de terceira geração comparado aos de segunda geração (HASO et al., 2013; ABATE-DAGA et al., 2014; KUÜNKELE et al., 2015).

#### 1.6.3.5 *Futuras gerações do CAR*

Tendo como ponto de partida o conhecimento estabelecido para a tecnologia com CAR e os avanços tecnológicos na área da biologia sintética, diversas abordagens têm sido exploradas na tentativa de melhorar os resultados terapêuticos envolvendo o uso do CAR e superar as limitações encontradas pela sua própria estrutura, bem como o contexto no qual é aplicado. Nesse sentido, o estado da arte no momento atual se baseia no desenvolvimento de CAR da nova geração, também chamados de quarta geração ou “TRUCKS”. As novas construções exploram estratégias como: (i) geração do CAR direcionado a mais de um antígeno, seja pela co-expressão de dois diferentes CARs na mesma célula ou um único CAR carregando distintos scFv; (ii) expressão do CAR somente mediante o reconhecimento do antígeno por um segundo receptor que libera um fator de transcrição que controla a expressão do CAR; (iii) CAR que é expresso ou adquire funcionalidade mediante a adição de uma molécula específica; (iv) modificação das células com CAR inibitório que impede a ativação de células T mediante ligação com antígenos em células normais. (v) CAR “universais” que consistem uma sequência contendo a região co-estimulatória, transmembrana e na porção extracelular uma região que pode se ligar e dissociar a diferentes scFv adicionados posteriormente; (vi) co-expressão do CAR com citocinas, agonistas ou bloqueadores de receptores específicos. Os detalhes aprofundados dessa nova geração de CARs podem ser encontrados nos trabalhos revisados por (GUEDAN et al., 2019; LINDNER et al., 2020).

Em outra vertente, a modificação de células da imunidade com o CAR, diferente das células T, visa agregar aos avanços com CAR às propriedades específicas que determinadas células apresentam de forma intrínseca e que são adequadas em contextos específicos. Nesse sentido, o uso de células NK e macrófagos expressando CAR se mostram como estratégias promissoras com aplicações na terapia do câncer e doenças infecciosas (PAN et al., 2022). Para as células NK, suas vantagens estão associadas à sua baixa alorreatividade, secreção de vesículas citotóxicas e menor propensão a causar efeitos neurotóxicos comparado com células T; já os macrófagos, apresentam elevada capacidade de infiltração em micro-ambientes tumorais ou de infecção, associado à sua

alta atividade fagocítica, tornando um ganho funcional junto a expressão do CAR (PAN et al., 2022). Entretanto, apesar das construções de CARs desenvolvidos originalmente para células T terem alguma atividade em outros tipos celulares, deve-se considerar as particularidades de cada tipo de célula na criação de novos construtos, nesse sentido, há um trajeto em construção no contexto de CAR para células NK e macrófagos.

#### 1.6.3.6 CAR no contexto de infecções fúngicas invasivas

A imunoterapia com células CAR-T direcionada no controle de infecções fúngicas invasivas surgiu como uma promissora alternativa em relação às drogas antifúngicas convencionais, em razão dos recentes avanços no delineamento do CAR para diferentes alvos. A estratégia de gerar novos CARs contendo regiões de reconhecimento específicos para glicoproteínas e carboidratos presentes na superfície das células fúngicas é uma maneira sofisticada de redirecionar a atividade citotóxica diretamente sobre o patógeno além de essas células liberam importantes moléculas imunomoduladoras. Kumaresan et al. (2014) foram pioneiros na exploração da tecnologia com CAR na terapia de infecções fúngicas e, para isso, o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD, *carbohydrate recognition domain*) de Dectina-1, específico para  $\beta$ -1,3-glucano, foi utilizado como porção de ligação à parede celular de diversas espécies fúngicas (KUMARESAN et al., 2014). O CRD de dectina-1 foi associado a um *hinge*, derivado de IgG4 e com o domínio transmembrana e região co-estimuladora de CD28 e, por fim, acoplado com CD3 $\zeta$ , originando um CAR de segunda geração denominado Dectin-CAR (D-CAR). Os autores demonstraram que a modificação de células T D-CAR redirecionou o efeito citotóxico de células T CD8<sup>+</sup> de modo a inibir o crescimento de conídios de *Aspergillus fumigatus*, diminuindo significativamente a carga fúngica pulmonar em modelos experimentais com aspergilose (KUMARESAN et al., 2014). Entretanto, a expressão de  $\beta$ -1,3-glucano pode ser modulada durante a transição morfológica de algumas espécies fúngicas, impondo uma limitação ao reconhecimento por parte do D-CAR.

A capacidade dos fungos de remodelarem as moléculas de superfície, fato intensificado pelo estresse causado no sítio de infecção, é fator crítico na disponibilidade de acesso aos alvos na superfície das células fúngicas na racionalização do desenvolvimento de novos CARs. Considerando *Cryptococcus* spp., os epítomos presentes na parede celular são mascarados pela capsula polissacarídica e atua no mecanismo de escape do fungo frente ao reconhecimento por células da

imunidade (ZARAGOZA, 2019). Para superar esse obstáculo, o polissacarídeo GXM se tornou um importante alvo na construção de um CAR, pelo motivo de sua expressão aumentada nos sítios de infecção e pela abundância de GXM na superfície de *Cryptococcus*. da Silva et al. (2020) desenvolveram o GXMR-CAR tendo GXM como alvo (DA SILVA et al., 2021), e como domínio de reconhecimento foi utilizado scFv originado do anticorpo monoclonal 18B7 caracterizado por Casadeval et al. (1998) (CASADEVALL et al., 1998). Os autores sintetizaram e acoplaram o domínio de ligação a GXM com um CAR de segunda geração, contendo IgG4 como *hinge*, CD28 como transmembrana e molécula co-estimuladora em associação com CD3 $\zeta$ . O GXMR-CAR mediou o reconhecimento de GXM solúvel de *C. neoformans* e quando incubado com leveduras de *C. neoformans*, induziu a ativação de células T, como visto pela produção de IFN- $\gamma$  e granzimas. Além disso, a infusão de células T GXMR-CAR positivas em camundongos NSG infectados com *C. neoformans* levou à diminuição da carga fúngica pulmonar em comparação ao grupo controle (DA SILVA et al., 2021). Como mencionado em tópicos anteriores, o GXM presente na cápsula de *Cryptococcus* pode apresentar alto grau de variabilidade estrutural dependendo da espécie e das condições ambientais presentes no sítio de infecção, além do tamanho e espessura da cápsula polissacarídica serem modulados, como caracterizado na formação de células titans. Nesse sentido, explorando as propriedades de reconhecimento do GXMR-CAR, nosso grupo demonstrou a alta capacidade do GXMR-CAR em mediar o reconhecimento de *C. neoformans* e *C. gattii* induzidos à titanização, ou seja, com aumento da espessura da cápsula (DOS SANTOS et al., 2021). Reforçado pelos promissores resultados demonstrados pelo GXMR-CAR, o uso dessa tecnologia frente a criptococose indica a necessidade de compreender as particularidades do GXMR-CAR de forma a otimizar a sua funcionalidade em resposta a interação com as leveduras de *Cryptococcus* spp., sendo esse o objetivo principal da presente dissertação.

Objetivos

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar comparativamente os efeitos funcionais da modificação das regiões *hinge*, transmembrana e co-estimulatória de GXMR-CAR expressos em células T e NK no reconhecimento e controle da infecção por *Cryptococcus* spp.

### 2.2 Objetivos específicos

- Produção de partículas lentivirais contendo a sequências de GXMR-8-BB $\zeta$ , GXMR-8-28 $\zeta$  e GXMR-IgG4-28 $\zeta$
- Transdução de células Jurkat com GXMR-8-BB $\zeta$ , GXMR-8-28 $\zeta$  ou GXMR-IgG4-28 $\zeta$
- Validar em células Jurkat a expressão de GXM-CAR na superfície celular e reconhecimento frente a GXM solúvel e leveduras inativadas de *C. gattii* R265 e *C. neoformans* H99
- Avaliar a ativação das células modificadas por meio da dosagem da citocina IL-2
- Transdução em células NK-92 com GXMR-8-BB $\zeta$ , GXMR-8-28 $\zeta$  ou GXMR-IgG4-28 $\zeta$  e enriquecimento das populações modificadas
- Avaliar a ativação de células NK-92 modificadas sobre os efeitos fungicidas e fungistático frente a leveduras de *C. gattii* R265 e *C. neoformans* H99

Materiais e Métodos/Resultados

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS/RESULTADOS**

#### **3.1 Capítulo I**

**Título:** *Titan Cells and Yeast Forms of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii Are Recognized by GXMR-CAR*


**Autores:** Matheus Henrique dos Santos, Michele Procópio Machado, Pappanaicken R. Kumaresan e Thiago Aparecido da Silva.

**Periódico:** *Microorganisms* 2021, 9 (9), 1886; DOI: 10.3390/microorganisms9091886



Communication

# Titan Cells and Yeast Forms of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Are Recognized by GXMR-CAR

Matheus Henrique dos Santos <sup>1</sup>, Michele Procópio Machado <sup>1</sup>, Pappanaicken R. Kumaresan <sup>2</sup>  
and Thiago Aparecido da Silva <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 140490-900, SP, Brazil; matheus.zeit@outlook.com (M.H.d.S.); michele\_procopio@hotmail.com (M.P.M.)

<sup>2</sup> Department of Lymphoma and Myeloma, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA; pkumaresan@mdanderson.org

\* Correspondence: sthiagoap@gmail.com or sthiagoap@usp.br; Tel.: +55-16-3315-3049

**Abstract:** Cryptococcosis, a systemic mycosis that affects both the immunocompromised and immunocompetent, is caused by the inhalation of dehydrated yeasts or fungal spores of *Cryptococcus gattii* or *Cryptococcus neoformans*. The *Cryptococcus* spp. polysaccharide capsule is composed mainly of glucuronoxylomannan—GXM, its major virulence factor. The capsule thickness increases to more than 15 µm during titanization, favoring the pathogenesis of cryptococcosis. Previous studies demonstrated that cytotoxic T cells that had been bioengineered with GXM-targeting chimeric antigen receptor (GXMR-CAR) were able to recognize *C. neoformans* by promoting the control of titanization. GXMR-CAR, a second-generation CAR, contains a single-chain variable fragment that originates from a 18B7 clone: a human IgG4 hinge, followed by a human CD28 (transmembrane/cytoplasmic domains) and a CD3ζ chain. In the current study, we redirected T cells to target distinct *C. neoformans* and *C. gattii* cell types by GXMR-CAR. Lentiviral particles carrying the GXMR-CAR sequence were used to transduce Jurkat cells, and these modified cells interacted with the GXM of the *C. gattii* R265 strain. Moreover, GXMR-CAR mediated the recognition of *C. gattii* and *C. neoformans* yeasts with both thin and thick polysaccharide capsules, and GXMR-CAR Jurkat cells interacted with titan cells sourced from both *Cryptococcus* spp. Thus, bioengineered cells using CAR can improve the treatment of cryptococcosis.

**Keywords:** chimeric antigen receptor; *Cryptococcus* spp.; glucuronoxylomannan; cell therapy



**Citation:** dos Santos, M.H.; Machado, M.P.; Kumaresan, P.R.; da Silva, T.A. Titan Cells and Yeast Forms of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Are Recognized by GXMR-CAR. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1886. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091886>

Academic Editors: Ana Paula Arez and Marcia Medeiros

Received: 14 August 2021

Accepted: 1 September 2021

Published: 5 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by the inhalation of dehydrated yeasts or fungal spores of *Cryptococcus* spp., which enter the lungs and reach the alveoli [1]; its global incidence is estimated to be approximately 220,000 cases annually of *Cryptococcus neoformans* infection, with 181,000 deaths [2]. The *Cryptococcus* genus contains more than 30 species, but only *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* are clinically relevant because of their ability to affect both immunocompetent and immunocompromised individuals, respectively [3]. In immunocompromised hosts, cryptococcosis can lead to pneumonia. Latent infection with *Cryptococcus* spp. can present in otherwise immunocompetent individuals, and immunosuppression-related events may reactivate the infection [4]. *C. neoformans* has a predilection for the central nervous system, whereas *C. gattii* is detected in the majority of pulmonary tissue [5].

*Cryptococcus* spp.'s polysaccharide capsule, which is composed mainly of glucuronoxylomannan (GXM) (90–95%), glucuroxylomanogalactan (5–8%), and mannoproteins (1%) [6], surrounds the fungal cell body and is the major virulence factor [7]. The capsule's polysaccharide composition allows the pathogen to resist dehydration, inhibit phagocytosis, and



protect the cells against reactive oxygen species released by the host [8]. GXM has a molecular mass of 1700–7000 kDa [6,9], and all serotypes are composed of a linear main-chain of  $\alpha$ -(1,3)-mannan, with  $\beta$ -(1,2)-glucuronic acid residues linked to the first mannose, forming a basic core. Mannosyl residues can be 6-O-acetylated and replaced by xylose units in  $\beta$ -(1,2) or  $\beta$ -(1,4), resulting in different serotypes. The xylose, mannose, glucuronic acid, and mannose residues are found in different molar ratios depending on the serotype [6]. The structure of *C. gattii* GXM contains an additional xylose residue compared to *C. neoformans* GXM [10].

The thickness of the polysaccharide capsule affects *Cryptococcus* spp. pathogenesis [11] and is regulated by the host–pathogen interaction and distinct environmental stimuli, such as osmolarity, pH, CO<sub>2</sub> availability, nutrient concentration, and temperature [9]. *Cryptococcus* spp. yeasts grown on Sabouraud Dextrose (SD) medium have a thin and uniformly sized capsule [12]. In vitro studies have demonstrated that a thick capsule is induced by a CO<sub>2</sub>-rich atmosphere, low concentrations of iron, lower glucose levels, and low pH. The high concentration of iron in the brain favors a thinner capsule size [13]. Within hours of *Cryptococcus* spp. infection, the polysaccharide capsule thickness increases [12]. In addition, depending on the location within the host, the thickness of the *Cryptococcus* spp. capsule is distinct, and the capsule diameter in the lungs is larger than that in the brain [12].

*Cryptococcus* spp. yeasts usually have a diameter of 4–7  $\mu$ m, and the inhalation of the yeast by the host initiates morphological changes in yeast size, with reported cell diameters of 100  $\mu$ m [14,15]. Titan cells have a diameter larger than 15  $\mu$ m; they contribute to virulence through resistance to stress factors and inhibition of phagocytosis [16]. These factors contribute to the pathogenesis of *Cryptococcus* spp. [15,16]. The titanization process can be controlled by cytotoxic T cells using an engineered chimeric antigen receptor (CAR) that targets GXM expressed on the cell surface of *C. neoformans*, as reported by da Silva et al. [17]. The authors demonstrated that T cells expressing a GXM-specific CAR (GXMR-CAR) containing a single-chain variable fragment from a 18B7 clone were able to target GXM, decreasing the percentage of titan cells at the *C. neoformans* infection site.

The present study determined whether GXMR-CAR, a second-generation CAR that contains a modified human IgG4 hinge, followed by a human CD28 (transmembrane and cytoplasmic domains) and a CD3 $\zeta$  chain [17], could redirect T cells to target distinct *C. neoformans* and *C. gattii* cell types in a Jurkat cell line. We demonstrated that *Cryptococcus* spp. with distinct polysaccharide capsule thicknesses and even titan cells are recognized by GXMR-CAR T cells. These data reinforce the use of CAR T cells to target *Cryptococcus* spp.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Heat-Killed *C. gattii* and *C. neoformans* Cells

The *C. gattii* R265 (VGII molecular genotype) and *C. neoformans* H99 (serotype A) yeast strains were recovered from  $-80$  °C (20% glycerol stock; Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) and grown overnight in SD broth or yeast nitrogen base (YNB) medium at 30 °C with continuous agitation (150 rpm) for 20 h. The cells were harvested and washed in phosphate-buffered saline (PBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and *C. gattii* and *C. neoformans* were resuspended in PBS. These cells were heat-killed and inactivated at 70 °C for 50 min, and the yeast concentrations were determined using a Neubauer chamber (Precicolor HBG, Giessen-Lützellinden, Germany).

### 2.2. Generation of *Cryptococcus* spp. Titan Cells

Titan cells were generated as reported by Trevijano-Contador et al. [15,18]. In brief, yeasts were grown for 24 h in SD broth, and  $5 \times 10^4$ /mL cells were inoculated in 6-well plates containing titan cell medium, which is composed of 5% SD and 5% fetal bovine serum diluted in 50 mM of 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (pH of 7.3) and 15  $\mu$ M of sodium azide. The yeasts were maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h, and the formation of titan cells was determined by optical microscopy (Nikon, Tokyo, Japan).

### 2.3. Construction of CAR Targeting *Cryptococcus* spp., GXMR-CAR

The design and construction of GXMR-CAR to target *Cryptococcus* spp. was reported by da Silva et al. [17]. The GXM-binding domain localized in the extracellular portion consists of a single-chain variable fragment (scFv) of the anti-GXM mAb 18B7 clone, which was generated by Casadevall et al. [19]. GXMR-CAR has a modified human IgG4 hinge and Fc regions, followed by CD28 transmembrane and co-stimulatory domains and the signaling domain of CD3 $\zeta$ .

### 2.4. Lentiviral Particle Production

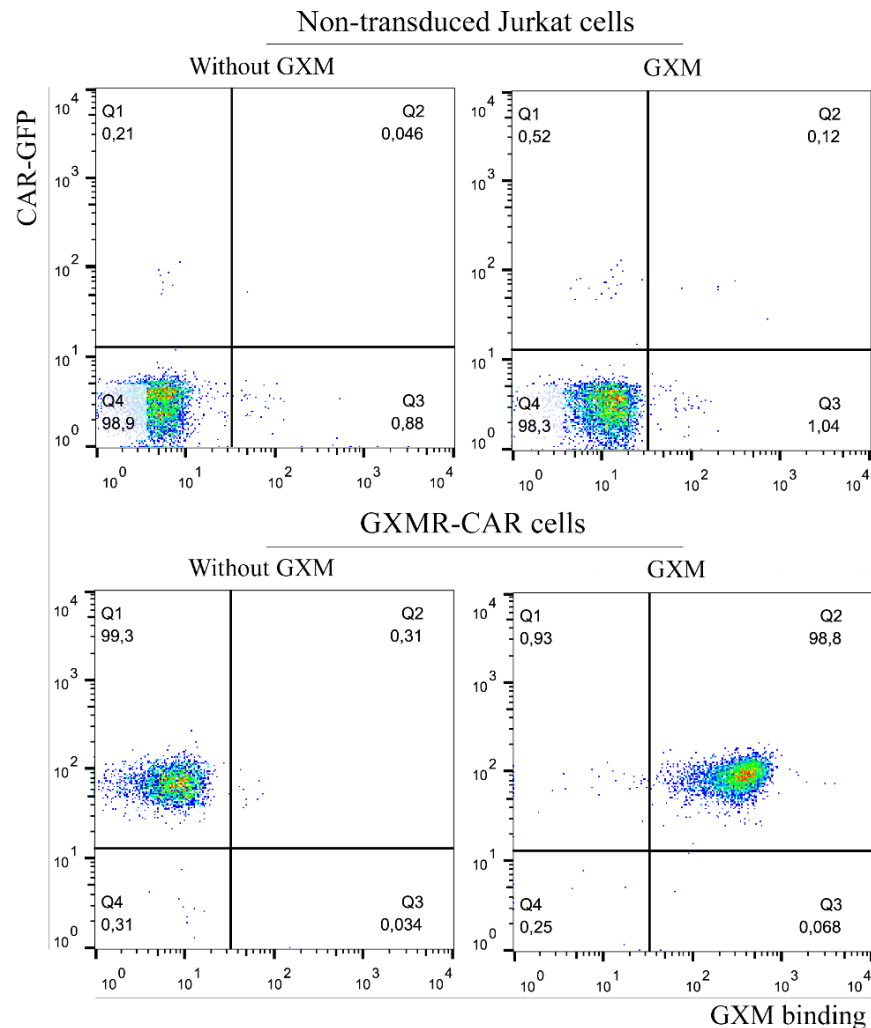
GXMR-CAR cloned into a lentiviral vector (Addgene; cat. no. 61422) was used to transfect HEK-293T cells, and pMD2.G (VSV-G envelope-expressing plasmid cat. no. 12259; Addgene, Watertown, MA, USA) and psPAX2 (second-generation lentiviral packaging plasmid cat. no. 12260; Addgene, Watertown, MA, USA) accessory plasmids were also considered for transfection of HEK-293T cells ( $1 \times 10^6$ /well) in 6-well plates with these plasmids using Lipofectamine (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Cell supernatant containing GXMR-CAR<sup>+</sup> viral particles was collected 24, 48, and 72 h after transfection, and the pool of lentiviral particles was centrifuged (300 $\times$ g at room temperature for 10 min) and filtrated (polyvinylidene difluoride syringe filter, 0.45  $\mu$ m; Kasvi, São José dos Pinhais, Brazil). Aliquots were frozen at  $-80$  °C.

### 2.5. Generation of GXMR-CAR Jurkat Cells by Transduction

Transduction of Jurkat cells to express GXMR-CAR used  $5 \times 10^4$  cells/well seeded in 24-well plates with lentiviral particles at 1:2 dilution, as described above. Five days after transduction, the Jurkat cells that were positive for green fluorescent protein (GFP) were sorted (BD FACSAria III) for enrichment. GXMR-CAR<sup>+</sup> Jurkat cells were expanded in RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Corning), 1 mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA). Isolation of a homogeneous cell population that expressed GXMR-CAR on the cell surface was performed by limiting dilution in 96-well plates, as reported by Greenfield [20]. For this, starting from a solution of 8 cells/mL, 100  $\mu$ L/well were seeded in 96-well plates; after 2 days, the cells were fed with 100  $\mu$ L of RPMI 1640 medium. Every 2 days, 100  $\mu$ L of RPMI 1640 medium were replaced with fresh medium, and the entire GFP-expressing cell population was evaluated for cell surface GXMR-CAR expression by detection of soluble GXM using flow cytometry, as described in the next subsection. A homogeneous GXMR-CAR-expressing cell population was isolated, and almost the entire cell population had GXMR-CAR on cell surface expression, as shown in Figure 1B (98.8% of double-positive cells for GFP and PE).

### 2.6. Detection of GXMR-CAR on the Cell Surface by Flow Cytometry

Soluble GXM was obtained from *C. gattii*, as reported by Wozniak and Levitz [21], at a concentration of 200  $\mu$ g/mL; it was incubated with GXMR-CAR Jurkat cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) for 40 min. Cells were washed to remove unbound GXM, and murine anti-GXM monoclonal antibody (18B7 clone; Merck) was incubated with GXMR-CAR Jurkat cells for 45 min on ice. The cells were washed with cold PBS and incubated with goat anti-mouse IgG biotin-conjugated secondary antibody for 45 min. After the cells were washed, streptavidin-conjugated phycoerythrin (PE) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added, and after 30 min, the cells were washed and analyzed using flow cytometry (Millipore Guava Easycyte Mini, Burlington, MA, USA). All the above steps were also performed with non-transduced Jurkat cells to demonstrate the absence of non-specific GXM binding. The data obtained were analyzed using the FlowJo™ software (version 10, for Windows; Ashland, OR, USA: Becton, Dickinson and Company; 2019).



**Figure 1.** Interaction of GXMR-CAR cells with soluble GXM from *C. gattii* R265. A total of  $5 \times 10^5$  cells of GXMR-CAR and non-transduced Jurkat cells were incubated with soluble GXM (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtained from *C. gattii*. The detection of cell surface GXM was performed after incubation with murine anti-GXM antibody, followed by biotin-labeled goat anti-mouse IgG and streptavidin- phycoerythrin. GFP-expressing GXMR-CAR cells are visualized on the y-axis, and GXM binding is observed on the x-axis by PE fluorophore after acquisition by flow cytometry.

### 2.7. Interaction of GXMR-CAR<sup>+</sup> Cells and *Cryptococcus* spp. by Fluorescence Microscopy

The heat-killed *C. gattii* or *C. neoformans* cells ( $5 \times 10^5$  cells/mL) generated from yeast or titan cells were labeled with Calcuofluor-white (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA, cat. no. 18909) at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 30 min. Yeast or titan cell forms were incubated with GXMR-CAR<sup>+</sup> Jurkat cells or non-transduced Jurkat cells at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells/mL in 96-well plates, and the GXMR-CAR:*Cryptococcus* spp. ratio was 1:1. The co-culture was incubated for 5 h at 37 °C, and fluorescence microscopy (Leica MI400B, Wetzlar, Germany) was used to visualize the interaction between GXMR-CAR cells (GFP, green) and yeast or titan cell forms (Calcuofluor, blue) at 200 $\times$  magnification.

## 3. Results

### 3.1. GXMR-CAR Interacts with Soluble GXM of *C. gattii* R265

The major virulence factor of *Cryptococcus* spp. is a polysaccharide capsule that confers protection against the host immune system, and GXM is a major cryptococcal capsule component. This polysaccharide results in small differences in the monosaccharide composition of *Cryptococcus* spp. In the current study, we evaluated the capacity of GXMR-

CAR to bind to the GXM of *C. gattii* R265; as reported by da Silva et al., GXMR-CAR interacts with GXM of *C. neoformans* H99 [17]. To investigate the recognition of the GXM in *C. gattii* R265 by GXMR-CAR, lentiviral particles carrying the GXMR-CAR sequence were used to transduce Jurkat cells, generating a stable GXMR-CAR Jurkat cell line. The GXM of *C. gattii* R265 was incubated with the GXMR-CAR Jurkat cells, and the interaction between GXM and GXMR-CAR was detected using an approach that was previously reported by da Silva et al. [17], which is presented in Figure 1. GFP-labeled GXMR-CAR Jurkat cells interacted with soluble GXM, as detected by murine anti-GXM antibody, followed by biotin-labeled goat anti-mouse IgG and streptavidin-PE. The cells stained with GFP and PE (double-positive) demonstrated recognition of soluble GXM by GXMR-CAR, whereas non-transduced Jurkat cells did not bind to soluble GXM (Figure 1).

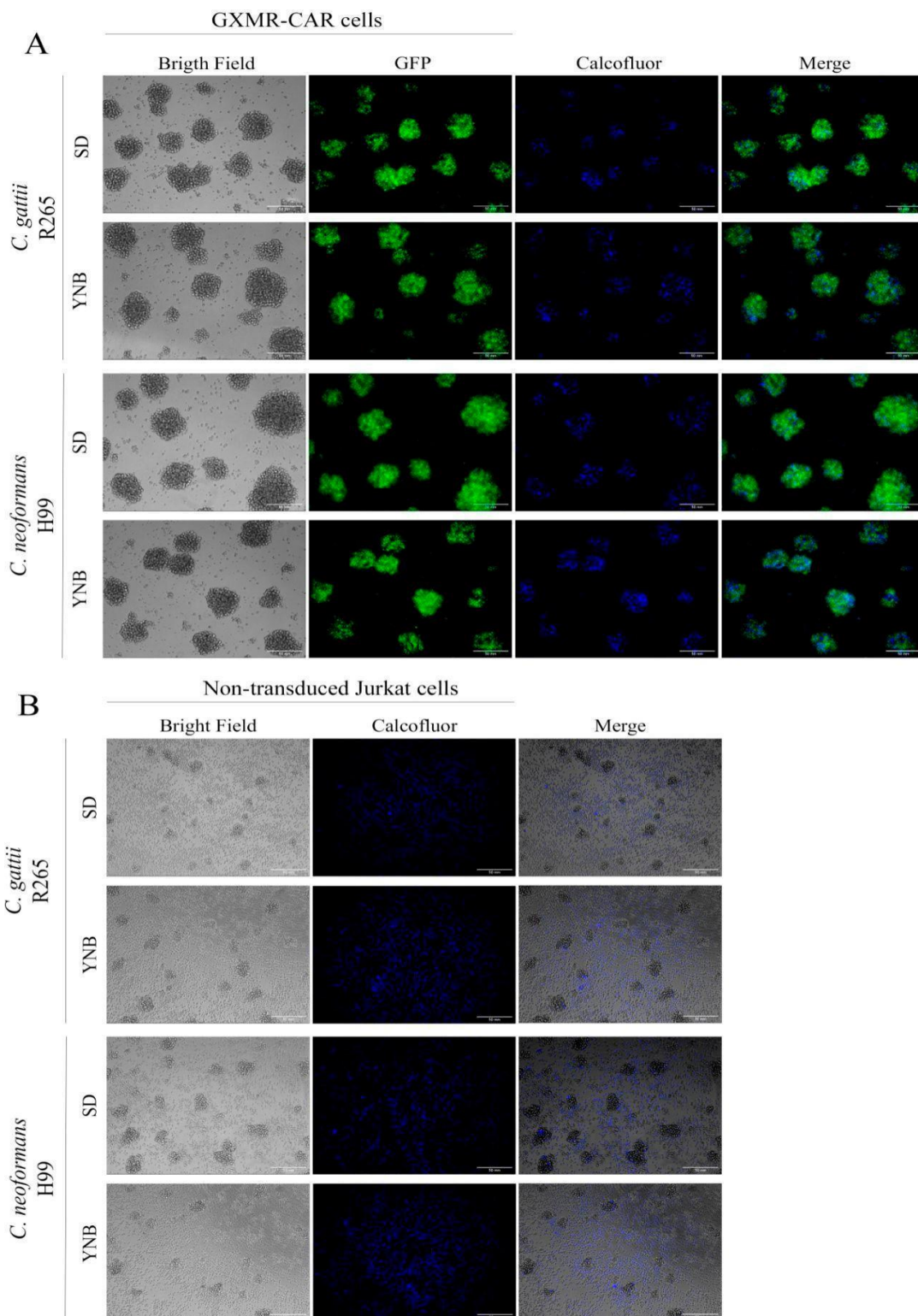
### 3.2. GXMR-Car Redirects Jurkat Cells to Recognize the Yeast Form of *C. neoformans* and *C. gattii*

Considering that GXMR-CAR Jurkat cells bind to soluble GXM, we investigated the redirection of Jurkat cells by GXMR-CAR to target the yeast form of *C. gattii* and *C. neoformans*. Moreover, the effect of the thickness of the capsule of *Cryptococcus* spp. in the recognition by GXMR-CAR was also evaluated using *C. gattii* and *C. neoformans* grown in SD or YNB medium, which yielded thin and thick capsules, respectively. The yeasts in a co-culture with GXMR-CAR Jurkat or non-transduced cells were heat-killed and stained with Calcofluor-white, and their interaction was analyzed by fluorescence microscopy.

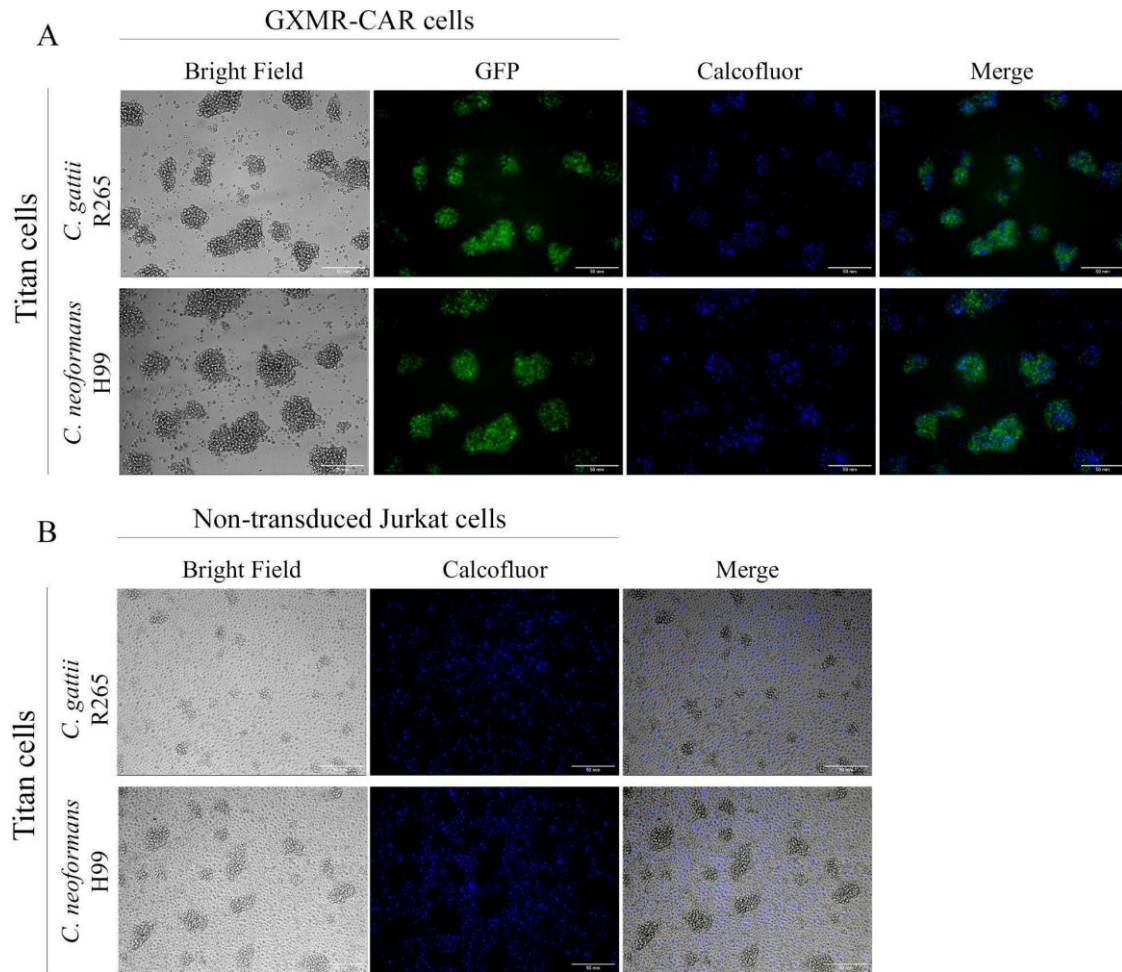
As shown in Figure 2A, GXMR-CAR Jurkat cells interacted with *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99, which was demonstrated by the aggregation between GXMR-CAR Jurkat cells (GFP, green) and yeast forms (Calcofluor, blue). Moreover, GXMR-CAR Jurkat cells interacted with the yeast form grown in SD or YNB medium, whereas the non-transduced cells did not induce the aggregation of yeasts into clusters of Jurkat cells (Figure 2A,B). Then, *Cryptococcus* spp. yeasts are colocalized with the clusters of GXMR-CAR Jurkat cells, whereas most of the yeasts are around the non-transduced Jurkat cells (Figure 2). These findings demonstrate that GXMR-CAR allows the redirection of Jurkat cells to target *Cryptococcus* spp. with distinct capsule sizes.

### 3.3. *Cryptococcus* spp. Titan Cells Are Targeted by GXMR-CAR

The *Cryptococcus* spp. are able to produce titan cells that are useful for escaping host immune response, which is a major concern in the treatment of cryptococcosis. Titan cell formation is an important virulence factor that inhibits the activity of phagocytes. The current study evaluated the capacity of GXMR-CAR to redirect T cells to target titan cells. Titan cells were formed using the TCM (Titan cell medium), as described above, and heat-killed titan cells of *C. gattii* and *C. neoformans* were stained with Calcofluor-white before incubation with GXMR-CAR Jurkat cells or non-transduced Jurkat cells. The aggregation between GXMR-CAR Jurkat cells and titan cells was demonstrated using fluorescence microscopy, and GXMR-CAR redirected Jurkat cells to interact with titan cells sourced from both *Cryptococcus* spp. studied (Figure 3A). These data are supported by the absence of aggregation between non-transduced Jurkat cells and titan cells, as evidenced by cell clusters surrounded by *Cryptococcus* spp. (Figure 3B). These results, taken together, demonstrate a strong capacity of GXMR-CAR to redirect Jurkat cells to target GXM localized in distinct *C. gattii* and *C. neoformans* cell types.



**Figure 2.** In vitro recognition of *C. gattii* and *C. neoformans* by GXMR-CAR cells. GXMR-CAR and non-transduced Jurkat cells were incubated with heat-killed *C. gattii* R265 or *C. neoformans* H99 yeasts grown in sabouraud dextrose (SD; thin capsule) or yeast nitrogen base (YNB; thick capsule) medium. Yeasts were labeled with Calcofluor-white and incubated with the cells for 5 h in a 1:1 ratio; the interaction was evaluated using fluorescence microscopy. The images were acquired at 200× magnification. **(A)** GXMR-CAR cells and yeasts (bright field), GXMR-CAR cells (green, GFP), yeasts (blue, calcofluor), and their interaction (merge). **(B)** Non-transduced Jurkat cells and yeasts (bright field), and yeasts (blue, calcofluor), and their interaction (merge).



**Figure 3.** In vitro recognition of *Cryptococcus* spp. titan cells by GXMR-CAR. *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99 cells were grown overnight in a titan cell medium to generate titan cells. The yeasts were heat-killed and labeled with calcofluor, and GXMR-CAR or non-transduced Jurkat cells were co-cultured with titan cells for 5 h in a 1:1 ratio. The interaction was visualized in fluorescence microscopy, and the images were acquired at 200 $\times$  magnification. (A) GXMR-CAR cells and titan cells (bright field), GXMR-CAR cells (green, GFP), and titan cells (blue, calcofluor), and their interaction (merge). (B) Non-transduced Jurkat cells and titan cells (bright field), titan cells (blue, calcofluor), and their interaction (merge).

#### 4. Discussion

CAR T cell therapy is a promising option for the treatment of infectious diseases and invasive fungal infections [17,22–26]. GXMR-CAR was found to interact with GXM of the capsule of *Cryptococcus* spp., and the biological activity of GXMR against *C. neoformans* was also investigated [17]. The capsule polysaccharide of *C. neoformans* has small differences in the composition of monosaccharide compared to *C. gattii*, which reinforce the need to evaluate the recognition of GXM of the capsule of *Cryptococcus* spp. by GXMR-CAR. In addition, the capsule thickness and titan cells and yeast forms of *Cryptococcus* spp. present clinical relevance, as previously reported that the growth of the polysaccharide capsule was found to be associated with increased intracranial pressure in cases of cryptococcal meningitis [27]. In the current study, we assessed the capacity of GXMR-CAR to target GXM expressed in titan cells and yeast forms of *C. gattii* (R265) and *C. neoformans* (H99). Jurkat cells were modified by lentiviral transduction to express GXMR-CAR, and the yeast forms of R265 and H99 strains with a distinct polysaccharide capsule thickness were recognized by GXMR-CAR as well as by soluble GXM (Figures 1 and 2). Interestingly, the single-chain variable fragment domain of GXMR-CAR redirected Jurkat cells to interact

with titan cells generated from *C. gattii* and *C. neoformans* (Figure 3), indicating that GXM is targeted by GXMR-CAR under distinct conditions.

The murine monoclonal antibody 18B7 was initially developed to target GXM from *C. neoformans* [19]; GXM has considerable heterogeneity, as seen in the structural variations that are used to classify *Cryptococcus* serotypes [28]. The variations in the GXM structure depend on the position of the xylose residues and O-acetyl groups that are attached to the  $\alpha$ -(1-3) mannan backbone [29]; in addition, environmental conditions can influence the pattern of modifications in GXM. Urai et al. [10] reported that differences in the O-acetylation of GXM decreased the affinity of anti-GXM antibodies. Moreover, isolated GXM fractions from the hypervirulent *C. gattii* JP02 strain induced lower levels of pro-inflammatory cytokines in dendritic cells than did those from the *C. neoformans* H99 strain, and the GXM of the JP02 strain was poorly recognized by dendritic cells [10]. These findings support the importance of GXM recognition in initiating an effector immune response over time during *Cryptococcus* spp. infection. In the current study, we demonstrated that GXMR-CAR Jurkat cells recognize soluble GXM from *C. gattii* R265 (Figure 1), and a previous study reported the capacity of GXMR-CAR to bind to *C. neoformans* H99 [17]. These data reinforce the recognition of GXM from distinct sources by GXMR-CAR; further studies should investigate the interaction between GXMR-CAR and GXM purified from clinical isolates of *Cryptococcus* spp.

The *Cryptococcus* spp. capsule is dynamic, which we accounted for in our evaluation of GXMR-CAR's ability to recognize *Cryptococcus* spp. yeast with different polysaccharide capsule thicknesses. The capsule is the major virulence factor of *Cryptococcus* spp., and its thickness can undergo rearrangement during cryptococcosis, in which the *Cryptococcus* spp. changes the capsule composition and thickness in a microenvironment-dependent manner [12]. In this context, microenvironmental conditions can cause chemical changes in the GXM molecule, impairing the recognition of yeasts by the host immunity receptors. In the current work, we cultured *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99 strains in YNB and SD medium, which resulted in thick and thin capsules, respectively. Our results demonstrated that GXMR-CAR Jurkat cells were able to target *C. gattii* and *C. neoformans* grown in YNB and SD medium. These data reinforce the affinity of GXMR-CAR to the capsule polysaccharide of *Cryptococcus* spp., leading to new perspectives on the development of GXMR-CAR with distinct hinge/transmembrane domains to evaluate its impact on the recognition of *Cryptococcus* spp. The evaluation of GXMR-CAR with distinct hinge/transmembrane domains should be considered because of the predilection for the CD8 molecule as the hinge/transmembrane portion [17]. An intracellular domain could be investigated to optimize GXMR-CAR T cell function. These factors are required to develop immunotherapy using adoptive T cells to treat invasive fungal infections.

The process of titanization of *Cryptococcus* spp. makes it challenging to treat cryptococcosis using antifungal drugs or immunotherapy approaches. Thus, GXMR-CAR should be able to redirect modified Jurkat cells to target titan *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99 cells; in the current study, we demonstrated that Jurkat cells expressing GXMR-CAR bind to the titanized form of fungi. The in vitro process of titanization of *Cryptococcus* spp. was established by Trevijano-Contador et al. [18], and a fluorescence microscopy analysis showed that the interaction between GXMR-CAR Jurkat cells and the yeast form was more pronounced than those incubated with titan cells. Several studies have described some structural differences between the capsules of yeast and titan forms [30,31] that changed the epitope presentation on the surface of yeast, compromising recognition by mAbs [4]. This behavior is associated with the inhibition of phagocytosis by antigen-presenting cells, which contributes to the progression and persistence of cryptococcosis [32,33]. Silva and collaborators [17] demonstrated that GXMR-CAR T cells decreased the size and number of titan cells in the lungs of mice infected with *C. neoformans*, demonstrating the potential protection mediated by GXMR-CAR T cells against cryptococcosis. Further studies are focused on the redirection of T cells to the lungs by GXMR-CAR over time during the

*C. gattii* and *C. neoformans* infection, and also novel GXMR-CAR composed of the distinct hinge/transmembrane and signal transduction domains will be considered.

## 5. Conclusions

In conclusion, our findings demonstrate the ability of GXMR-CAR to redirect T cells to target the *C. gattii* R265 yeast as well as the titan cells from both *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99, which reveal an advantage of CAR T cell therapy against cryptococcosis.

**Author Contributions:** Conceptualization, T.A.d.S.; methodology, M.H.d.S. and T.A.d.S.; software, M.H.d.S.; writing—original draft preparation, M.H.d.S. and M.P.M.; writing—review and editing, M.H.d.S., T.A.d.S., P.R.K. and M.P.M.; supervision, T.A.d.S.; funding acquisition, T.A.d.S., P.R.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Grant Nos. 2018/18538-0; 2019/26074-7; 2020/09113-6; 2020/11307-3), and Junior faculty incentive, MD Anderson Cancer Center was used for this work.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The study did not report any data.

**Acknowledgments:** We thank Ann Sutton, Scientific Editor, and Ashli Nguyen-Villarreal, Associate Scientific Editor, in the Research Medical Library at The University of Texas MD Anderson Cancer Center, for editing this article.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Gullo, F.P.; Rossi, S.A.; Jde, C.S.; Teodoro, V.L.; Mendes-Giannini, M.J.; Fusco-Almeida, A.M. Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *32*, 1377–1391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rajasingham, R.; Smith, R.M.; Park, B.J.; Jarvis, J.N.; Govender, N.P.; Chiller, T.M.; Denning, D.W.; Loyse, A.; Boulware, D.R. Global burden of disease of hiv-associated cryptococcal meningitis: An updated analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 873–881. [[CrossRef](#)]
- Maziarz, E.K.; Perfect, J.R. Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2016**, *30*, 179–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Probert, M.; Zhou, X.; Goodall, M.; Johnston, S.A.; Bielska, E.; Ballou, E.R.; May, R.C. A glucuronoxylomannan epitope exhibits serotype-specific accessibility and redistributes towards the capsule surface during titanization of the fungal pathogen cryptococcus neoformans. *Infect. Immun.* **2019**, *87*, e00731-18. [[CrossRef](#)]
- Gao, L.W.; Jiao, A.X.; Wu, X.R.; Zhao, S.Y.; Ma, Y.; Liu, G.; Yin, J.; Xu, B.P.; Shen, K.L. Clinical characteristics of disseminated cryptococcosis in previously healthy children in china. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cherniak, R.; Sundstrom, J.B. Polysaccharide antigens of the capsule of cryptococcus neoformans. *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 1507–1512. [[CrossRef](#)]
- Zaragoza, O. Basic principles of the virulence of cryptococcus. *Virulence* **2019**, *10*, 490–501. [[CrossRef](#)]
- Zaragoza, O.; Rodrigues, M.L.; De Jesus, M.; Frases, S.; Dadachova, E.; Casadevall, A. The capsule of the fungal pathogen cryptococcus neoformans. *Adv. Appl. Microbiol.* **2009**, *68*, 133–216. [[PubMed](#)]
- Wang, Z.A.; Li, L.X.; Doering, T.L. Unraveling synthesis of the cryptococcal cell wall and capsule. *Glycobiology* **2018**, *28*, 719–730. [[CrossRef](#)]
- Urai, M.; Kaneko, Y.; Ueno, K.; Okubo, Y.; Aizawa, T.; Fukazawa, H.; Sugita, T.; Ohno, H.; Shibuya, K.; Kinjo, Y.; et al. Evasion of innate immune responses by the highly virulent cryptococcus gattii by altering capsule glucuronoxylomannan structure. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2015**, *5*, 101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- O'Meara, T.R.; Alspaugh, J.A. The cryptococcus neoformans capsule: A sword and a shield. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, *25*, 387–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zaragoza, O.; Casadevall, A. Experimental modulation of capsule size in cryptococcus neoformans. *Biol. Proced. Online* **2004**, *6*, 10–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rivera, J.; Feldmesser, M.; Cammer, M.; Casadevall, A. Organ-dependent variation of capsule thickness in cryptococcus neoformans during experimental murine infection. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 5027–5030. [[CrossRef](#)]
- Gerstein, A.C.; Fu, M.S.; Mukaremera, L.; Li, Z.; Ormerod, K.L.; Fraser, J.A.; Berman, J.; Nielsen, K. Polyploid titan cells produce haploid and aneuploid progeny to promote stress adaptation. *mBio* **2015**, *6*, e01340-15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



15. Trevijano-Contador, N.; de Oliveira, H.C.; Garcia-Rodas, R.; Rossi, S.A.; Llorente, I.; Zaballos, A.; Janbon, G.; Arino, J.; Zaragoza, O. Cryptococcus neoformans can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Dylag, M.; Colon-Reyes, R.J.; Kozubowski, L. Titan cell formation is unique to cryptococcus species complex. *Virulence* **2020**, *11*, 719–729. [[CrossRef](#)]
17. da Silva, T.A.; Hauser, P.J.; Bandey, I.; Laskowski, T.; Wang, Q.; Najjar, A.M.; Kumaresan, P.R. Glucuronoxylomannan in the cryptococcus species capsule as a target for chimeric antigen receptor t-cell therapy. *Cytotherapy* **2021**, *23*, 119–130. [[CrossRef](#)]
18. Trevijano-Contador, N.; Pianalto, K.M.; Nichols, C.B.; Zaragoza, O.; Alspaugh, J.A.; Pirofski, L.A. Human igm inhibits the formation of titan-like cells in cryptococcus neoformans. *Infect. Immun.* **2020**, *88*, e00046-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Casadevall, A.; Cleare, W.; Feldmesser, M.; Glatman-Freedman, A.; Goldman, D.L.; Kozel, T.R.; Lendvai, N.; Mukherjee, J.; Pirofski, L.A.; Rivera, J.; et al. Characterization of a murine monoclonal antibody to cryptococcus neoformans polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1437–1446. [[CrossRef](#)]
20. Greenfield, E.A. Single-cell cloning of hybridoma cells by limiting dilution. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2019**, *2019*, 726–728. [[CrossRef](#)]
21. Wozniak, K.L.; Levitz, S.M. Isolation and purification of antigenic components of cryptococcus. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *470*, 71–83. [[PubMed](#)]
22. Kumaresan, P.R.; Manuri, P.R.; Albert, N.D.; Maiti, S.; Singh, H.; Mi, T.; Roszik, J.; Rabinovich, B.; Olivares, S.; Krishnamurthy, J.; et al. Bioengineering t cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 10660–10665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bohne, F.; Chmielewski, M.; Ebert, G.; Wiegmann, K.; Kurschner, T.; Schulze, A.; Urban, S.; Kronke, M.; Abken, H.; Protzer, U. T cells redirected against hepatitis b virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 239–247. [[CrossRef](#)]
24. da Silva, T.A. Car t cell-therapy for infectious diseases with emphasis on invasive fungal infections. *Ther. Deliv.* **2021**, *12*, 627–630. [[CrossRef](#)]
25. Deeks, S.G.; Wagner, B.; Anton, P.A.; Mitsuyasu, R.T.; Scadden, D.T.; Huang, C.; Macken, C.; Richman, D.D.; Christopherson, C.; June, C.H.; et al. A phase ii randomized study of hiv-specific t-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Mol. Ther.* **2002**, *5*, 788–797. [[CrossRef](#)]
26. Sautto, G.A.; Wisskirchen, K.; Clementi, N.; Castelli, M.; Diotti, R.A.; Graf, J.; Clementi, M.; Burioni, R.; Protzer, U.; Mancini, N. Chimeric antigen receptor (car)-engineered t cells redirected against hepatitis c virus (hcv) e2 glycoprotein. *Gut* **2016**, *65*, 512–523. [[CrossRef](#)]
27. Garcia-Rodas, R.; Cordero, R.J.; Trevijano-Contador, N.; Janbon, G.; Moyrand, F.; Casadevall, A.; Zaragoza, O. Capsule growth in cryptococcus neoformans is coordinated with cell cycle progression. *mBio* **2014**, *5*, e00945-14. [[CrossRef](#)]
28. Kuttel, M.M.; Casadevall, A.; Oscarson, S. Cryptococcus neoformans capsular gxm conformation and epitope presentation: A molecular modelling study. *Molecules* **2020**, *25*, 2651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Casadevall, A.; Coelho, C.; Cordero, R.J.B.; Dragotakes, Q.; Jung, E.; Vij, R.; Wear, M.P. The capsule of cryptococcus neoformans. *Virulence* **2019**, *10*, 822–831. [[CrossRef](#)]
30. Hommel, B.; Mukaremera, L.; Cordero, R.J.B.; Coelho, C.; Desjardins, C.A.; Sturny-Leclere, A.; Janbon, G.; Perfect, J.R.; Fraser, J.A.; Casadevall, A.; et al. Titan cells formation in cryptococcus neoformans is finely tuned by environmental conditions and modulated by positive and negative genetic regulators. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1006982. [[CrossRef](#)]
31. Mukaremera, L.; Lee, K.K.; Wagener, J.; Wiesner, D.L.; Gow, N.A.R.; Nielsen, K. Titan cell production in cryptococcus neoformans reshapes the cell wall and capsule composition during infection. *Cell Surf.* **2018**, *1*, 15–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Okagaki, L.H.; Strain, A.K.; Nielsen, J.N.; Charlier, C.; Baltes, N.J.; Chretien, F.; Heitman, J.; Dromer, F.; Nielsen, K. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000953. [[CrossRef](#)]
33. Zaragoza, O.; Garcia-Rodas, R.; Nosanchuk, J.D.; Cuenca-Estrella, M.; Rodriguez-Tudela, J.L.; Casadevall, A. Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000945. [[CrossRef](#)]

**3.2 Capítulo II**

**Título:** *Modification of hinge/transmembrane and signal transduction domains improve the expression and signaling threshold of GXMR-CAR specific to Cryptococcus spp.*

**Autores:** Matheus Henrique dos Santos, Michele Procópio Machado, Pappanaicken R. Kumaresan e Thiago Aparecido da Silva.

**Periódico:** Submetido ao periódico “*Scientific Reports*”

# Modification of hinge/transmembrane and signal transduction domains improves the expression and signaling threshold of GXMR-CAR specific to *Cryptococcus* spp.

Matheus Henrique dos Santos<sup>1</sup>, Michele Procópio Machado<sup>1</sup>, Pappanaicken R. Kumaresan<sup>2</sup> and Thiago Aparecido da Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 140490-900, SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Hematopoietic Biology and Malignancy, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA

\*Correspondence: sthiagoap@gmail.com or sthiagoap@usp.br; Tel.: +55-16-3315-3049

## Abstract

Chimeric antigen receptors (CARs) redirect T cells to recognize a specific target. CAR components play a pivotal role in antigen specificity, structure stability, expression on cell surface, and induction of cellular activation, which together determine the success of CAR T-cell therapy. CAR products targeting B-cell lymphoma encouraged the development of new CAR applications beyond cancer. For example, our group developed a CAR to specifically target glucuronoxylomannan (GXM) in the capsule of *Cryptococcus* species, called GXMR-CAR or GXMR-IgG4-28 $\zeta$ . *Cryptococcus* are fungi that cause the life-threatening disease cryptococcosis, and GXMR-IgG4-28 $\zeta$  redirected T cells to target yeast and titan cell forms of *Cryptococcus* spp. Here, we replaced the IgG4-hinge and CD28-transmembrane domains from GXMR-CAR with a CD8 $\alpha$  molecule as hinge/transmembrane and used CD28 or 4-1BB molecules as co-stimulatory domains, creating GXMR-8-28 $\zeta$  and GXMR-8-BB $\zeta$ , respectively. Jurkat cells expressing GXMR-CAR containing CD8 $\alpha$  as hinge/transmembrane improved the CAR expression and induced a tonic signaling. GXMR-8-28 $\zeta$  and GXMR-8-BB $\zeta$  showed increased signaling strength in the presence of reference strains or clinical isolates of *C. neoformans* and *C. gattii*, and 4-1BB co-stimulatory domain triggered more pronounced cellular activation. Dasatinib, a tyrosine kinase inhibitor, attenuated the GXMR-CAR signaling cascade's engagement in the presence or absence of its ligand. This study optimized novel second-generation GXMR-CARs that improved CAR expression, antigen recognition, and signal strength in T-cell activation.

## Introduction

Chimeric antigen receptors (CARs) are recombinant receptor with the capacity to target any molecule by an antigen recognition domain that is commonly composed of a single-chain variable fragment (scFv) derived from a monoclonal antibody<sup>1</sup>. A CAR's non-antigen-binding extracellular region is composed of a hinge/spacer portion; immunoglobulin Fc, CD8 $\alpha$ , or CD28 molecules are commonly used for this purpose<sup>2</sup>. A CAR's transmembrane domain provides stability to the receptor and is available to associate with other cell surface proteins<sup>3</sup>; sequences derived from CD8 $\alpha$  and CD28 molecules are often adopted as transmembrane domains<sup>4</sup>. Signal transduction through the CAR receptor is guaranteed by fusion of the CD3 $\zeta$  cytoplasmic domain with a co-stimulatory domain, such as CD28 or 4-1BB, which characterizes a second-generation CAR design<sup>4</sup>.

The application of CAR T cells in immunotherapy for leukemia and lymphoma has revolutionized adoptive cell therapy. In 2017, the US Food and Drug Administration approved the first CAR T cell product manufactured to target B-cell lymphoma<sup>5</sup>. Major successes in oncology have led to many possibilities of using CAR to redirect immune cells to treat autoimmune diseases<sup>6</sup> and infections caused by viruses or fungi<sup>7</sup>. The importance of T cells and natural killer (NK) cells in antifungal immunity is well established<sup>8,9</sup>, and previous studies have demonstrated the capacity of CAR-modified cells to target invasive forms of *Aspergillus fumigatus* and *Cryptococcus* spp.<sup>10-12</sup>. Therefore, there is a growing scientific interest in the use of CARs against invasive fungal infections.

Among the fungal species responsible for invasive infections worldwide, *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* present a serious global health threat, with 220,000 cases of cryptococcosis and 180,000 related deaths reported annually<sup>13</sup>. Propagules or yeasts of *Cryptococcus* spp. reach the alveolar space after inhalation, culminating in pulmonary tissue infection, which is a predilection site for *C. gattii*, whereas *C. neoformans* has a predilection to disseminate to the central nervous system, where it causes cryptococcal meningitis<sup>14</sup>. Immunocompromised patients, such as those with HIV/AIDS, are mainly infected with *C. neoformans*, whereas the rate of immunocompetent individuals infected with *C. gattii* is greater<sup>15,16</sup>. The host immune response against *Cryptococcus* spp. is impaired by the polysaccharide capsule of yeast, which is considered to be the major virulence factor that subverts the development of adaptive immune response<sup>17</sup>. Glucuronoxylomannan (GXM) represents more than 90% of the capsule, and its structure is highly influenced by the microenvironment to confer resistance against oxygen and nitrogen reactive species in a host-pathogen interaction<sup>18</sup>. Moreover, the mannosyl residues in GXM can be acetylated or replaced by other sugar moieties; therefore, the GXM structure varies between *Cryptococcus* species, which compromises the phagocytic activity of antigen-presenting cells<sup>19,20</sup>. Unfortunately, the control of cryptococcosis progression is limited to the use of azole, polyene, and pyrimidine analogs, which are associated with adverse effects and increased resistance to antifungal drugs in *Cryptococcus* spp.<sup>21,22</sup>.

A promising strategy to treat fungal infections is to use adoptive T-cell therapies, which have the potential to be translated from bench to bedside<sup>23</sup>. The first attempt to engineer CAR T cells against invasive fungal infections considered the carbohydrate recognition domain of the Dectin-1 receptor, which has specificity to  $\beta$ -glucans and makes up the antigen recognition portion of CAR to target the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia<sup>10</sup>. The Dectin-1 CAR's construction and its expression by T cells allowed the control of conidium-hypha switching in *A. fumigatus*, compromising the progression of experimental aspergillosis<sup>10</sup>. A second CAR specific to invasive fungal infections was developed by our group to target GXM polysaccharides on the *Cryptococcus* spp. capsule using an antigen recognition domain derived from an anti-GXM monoclonal antibody (18B7 clone<sup>24</sup>)<sup>11</sup>. This novel second-generation CAR was designated GXMR-CAR and is composed of an IgG4 Fc-derived hinge, CD28 transmembrane and co-stimulatory signal transducer, and CD3 $\zeta$ . T cells expressing GXMR-CAR, when infused in mice infected with *C. neoformans*, reduced the frequency of titan cells in the pulmonary tissue<sup>11</sup>, and GXMR-CAR redirected T cells to recognize yeast and titan cell forms of *C. gattii* and *C. neoformans*<sup>12</sup>.

The threshold in CAR T cell activation can be affected by all portions of the CAR, and often the hinge/transmembrane (derived from IgG4-hinge or CD8 $\alpha$  molecules) and intracellular domains (derived from CD28 or 4-1BB molecules) play a pivotal role in CAR expression and cell activation, which impacts the final effect of CAR T cells against the target<sup>25</sup>. The purpose of the present study was to optimize second-generation GXMR-CARs to more effectively target *Cryptococcus* spp. Toward this aim, we generated novel GXMR-CARs by replacing IgG4-hinge and CD28-transmembrane with CD8-hinge/transmembrane, with CD28 or 4-1BB used as co-stimulatory domains followed by the CD3 $\zeta$  cytoplasmic domain. The original form of GXMR-CAR (GXMR-IgG4-28 $\zeta$ ) and GXMR-CAR-modified constructs (GXMR-8-28 $\zeta$  and GXMR-8-BB $\zeta$ ) were expressed in Jurkat cells after lentiviral transduction. The capacity of distinct GXMR-CAR constructs to mediate the activation of engineered

Jurkat cells in the presence of *C. gattii* or *C. neoformans* reference strains and clinical isolates was compared between GXMR-CAR constructs. In the GXMR-CAR-modified constructs, the CD8 $\alpha$  molecules as hinges/transmembranes improved CAR expression and mediated strong T cell activation. Moreover, 4-1BB, as a co-stimulatory domain, triggered a signal strength that was more pronounced in response to *Cryptococcus* spp. Further, dasatinib, an inhibitor of Src family kinases, attenuated GXMR-CAR signaling, indicating that Src family kinases are crucial in this pathway. These results were obtained using engineered Jurkat cells that demonstrated a feasible workflow to evaluate the signaling threshold of novel CAR constructs specific to *Cryptococcus* spp.

## Results

### **GXMR-CAR expression is improved by using CD8 $\alpha$ molecule as hinge/transmembrane domain**

Previous studies have demonstrated that GXMR-CAR-IgG4-CD28 $\zeta$  redirects Jurkat cells to bind to titan cells and yeast forms of *C. gattii* and *C. neoformans*, and soluble GXM extracted from *C. gattii* and *C. neoformans* is strongly recognized by GXMR-CAR-IgG4-CD28 $\zeta$ <sup>11,12</sup>. Seeking to improve the original form of GXMR-CAR, we initially replaced the hinge/transmembrane domain with the CD8 molecule (Figure 1b). This modification to the GXMR-CAR was followed by the insertion of distinct signal transduction domains that originated from GXMR-CD8 $\alpha$ -CD28-CD3 $\zeta$  (GXMR-8-28 $\zeta$ ) and GXMR-CD8 $\alpha$ -4-1BB-CD3 $\zeta$  (GXMR-8-BB $\zeta$ ), which contain CD28 and 4-1BB, respectively, as co-stimulatory molecules (Figure 1b). In this scenario, the impact of the hinge/transmembrane and intracellular regions in the modified GXMR-CAR was verified according to their transduction efficiency, cell expansion, and cell activation compared to the original form of GXMR-CAR. Jurkat cells were transduced with a multiplicity of infection (MOI) of 1 or 3 using lentiviral particles carrying a DNA sequence specific to the GXMR-CAR constructs cited above. The production of lentiviral particles is described in detail in the Materials and Methods section, and the schematic protocol in Figure 1a represents the 9-day workflow starting with the transfection of HEK 293T cells and ending with the lentivirus titer performed on Jurkat cells. The measurement of the lentivirus titer demonstrated a slight difference among GXMR-CAR constructs, which was not significant, and the transduction units per mL were maintained between 10<sup>7</sup> and 10<sup>8</sup> (Figure 1c). The transduction efficiency of GXMR-CAR constructs and their expression levels were determined by the percentage of green fluorescent protein (GFP)-positive cells and median fluorescence intensity (MFI), respectively. Transduction of Jurkat cells was performed using MOIs of 1 and 3, and as expected, the transduction efficiency of GXMR-CAR constructs was higher at an MOI of 3 (Figure 1d). The percentage of GFP-positive cells was significantly higher in Jurkat cells expressing GXMR-CAR containing CD8 $\alpha$ -hinge/transmembrane than in cells modified with GXMR-IgG4-28 $\zeta$  (Figure 1d). These results were observed for both MOI of 1 and 3, which also demonstrated that the MFI of GXMR-8-28 $\zeta$  and GXMR-8-BB $\zeta$  expression were substantially higher than that of GXMR-IgG4-28 $\zeta$  (Figure 1e and f). Taken together, these results showed that the CD8 $\alpha$  molecule in the hinge/transmembrane of GXMR-CAR is accounted for the improvement of the transduction efficiency of GXMR-CAR in Jurkat T cells.

### **GXMR-8-BB $\zeta$ is highly expressed during Jurkat expansion**

When GXMR-CAR constructs were expressed in Jurkat cells, the presence of GXMR-CARs on the cell surface was investigated by evaluating the recognition of soluble GXM (extracted from *C. gattii* R265) by GXMR-CAR, as previously reported<sup>12</sup>. In Figure 2a, soluble GXM was recognized by GXMR-CAR Jurkat cells, whereas the control cells were unable to interact with soluble GXM.

To evaluate the effect of GXMR-CAR expression on Jurkat cell proliferation, transduction at MOI of 1 and 3 was performed using GXMR-IgG4-28 $\zeta$ , GXMR-8-28 $\zeta$ , or GXMR-8-BB $\zeta$  constructs. Jurkat cells were also transduced with a lentiviral backbone vector (Lenti-mock) carrying the GFP marker only, and the growth curve and percentage (among GFP-positive cells) of CAR-expressing cells were measured every 3 days for 12 days (Figure 2b–e). As shown in Figure 2b and c (MOI 1 and MOI 3, respectively), the cellular expansion of Jurkat cells expressing GXMR-CAR was significantly reduced compared to Lenti-mock, and only transduction with an MOI of 3 demonstrated a greater expansion of GXMR-8-BB $\zeta$  Jurkat cells compared to GXMR-8-28 $\zeta$  and GXMR-IgG4-28 $\zeta$  (Figure 2d). Moreover, the percentage of Jurkat cells expressing GXMR-8-BB $\zeta$  showed better maintenance in all periods analyzed, and GXMR-CARs containing a CD8 $\alpha$ -hinge/transmembrane allowed a higher percentage of GFP-positive cells in comparison to GXMR-IgG4-28 $\zeta$  Jurkat cells over time during expansion (Figure 2d and e). Similarly, GXMR-8-BB $\zeta$  Jurkat cells maintained a higher intensity of CAR expression over all periods, and GXMR-8-28 $\zeta$  expression was lower than that in GXMR-8-BB $\zeta$  cells (Figure 2f and g). GXMR-IgG4-28 $\zeta$  Jurkat cells had the lowest CAR expression intensity compared to the other constructs after transduction at an MOI of 3 (Figure 2f and g). Considering the effect of GXMR-CARs on Jurkat cell expansion, the expression of exhaustion markers PD-1 and TIM-3 was measured in Jurkat cells modified with GXMR-CAR constructs at an MOI of 3. Only

PD-1 expression was augmented in Jurkat cells expressing GXMR-CARs, without a significant difference between them, whereas TIM-3 expression was not detected (Figure 2h). In addition, the presence of the activation marker CD25 was assayed in GXMR-CARs Jurkat cells, and CAR expression did not alter the absence of CD25 expression previously reported in Jurkat cells (Figure 2h).

### **Pivotal role of CD8 $\alpha$ -hinge/transmembrane in GXMR-CAR tonic signaling that has signal strength enhanced by co-stimulatory molecule 4-1BB**

CAR molecules frequently produce tonic signaling that can be associated with their high surface density and self-aggregation, and CAR tonic signaling could be characterized as “non-coordinated and sustained activation of the T cell in either a ligand-independent or -dependent fashion”<sup>26</sup>. To assess GXMR-CAR tonic signaling, Jurkat cells expressing distinct GXMR-CAR constructs, after transduction with MOI 1 or 3, were cultivated for 24 and 48 h, and the supernatant was used to measure the levels of IL-2 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The cells modified with the constructs carrying CD8 $\alpha$  as hinge/transmembrane (GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$ ) produced remarkably higher levels of IL-2 than cells transduced with the Lenti-mock construct (Figure 3a and b). These results demonstrate that GXMR-CAR tonic signaling occurs in a hinge/transmembrane-dependent manner, and the levels of IL-2 released by GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  Jurkat cells were higher at an MOI of 3, which suggests a relationship between GXMR-CAR expression level and the strength of tonic signaling. Moreover, GXMR-8-BB $\zeta$ , which contains co-stimulatory molecule 4-1BB, induced levels of IL-2 after 48 h incubation that were 11- and 6-fold higher than those in cells expressing GXMR-8-28 $\zeta$  at an MOI of 1 and 3, respectively (Figure 3a and b). These findings show that GXMR-CAR expressed by Jurkat cells triggers tonic signaling, and the hinge/transmembrane and co-stimulatory domains are crucial in the strength of tonic signaling.

### **T-cell activation signal is strengthened by GXMR-8-BB $\zeta$ in the presence of *Cryptococcus* spp. yeast**

To address the substantial impact of GXMR-CAR tonic signaling on the activation of GXMR-CAR Jurkat cells against its ligand, soluble GXM extracted from *C. gattii* was incubated with MOI 1 and MOI 3 transduced cells and the levels of IL-2 in the cell supernatant were measured after 24 h of culture. At both MOIs, GXMR-8-BB $\zeta$ - and GXMR-8-28 $\zeta$ -modified cells incubated with GXM showed a significant increase in IL-2 levels compared to modified cells cultivated in the absence of GXM (Figure 3c and d;  $p < 0.05$ ). Considering the transduction at MOI 1, soluble GXM at concentrations of 1 and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  induced the activation of GXMR-8-28 $\zeta$  Jurkat cells, whereas GXMR-8-BB $\zeta$  promoted the highest levels of IL-2 only at 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of GXM (Figure 3c and d;  $p < 0.05$ ). At MOI 3, both GXMR-8-BB $\zeta$ - and GXMR-8-28 $\zeta$ -modified cells induced an increase in IL-2 levels only at 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of GXM (Figure 3c and d). The absence of high levels of IL-2 in GXMR-IgG4-28 $\zeta$  Jurkat cells incubated with soluble GXM demonstrated that the interaction between CAR and its ligand was insufficient for cell activation (Figure 3c and d). GXMR-CARs also induced the activation of modified Jurkat cells in response to distinct *Cryptococcus* species. This evaluation considered MOI 1 and MOI 3 transduced cells that were co-cultured with heat-inactivated *C. gattii* R265 or *C. neoformans* H99 yeasts, and the IL-2 levels in the cell supernatant were quantified 24 and 48 h after incubation. GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  led to the production of high levels of IL-2 after interaction with *C. gattii* or *C. neoformans* yeast compared to the modified cells in the medium alone (Figure 3e, f, g, and h;  $p < 0.05$ ). The production of IL-2 by Jurkat cells expressing GXMR-8-BB $\zeta$  or GXMR-8-28 $\zeta$  was significantly higher than that by GXMR-IgG4-28 $\zeta$ - and Lenti-mock-cells when co-cultured with *C. gattii* or *C. neoformans* yeast (Figure 3e, f, g, and h;  $p < 0.05$ ), whereas GXMR-8-BB $\zeta$  induced the highest levels of IL-2 in the presence of ligand compared to all constructs (Figure 3e, f, g, and h;  $p < 0.05$ ). Interestingly, the activation of GXMR-CAR Jurkat cells induced by *Cryptococcus* yeast did not differ between strains R265 and H99 in any of the GXMR-CAR constructs studied (Figure 3e, f, g, and h). The signal strength of high GXMR-8-BB $\zeta$  tonic signaling increased in response to antigen recognition.

To complement the role of hinge/transmembrane and signaling domains in GXMR-CAR cells in the presence of ligands, the growth of GXMR-CAR Jurkat cells was evaluated during incubation with heat-killed *Cryptococcus* spp. Jurkat cells expressing GXMR-CAR after transduction with an MOI of 1 had an expansion for 48 h, as expected and already reported in Figure 2a, and the presence of strain R265 or H99 induced cell activation that resulted in reduced cell expansion (Figure 3i, j, and k). GXMR-8-BB $\zeta$  Jurkat cells showed a 3-fold decrease in cell concentration after interaction with *Cryptococcus* spp. yeast after 48 h of culture, whereas GXMR-8-28 $\zeta$  and GXMR-IgG4 promoted 4- and 5-fold decreases in cell concentration, respectively (Figure 3i, j, and k). In MOI 3-transduced Jurkat cells, the increase in GXMR-CAR expression by the augmentation of MOI and the recognition of *Cryptococcus* spp. yeast by GXMR-CARs also reduced cell expansion, mainly in GXMR-8-28 $\zeta$  and GXMR-IgG4-28 $\zeta$ , and the cell concentration of GXMR-8-BB $\zeta$ -Jurkat cells reached 1.2- and 2.5-fold higher than GXMR-IgG4-

28 $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$ -cell, respectively, after 48 h of co-culture with strains R265 or H99 (Figure 3l, m, and n). Thus, the 4-1BB signaling domain favored cell activation triggered by GXMR-8-BB $\zeta$  and contributed to cellular resilience during cell expansion against *Cryptococcus* spp. yeast.

### **Dasatinib, a tyrosine kinase inhibitor, attenuates the tonic signaling induced by GXMR-CARs containing CD8 $\alpha$ as hinge/transmembrane**

To investigate the mechanisms involved in tonic signaling triggered by specific GXMR-CAR constructs expressed in Jurkat cells, we studied the effect of CD45 phosphatase activity on the regulation of T-cell receptor (TCR) activation and the inhibition of phosphorylation motifs of CAR. The pharmacological inhibitor NQ301 blocks the tyrosine phosphatase activity of CD45, compromising signal transduction through TCR in the T-cell activation process<sup>27</sup>. Jurkat cells were transduced with MOI 1 and MOI 3 using distinct GXMR-CAR constructs, modified cells were treated with different concentrations of NQ301, and after 48 h of incubation the levels of IL-2 were evaluated. Inhibition of CD45 phosphatase mediated by NQ301 did not alter the levels of IL-2 produced by GXMR-CAR Jurkat cells in the absence of the ligand (Figure 4a and b). To address the CAR signaling pathway responsible for GXMR-CAR tonic signaling, an inhibitor of Src family tyrosine kinases, dasatinib, was used to block the adenosine triphosphate (ATP) binding site of the lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK) involved in CD3 $\zeta$  phosphorylation<sup>28</sup>, which has been shown to reduce cytokine production and exhaustion in CAR T cells<sup>29</sup>. Dasatinib at several concentrations reduced IL-2 production by GXMR-8-BB $\zeta$ - and GXMR-8-28 $\zeta$ -Jurkat cells that were transduced at MOI 1 and MOI 3 (Figure 4c and d), and the production of IL-2 triggered by GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  reached levels 5- and 4-fold lower in the presence of dasatinib (Figure 4c and d). These results indicate that the tonic signaling of the GXMR-CAR constructs containing the CD8 $\alpha$  molecule as a hinge/transmembrane was drastically reduced when LCK-mediated phosphorylation of CD3 $\zeta$  was inhibited.

### **Dasatinib attenuates the effects of cell activation induced by GXMR-CAR even in the presence of *Cryptococcus* spp.**

GXMR-CAR tonic signaling was reduced by dasatinib in Jurkat cells that were transduced with MOI of 1 and 3 using GXMR-8-BB $\zeta$  or GXMR-8-28 $\zeta$  constructs. We therefore evaluated the effects of dasatinib on Jurkat cells expressing GXMR-CAR in the presence of *Cryptococcus* spp. IL-2 levels in the cell supernatant and the evaluation of cellular expansion were considered in the co-culture of GXMR-CAR Jurkat cells with heat-killed yeast for 48 h after incubation with or without 50 nM dasatinib. The high levels of IL-2 produced by GXMR-8-BB $\zeta$ - and GXMR-8-28 $\zeta$ -modified cells in the presence of *Cryptococcus* spp. yeast were significantly reduced to levels close to those of the negative control when dasatinib was added (Figure 5a–h). MOI 3-transduced cells expressing GXMR-8-BB $\zeta$  or GXMR-8-28 $\zeta$  and incubated with its ligand showed a reduction in IL-2 levels, due to dasatinib, which caused a 6-fold decrease in the cytokine levels compared to the non-treated cells (Figure 5c, d, g, and h). GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  Jurkat cells treated with dasatinib and incubated with or without *Cryptococcus* spp. did not differ in IL-2 levels, indicating that the inhibitory action orchestrated by dasatinib on the CAR signaling pathway is predominant even when CAR-specific ligands are available (Figure 5a–h). In contrast, the GXMR-IgG4-28 $\zeta$ -carrying cells did not demonstrate tonic signaling, and IL-2 levels did not change upon CAR-ligand interaction; therefore, the cells treated with dasatinib did not show relevant changes (Figure 5i–l).

The cell expansion of GXMR-CAR Jurkat cells was also assayed in the presence of dasatinib, and GXMR-8-BB $\zeta$ - and GXMR-8-28 $\zeta$ -modified cells at an MOI of 1 and 3 had improved cell concentration after treatment with dasatinib compared to non-treated cells under the same conditions (Figure 5m–o). This observation was more pronounced in MOI 3-transduced cells that were treated with dasatinib. After 48 h of culture, the cell concentration was approximately 2-, 3-, and 1.6-fold higher for GXMR-8-BB $\zeta$ -, GXMR-8-28 $\zeta$ -, and GXMR-IgG4-28 $\zeta$ -Jurkat cells, respectively, compared to non-treated cells (Figure 5p–r). In addition, GXMR-CAR Jurkat cells were treated with dasatinib in the presence of *Cryptococcus* spp., and the effect on the cell concentration of GXMR-CAR Jurkat cells caused by its ligand was significantly reduced in the presence of dasatinib for all three CAR constructs (Figure 5m–r). Of note, the cell concentrations of GXMR-8-BB $\zeta$ - and GXMR-8-28 $\zeta$ -modified cells reached close levels after 48 h of co-culture with strains R265 or H99 in the presence of dasatinib (Figure 5m–n). Moreover, GXMR-CAR-modified cells at MOI 3 showed a significant improvement in the expansion of cells treated with dasatinib even before incubation with *Cryptococcus* spp. yeast (Figure 5p–r). Attenuation of the effect on expansion of Jurkat cells expressing GXMR-CAR in the presence of its ligand was more evident in the cells modified with GXMR-8-BB $\zeta$  that were treated with dasatinib (Figure 5p). Put together, these results suggest that the signal strength of GXMR-CARs containing CD8 $\alpha$  as a hinge/transmembrane protein promotes cell activation in an MOI-dependent manner, which can be attenuated by inhibition of the CAR signaling pathway. In addition, the co-stimulatory molecules 4-

1BB and CD28 induce a distinct signal strength by GXMR-CD8-CAR in Jurkat cells, which was clearly demonstrated by the cytokine production and cellular expansion rate.

### ***Cryptococcus* spp. clinical isolates are recognized by GXMR-CARs that mediate cell activation**

Reproducing the findings of the study of novel chimeric receptors targeting *Cryptococcus* spp. is challenging using clinical isolates of *Cryptococcus* spp.; hence, most of the findings were assayed using reference strains. Moreover, the morphological modification of *Cryptococcus* spp. as titan cells that occurs in the pulmonary tissue could be an escape mechanism used by fungi to subvert their recognition by chimeric receptors. Therefore, these factors have been studied in the context of GXMR-CAR, which has a great capacity to target *Cryptococcus* titan cells<sup>12</sup>, and in the current study, we evaluated the ability of GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  to mediate cell activation against clinical isolates of *Cryptococcus* spp. Jurkat cells were transduced with GXMR-8-BB $\zeta$  or GXMR-8-28 $\zeta$  using an MOI of 3, and the modified cells were incubated with heat-killed clinical isolates of *C. neoformans* (H99) or *C. gattii* (R265). After 24 and 48 h of co-culture, IL-2 levels in the cell supernatant were measured using ELISA. GXMR-8-BB $\zeta$ -modified cells showed a significant increase in IL-2 levels in all clinical isolates tested after 24 h of culture (Figure 6a), whereas IL-2 levels after 48 h were significantly augmented only in the presence of *C. neoformans* isolates (Figure 6b). Among the GXMR-CAR constructs, GXMR-8-28 $\zeta$  induced high levels of IL-2 in the presence of the clinical isolates at all periods analyzed, except for the *C. neoformans* 455 strain specifically after 24 h of co-culture (Figure 6c and d). These results validate the great capacity of GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  to recognize *Cryptococcus* spp. that induce T-cell activation.

### **Discussion**

T cells engineered to express chimeric antigen receptors are considered a revolution in cell and gene therapy owing to their success in the treatment of lymphocytic leukemia and promissory to treat solid tumors. The redirection of cytotoxic T cells using CAR technology to target proteins, carbohydrates, lipids, and other molecules has opened new applications of CAR technology beyond cancer<sup>6</sup>. Although this therapy has proven to be potent in targeting several types of epitopes, the rationale for CAR design must be considered when applied to a new ligand. Therefore, improvement of CAR T cell function by modifying the CAR structure is desirable. CAR domains (scFv, hinge, transmembrane, and co-stimulatory portions) should be evaluated to establish efficient CAR constructs that play a pivotal role in ligand recognition, induction of cell activation, and low expression of exhaustion phenotypes. In this context, the components of GXMR-CAR, the first CAR designed to target *Cryptococcus* spp. through the scFv derived from 18B7 monoclonal antibody<sup>24</sup>, should be investigated to evaluate the importance of hinge/transmembrane and co-stimulatory domains to improve GXMR-CAR function. In the current study, we modified the original structure of GXMR-CAR, which redirects T cells to recognize GXM in *Cryptococcus* spp. capsules, to generate new GXMR-CAR constructs containing CD8 $\alpha$  molecules as hinge/transmembrane and CD28 or CD137 (4-1BB) as co-stimulatory domains. Therefore, the new constructs GXMR-8-28 $\zeta$  and GXMR-8-BB $\zeta$  had the ability to induce cell activation against *Cryptococcus* spp., and these novel GXMR-CARs showed a remarkable improvement compared to GXMR-IgG4-28 $\zeta$ , which is composed of IgG4 as a hinge and CD28 as a transmembrane/co-stimulatory domain. GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  were expressed at higher levels and persisted longer during the expansion of Jurkat cells and also induced tonic signaling compared to GXMR-IgG4-28 $\zeta$ , which had a poorer capacity to mediate T cell activation in the presence of the ligand. Our results showed that GXMR-CAR containing CD8 $\alpha$  as a hinge/transmembrane combined with 4-1BB triggers a signal strength that is more pronounced in response to *Cryptococcus* spp., and Src family kinases are crucial in the GXMR-CAR signaling pathway.

Several studies have reported that CAR expression and ligand affinity are greatly affected by scFv instability, which occurs independently of the hinge/transmembrane and signaling domains<sup>30,31</sup>. On the one hand, the antigen recognition domain of a CAR is commonly studied to increase its affinity and specificity to target molecule with emphasis on the strength of the signal transmission; on the other hand, the functional strength of CAR-engineered cells can be improved by adjustment of the hinge size or by changing the molecule anchored in the cell membrane, and these portions are also correlated with CAR expression<sup>30,32</sup>. Considering that a smaller hinge facilitates CAR folding and expression<sup>32</sup>, in the current study, the hinge/transmembrane domain of the original form of GXMR-CAR (containing IgG4 plus a CD28 portion, totaling 254 aa) was replaced with a CD8 $\alpha$  molecule (71 aa), which elevated the efficiency of GXMR-CAR expression on the cell surface, maintaining antigen recognition. These findings are corroborated by a previous study that observed a higher expression of CD19-CAR when the transmembrane domain CD28 was replaced with the CD8 $\alpha$  molecule<sup>33</sup>. Moreover, Jurkat cells modified with GXMR-CAR containing CD8 $\alpha$  as the hinge/transmembrane showed a cellular expansion that was more acceptable



than that observed in Jurkat cells expressing GXMR-IgG4-28 $\zeta$ , and the hinge/transmembrane substitution did not impair the redirection of cells to target *Cryptococcus* spp.

The expression of GXMR-CAR stood out when CD8 $\alpha$  molecules were inserted into the CAR constructs, which also contributed to the GXMR-CAR tonic signaling that was observed in Jurkat cells modified with GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$ , whereas GXMR-IgG4-28 $\zeta$  did not produce antigen-independent signaling in Jurkat cells. These observations were based on IL-2 levels produced by distinct GXMR-CAR T cells in the absence of *Cryptococcus* spp. Independent studies have explored the advantages of tonic signaling for antigen-independent expansion of T cells *in vitro* and *in vivo*<sup>34–37</sup>. The current study found that the recruitment of the tonic signaling pathway was substantially higher in GXMR-8-BB $\zeta$  modified cells, and tonic 4-1BB co-stimulation was consistently present in a variety of CAR constructs<sup>34–37</sup>. Moreover, GXMR-8-BB $\zeta$  tonic signaling resulted in better expansion of Jurkat cells compared to cells modified with other GXMR-CAR constructs. Interestingly, the high levels of IL-2 production by GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  in the absence of ligands did not impair the capacity of GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  to increase IL-2 levels in response to soluble GXM or heat-killed yeast of *Cryptococcus* spp. Although GXMR-IgG4-28 $\zeta$ -modified cells were able to recognize soluble GXM and heat-killed yeast, these GXMR-CARs composed of IgG4 (hinge) and CD28 (transmembrane) induced weak activation in Jurkat cells. In contrast, previous studies reported that a CAR containing IgG4/CD28 as a hinge/transmembrane was still able to mediate cell activation upon antigen binding<sup>26</sup>.

The transduction procedure in Jurkat cells impairs their cellular expansion, as verified in Lenti-mock transduced cells, in which Jurkat cells were modified to express GFP alone, and the expression of GXMR-CAR in Jurkat cells promoted lower cellular expansion compared to Lenti-mock-modified cells. However, there was a positive effect of the 4-1BB signaling domain on the cellular expansion and activation of cells transduced with GXMR-8-BB $\zeta$ , which was significantly higher than that of the other two constructs, indicating that GXMR-8-BB $\zeta$  signaling prolonged cell survival. These findings were also found in the microenvironment between GXMR-8-BB $\zeta$ -modified cells and *Cryptococcus* spp., and increasing GXMR-CAR expression by MOI3 or stimulating CAR engagement with its ligand augmented cell activation, which reduced cellular expansion. Several studies have demonstrated the superiority of 4-1BB signaling in ameliorating cell exhaustion or enhancing the efficacy of CAR T cell therapy<sup>34,38,39</sup>, although there are some concerns related to the persistence and intensity of 4-1BB co-stimulation that could upregulate pro-apoptotic genes contributing to the apoptosis of engineered CAR T cells<sup>37</sup>. The current study evaluated the effect of GXMR-CAR construct expression in the presence of exhaustion markers in GXMR-CAR Jurkat cells, and there was no correlation between the increase in exhaustion marker expression and the cellular expansion rate for each GXMR-CAR construct.

The GXMR-CAR tonic signaling showed positive effects mainly when modified cells were incubated with *Cryptococcus* spp.; however, this tonic signaling is commonly observed in a variety of CAR T cells and can cause adverse effects during patient treatment. Some strategies to overcome the negative effects of tonic signaling include limiting CAR expression by changing the promoter or adding an internal ribosome entry site element upstream of the LTR promoter, which is an efficient way to reduce tonic signaling<sup>35,37</sup>. Moreover, pharmacological agents that inhibit key molecules in the CAR signaling pathway can regulate cell proliferation, exhaustion, and apoptosis-related genes in CAR T cells, mitigating CAR-related side effects in patients. LCK protein phosphorylation, which is critical in the CAR signal transduction pathway, is inhibited by dasatinib<sup>29,40,41</sup>. These mechanisms promoted by dasatinib were also identified in GXMR-CAR-Jurkat cells that had a significant reduction of the IL-2 production, as detected by GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  tonic signaling, as well as when the ligand was recognized. This reduction in the activation of GXMR-CAR-Jurkat cells mediated by dasatinib also recovered the cellular expansion rate of cells modified with GXMR-CAR, which was affected in response to signal strength sourced from CAR in the presence of the ligand.

The details of the GXMR-CAR structure investigated in the current study validate the capacity of variants of GXMR-CAR to recognize *Cryptococcus* spp. inducing high levels of cell activation, which will be satisfactory in the engineering of CAR T and CAR NK cells specifically to treat cryptococcosis. Further studies will explore the benefits of the signal transduction pathway of variants of the GXMR-CAR to enhance the engineered cells' antifungal activity to subvert *Cryptococcus* species' polysaccharide capsule, which has its composition and size rearranged in a microenvironment-dependent manner. The role of the GXM polysaccharide of *Cryptococcus* spp. is extremely relevant in the evasion of recognition by innate and adaptive immune cells and in the modulation of the host immune response favoring the progression of cryptococcosis<sup>20,42</sup>. These features are commonly studied in

different *Cryptococcus* reference strains and in clinical isolates from cryptococcosis patients; therefore, this context was considered and the evaluation of activity of GXMR-CAR constructs against several clinical isolates of *Cryptococcus* spp. becomes critical. Both GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  constructs were able to mediate the activation of modified Jurkat cells after incubation with different clinical isolates from *C. gattii* and *C. neoformans*, whereas GXMR-8-BB $\zeta$  presented better signal transduction to activate T cells, which reinforces the distinct potential of variants of GXMR-CAR to induce cell activation targeting GXM from *Cryptococcus* capsule.

The characterization of distinct GXMR-CAR constructs considering the modifications in the hinge/transmembrane and signaling transduction domains was performed in the Jurkat cell line, in which the laborious isolation, expansion, and transduction of primary T-cells for CAR expression can be circumvented using Jurkat cells. This strategy, reported by Bloemberg *et al.*, aimed to evaluate the sensitivity and specificity of several antigen-binding domains composed of CARs, and tonic signaling and target-specific activation mediated by CAR were measured using a high-throughput method in Jurkat cells<sup>43</sup>. Assessing CAR activation in Jurkat cells does not predict the whole effect triggered by the signal transduction pathway of CAR that this molecule could induce in primary T cells due to its differentiation and effector function characteristics. Otherwise, Jurkat cells expressing CAR could indeed predict tonic signaling, ligand-specific activation, and cell surface expression of CAR in primary human T cells<sup>43</sup>, which optimizes the development of novel CARs based on time effectiveness and cost efficiency when Jurkat cells are used.

In conclusion, this study demonstrated the optimization of novel second-generation GXMR-CARs by changing the hinge, transmembrane, and co-stimulatory domains that improved CAR expression, antigen recognition, and signal strength in T-cell activation. These optimized GXMR-CARs will allow further studies to emphasize the engineering of primary T cells to express GXMR-CAR in the context of *in vitro* and *in vivo* *Cryptococcus* spp. infection. The characterization of novel GXMR-CARs in Jurkat cells opens new opportunities for further development of CARs for cell therapy against invasive fungal infections.

## Methods

### Cell lines and growth conditions

Jurkat (clone E6-1) and HEK293T cell lines were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ). Jurkat cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Waltham, MA, USA), 1% ampicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; cat. P4333), and 100 mM sodium pyruvate (Gibco, Waltham, MA, USA). HEK-293T cells were cultivated in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Corning, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% ampicillin/streptomycin, and 100 mM sodium pyruvate. Cells were maintained in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C, and subcultured every 2–3 days.

### Culture of *Cryptococcus* spp.

The *Cryptococcus* species *C. gattii* R265 (VGII molecular genotype) and *C. neoformans* H99 (serotype A) were grown overnight in yeast nitrogen base (YNB) (Sigma) medium at 30 °C with vigorous shaking (150 rpm) for 20 h. The cells were harvested, washed twice with phosphate buffered saline (PBS), and resuspended in PBS to perform heat inactivation (70 °C for 50 min) of the yeast cells, which were stored at –80 °C in a 25% glycerol/PBS solution. Before the experiment, an aliquot of heat-inactivated yeast was thawed and washed twice in PBS to determine cell concentration using a Neubauer chamber. The same procedures described above were performed using clinical isolates of *C. gattii* and *C. neoformans* provided by Prof. Dr. Roberto Martinez, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil.

### Construction of plasmids encoding anti-GXM CARs to target *Cryptococcus* spp.

GXMR-CAR was designed to contain a variable region sequence of a full mouse antibody (18B7 clone) with specificity to the capsular component GXM, as reported by Casadeval *et al.*<sup>24</sup>. Previously, GXMR-CAR was generated by linking the binder sequence (single chain variable fragment specific to GXM) to the IgG4 hinge and CD28 transmembrane domain (UniProt P10747, 153–179 aa position), and then to CD28 (UniProt P10747, 180–220 aa position) and CD3 $\zeta$  (UniProt P20963, 52–164 aa position) as signaling domains, as reported by da Silva *et al.*<sup>11</sup>. In the current study, two variants of GXMR-CAR were designed using a GXM-binding domain sequence derived from anti-GXM 18B7 monoclonal antibody<sup>24</sup> with the following components from 5' to 3': the hinge and transmembrane regions of the human CD8 $\alpha$  molecule (UniProt P01732, 136–206 aa position), the cytoplasmic portion of the human CD28 (UniProt P10747, 180–220 aa position) or 4-1BB (UniProt Q07011, 214–255 aa

position) molecules, and the cytoplasmic region of the human CD3 $\zeta$  molecule (UniProt P20963, 52–164 aa position). These CARs were designated as GXMR-8-CD28 $\zeta$  and GXMR-8-BB $\zeta$ . CAR-encoding sequences were subcloned into a second-generation lentiviral plasmid backbone (pLentiCas9-EGFP, GenScript) containing the GFP sequence as a reporter, and the plasmid backbone containing the GFP sequence alone was considered as a control lentiviral (Lenti-mock) vector. GXMR-8-CD28 $\zeta$  and GXMR-8-BB $\zeta$  were sequenced and verified at the Sequencing Facility of the School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of São Paulo.

### **Production of lentiviral particles containing a GXMR-CAR sequence**

Lentiviral particles containing the plasmid encoding the GXMR-CAR construct were produced in the HEK-293T cell line grown as described above. The cells were seeded in 25 cm<sup>3</sup> cell culture flasks at a concentration of  $2.5 \times 10^6$  cells/5 mL of fresh medium; after 48 h of culture, the supernatant volume was reduced to 3 mL before transfection. The plasmid pMD2.G (Addgene, cat. 12259), and psPAX2 (Addgene, cat. 12260) packaging plasmids were co-transfected with the GXMR-CAR lentiviral vector using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher, cat. L3000001) transfection reagent according to the manufacturer's instructions. After 24 h of transfection, 2 mL of fresh medium was added to the culture and the supernatant-containing lentiviral particles were collected after 48 and 72 h of transfection. The lentiviral particles were cleared by centrifugation ( $300 \times g$ , 10 min, 4 °C), and the supernatant was incubated with Lenti-X concentrator (Takara Bio, cat. 631232) to concentrate the lentiviral stock following the manufacturer's instructions. The lentiviral stock was resuspended in PBS, and aliquots were stored at –80 °C until use.

Lentiviral transduction of the Jurkat cell line was used to measure the lentiviral particle titer, and a spinoculation protocol ( $850 \times g$ , 65 min, RT) was used for transduction. Cells were seeded in 48-well plates at concentration of  $1 \times 10^5$  cells/250  $\mu$ L, and 72 h after transduction, the percentage of Jurkat cells expressing the vector-encoded gene product was represented by GFP expression as determined by flow cytometry. The titer was calculated based on the dilution of lentiviral particles that resulted in GFP expression between 10% and 30%, and the following formula was used:  $\text{titer} = \{[(\% \text{GFP}/100) \times \text{dilution} \times \text{cell seeded}] / \text{final volume}\}$ .

### **Transduction of Jurkat cells**

The transduction of Jurkat cells was performed using a spinoculation protocol ( $850 \times g$ , 65 min, RT) with MOIs of 1 and 3 of lentiviral particles of GXMR-IgG4-CD28 $\zeta$ , GXMR-8-CD28 $\zeta$ , GXMR-8-BB $\zeta$ , and Lenti-mock. Jurkat cells were plated on 48-well plates at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/250  $\mu$ L and lentiviral particles were added before the spinoculation. Seventy-two hours after transduction, GFP expression was measured using flow cytometry (Guava EasyCyte, Guava Technologies, Millipore) to determine the transduction efficiency. The cells were either used for the experiments or maintained in culture at a concentration of  $3\text{--}5 \times 10^5$  cells/mL.

### **Detection of GXMR-CAR on the cell surface**

The expression of GXMR-CAR on the cell surface was detected as previously reported by da Silva et al.<sup>11</sup>, in which modified cells were incubated with soluble GXM extracted from *C. gattii*<sup>44</sup> and the interaction between GXMR-CAR and its ligand was revealed by anti-GXM, clone 18B7, which is a mouse monoclonal antibody (Sigma; cat. MABF2069). These procedures were performed using  $1 \times 10^6$  GXMR-CAR Jurkat cells incubated with GXM (200  $\mu$ g/mL) for 40 min at 4 °C. The cells were then washed with PBS and incubated with anti-GXM monoclonal antibody for 40 min at 4 °C. The cells were washed with PBS and incubated with biotin-conjugated secondary antibody for 45 min at 4 °C, followed by washing and incubation with PE-conjugated streptavidin for 45 min at 4 °C. Non-transduced Jurkat cells were subjected to the same procedures described above and considered as negative controls for GXM binding. The detection of GXMR-CAR on the cell surface was evaluated using flow cytometry (Guava EasyCyte, Guava Technologies, Millipore), and the data obtained were analyzed using FlowJo™ software (version 10, for Windows; Ashland, OR, USA: Becton, Dickinson and Company; 2019).

### **GXMR-CAR-Jurkat cell activation assay**

Transduced Jurkat cells at an MOI of 1 and 3 to express distinct variants of GXMR-CAR were plated in 96-well plates at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ L and incubated with soluble GXM (0.1, 1, or 10  $\mu$ g/mL) or heat-killed yeast of *C. gattii* or *C. neoformans* using 1:1 ratio (cells:yeast). After 24 and 48 h of incubation, the concentration of viable GXMR-CAR Jurkat cells was determined using flow cytometry and propidium iodide staining, and the cell supernatant was collected to measure IL-2 production using the BD OptiEIA Human IL-2 ELISA kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Jurkat cells transduced with mock-GFP lentiviral particles were used as a negative control for cell activation.

### Evaluation of tyrosine kinase inhibitor (dasatinib) and phosphatase CD45 inhibitor (NQ301) on GXMR-CAR-Jurkat cells

MOI 1 and MOI 3 GXMR-CAR-transduced Jurkat cells were seeded in 96-well plates at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL in 200  $\mu$ L of RPMI medium. Various concentrations of dasatinib or NQ301 were added to the cells and the same concentration of DMSO was used as a control. The cells were incubated for 24 and 48 h, and the supernatant was collected to assess IL-2 production by the cells. In addition, the effect of dasatinib was evaluated in cells incubated with heat-killed yeast of *C. gattii* or *C. neoformans*. For this, the cells were seeded at the same concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL in 200  $\mu$ L of RPMI medium and 50 nM dasatinib was added. After 3 h, heat-killed yeasts were added at a cell:yeast ratio of 1:1, and the co-culture was incubated for 24 and 48 h. The cell supernatant was collected to assess IL-2 production, and cell expansion was evaluated under these conditions.

### Statistical analysis

All data were analyzed using Prism (Graph Pad Software), and the results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical determinations of the difference between means of groups were performed with analysis of variance (1-way) followed by Bonferroni's multiple comparison tests. Differences with  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### References

1. Sadelain, M., Brentjens, R. & Rivière, I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery* **3**, (2013).
2. Lipowska-Bhalla, G., Gilham, D. E., Hawkins, R. E. & Rothwell, D. G. Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: Achievements and challenges. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **61**, (2012).
3. Gacerez, A. T., Arellano, B. & Sentman, C. L. How chimeric antigen receptor design affects adoptive T cell therapy. *J. Cell. Physiol.* **231**, 2590 (2016).
4. Larson, R. C. & Maus, M. V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nature Reviews Cancer* **21**, (2021).
5. Denlinger, N., Bond, D. & Jaglowski, S. CAR T-cell therapy for B-cell lymphoma. *Current Problems in Cancer* **46**, (2022).
6. Aghajanian, H., Rurik, J. G. & Epstein, J. A. CAR-based therapies: opportunities for immuno-medicine beyond cancer. *Nature Metabolism* **4**, (2022).
7. Seif, M., Einsele, H. & Löffler, J. CAR T Cells Beyond Cancer: Hope for Immunomodulatory Therapy of Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
8. Kumaresan, P. R., da Silva, T. A. & Kontoyiannis, D. P. Methods of Controlling Invasive Fungal Infections Using CD8+ T Cells. *Front. Immunol.* **8**, 1939 (2017).
9. Schmidt, S., Tramsen, L. & Lehrnbecher, T. Natural killer cells in antifungal immunity. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).
10. Kumaresan, P. R. *et al.* Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, (2014).
11. da Silva, T. A. *et al.* Glucuronoxylomannan in the Cryptococcus species capsule as a target for Chimeric Antigen Receptor T-cell therapy. *Cytotherapy* **23**, (2021).
12. Dos Santos, M. H., Machado, M. P., Kumaresan, P. R. & da Silva, T. A. Titan cells and yeast forms of cryptococcus neoformans and cryptococcus gattii are recognized by gxmr-car. *Microorganisms* **9**, (2021).
13. Rajasingham, R. *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 873–881 (2017).
14. Skolnik, K., Huston, S. & Mody, C. H. Cryptococcal Lung Infections. *Clinics in Chest Medicine* **38**, (2017).
15. Gullo, F. P. *et al.* Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **32**, (2013).
16. Chen, S. C.-A., Meyer, W. & Sorrell, T. C. Cryptococcus gattii Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 980–1024 (2014).
17. Elsegeiny, W., Marr, K. A. & Williamson, P. R. Immunology of cryptococcal infections: Developing a rational approach to patient therapy. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
18. Shourian, M. & Qureshi, S. T. Resistance and tolerance to cryptococcal infection: An intricate balance that controls the development of disease. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
19. Cherniak, R. & Sundstrom, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of Cryptococcus neoformans. *Infection and Immunity* **62**, (1994).
20. Urai, M. *et al.* Evasion of innate immune responses by the highly virulent Cryptococcus gattii by altering capsule glucuronoxylomannan structure. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, (2016).
21. Perfect, J. R. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases* **50**, (2010).

*Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* **12**, (2019).

26. Ajina, A. & Maher, J. Strategies to address chimeric antigen receptor tonic signaling. *Molecular Cancer Therapeutics* **17**, (2018).
27. Sieh, M., Bolen, J. B. & Weiss, A. CD45 specifically modulates binding of Lck to a phosphopeptide encompassing the negative regulatory tyrosine of Lck. *EMBO J.* **12**, (1993).
28. Blake, S., Hughes, T. P., Mayrhofer, G. & Lyons, A. B. The Src/ABL kinase inhibitor dasatinib (BMS-354825) inhibits function of normal human T-lymphocytes in vitro. *Clin. Immunol.* **127**, (2008).
29. Mestermann, K. *et al.* The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Sci. Transl. Med.* **11**, (2019).
30. Fujiwara, K., Masutani, M., Tachibana, M. & Okada, N. Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **527**, (2020).
31. Krug, C. *et al.* Stability and activity of MCSP-specific chimeric antigen receptors (CARs) depend on the scFv antigen-binding domain and the protein backbone. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, (2015).
32. Fujiwara, K. *et al.* Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. *Cells* **9**, (2020).
33. Brudno, J. N. *et al.* Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma. *Nat. Med.* **26**, (2020).
34. Long, A. H. *et al.* 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat. Med.* **21**, (2015).
35. Frigault, M. J. *et al.* Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. *Cancer Immunol. Res.* **3**, (2015).
36. Lamarthée, B. *et al.* Transient mTOR inhibition rescues 4-1BB CAR-Tregs from tonic signal-induced dysfunction. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
37. Gomes-Silva, D. *et al.* Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent. *Cell Rep.* **21**, (2017).
38. Singh, N. *et al.* Antigen-independent activation enhances the efficacy of 4-1BB-costimulated CD22 CAR T cells. *Nat. Med.* **27**, (2021).
39. Philipson, B. I. *et al.* 4-1BB costimulation promotes CAR T cell survival through noncanonical NF- $\kappa$ B signaling. *Sci. Signal.* **13**, (2020).
40. Zhang, H. *et al.* Dasatinib enhances anti-leukemia efficacy of chimeric antigen receptor T cells by inhibiting cell differentiation and exhaustion. *Journal of hematology & oncology* **14**, (2021).
41. Weber, E. W. *et al.* Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Adv.* **3**, (2019).
42. Zaragoza, O. & Casadevall, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol. Proced. Online* **6**, (2004).
43. Bloemberg, D. *et al.* A High-Throughput Method for Characterizing Novel Chimeric Antigen Receptors in Jurkat Cells. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **16**, (2020).
44. Wozniak, K. L. & Levitz, S. M. Isolation and purification of antigenic components of *Cryptococcus*. *Methods Mol. Biol.* **470**, (2009).

### Acknowledgements (optional)

We thank Patrícia E Vendruscolo and Sandra MO Thomaz for technical support. We also thank Prof. Dr. Roberto Martinez (Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil) for providing clinical isolates of *C. gattii* and *C. neoformans*. Editorial support was provided by Bryan Tutt, Scientific Editor, Research Medical Library

### Author contributions (names must be given as initials)

Conceptualization, M.H.d.S and T.A.d.S.; methodology, M.H.d.S., M.P.M, P.R.K., T.A.d.S.; software, M.H.d.S., M.H.d.S., M.P.M, P.R.K., T.A.d.S.; writing—original draft preparation, M.H.d.S. and M.P.M.; writing—review and editing, M.H.d.S., P.R.K., T.A.d.S.; supervision, T.A.d.S.; funding acquisition, P.R.K., T.A.d.S.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

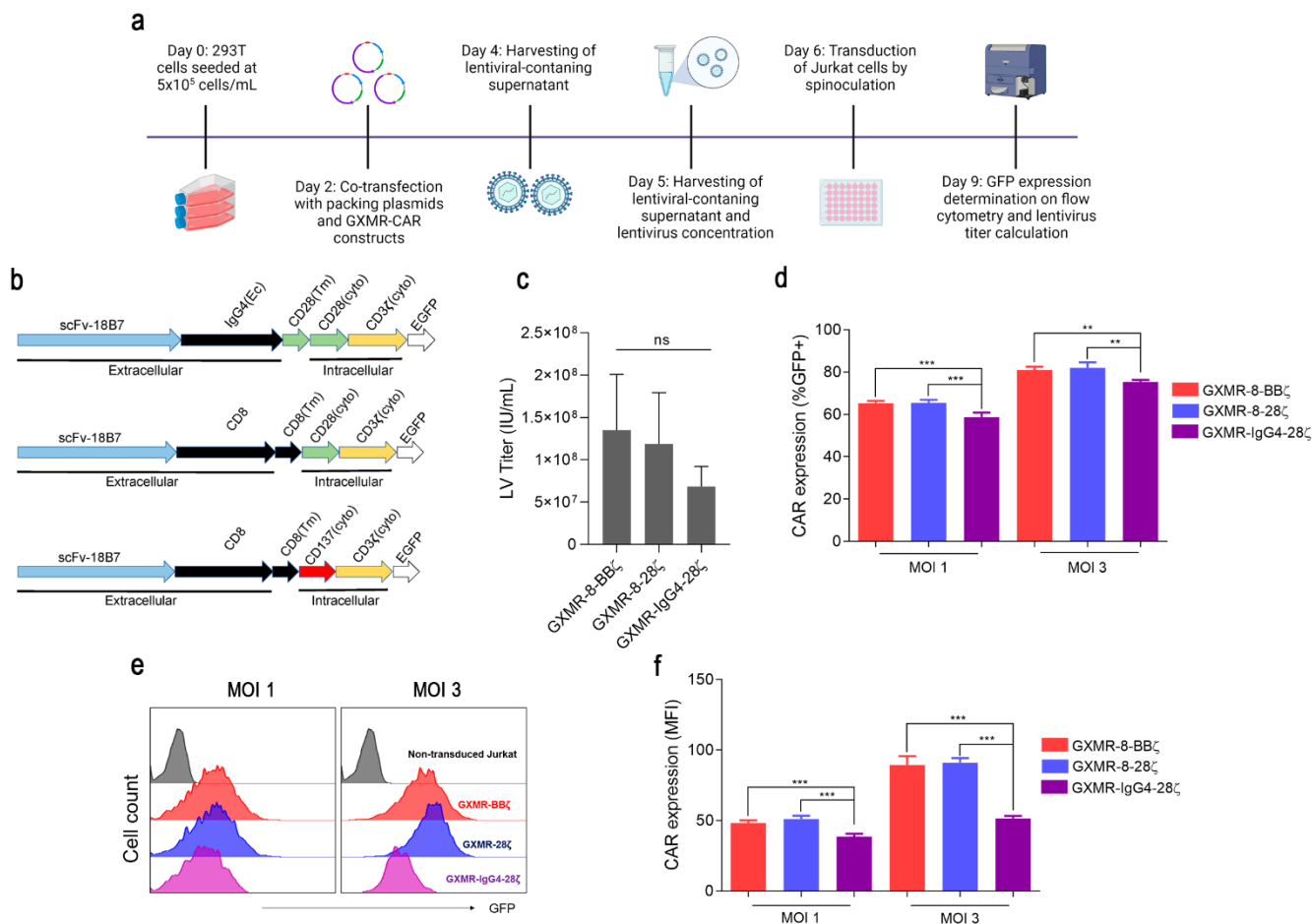
### Data availability statement (mandatory)

No datasets were generated or analyzed during the current study.

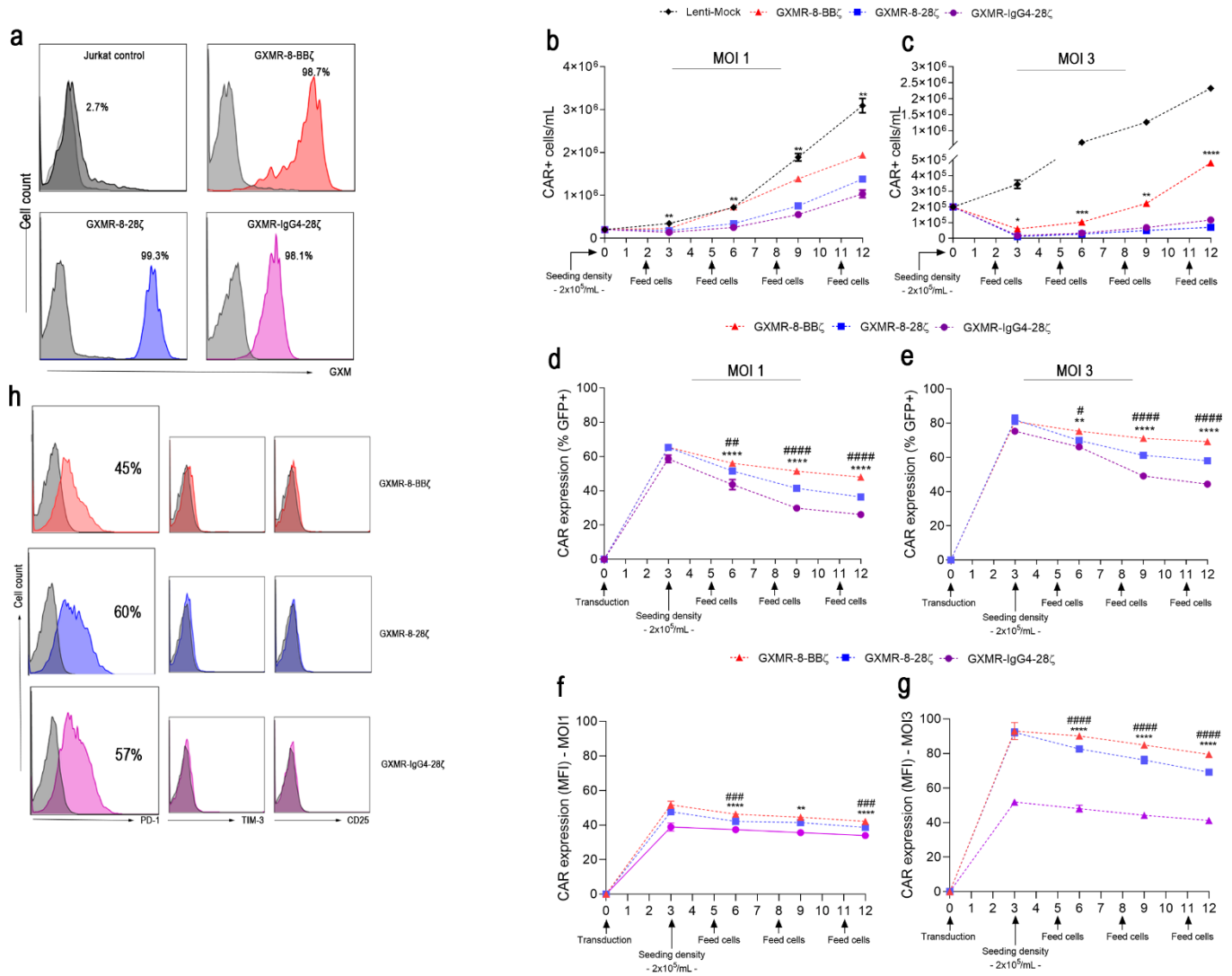
### Additional Information (including a Competing Interests Statement)

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

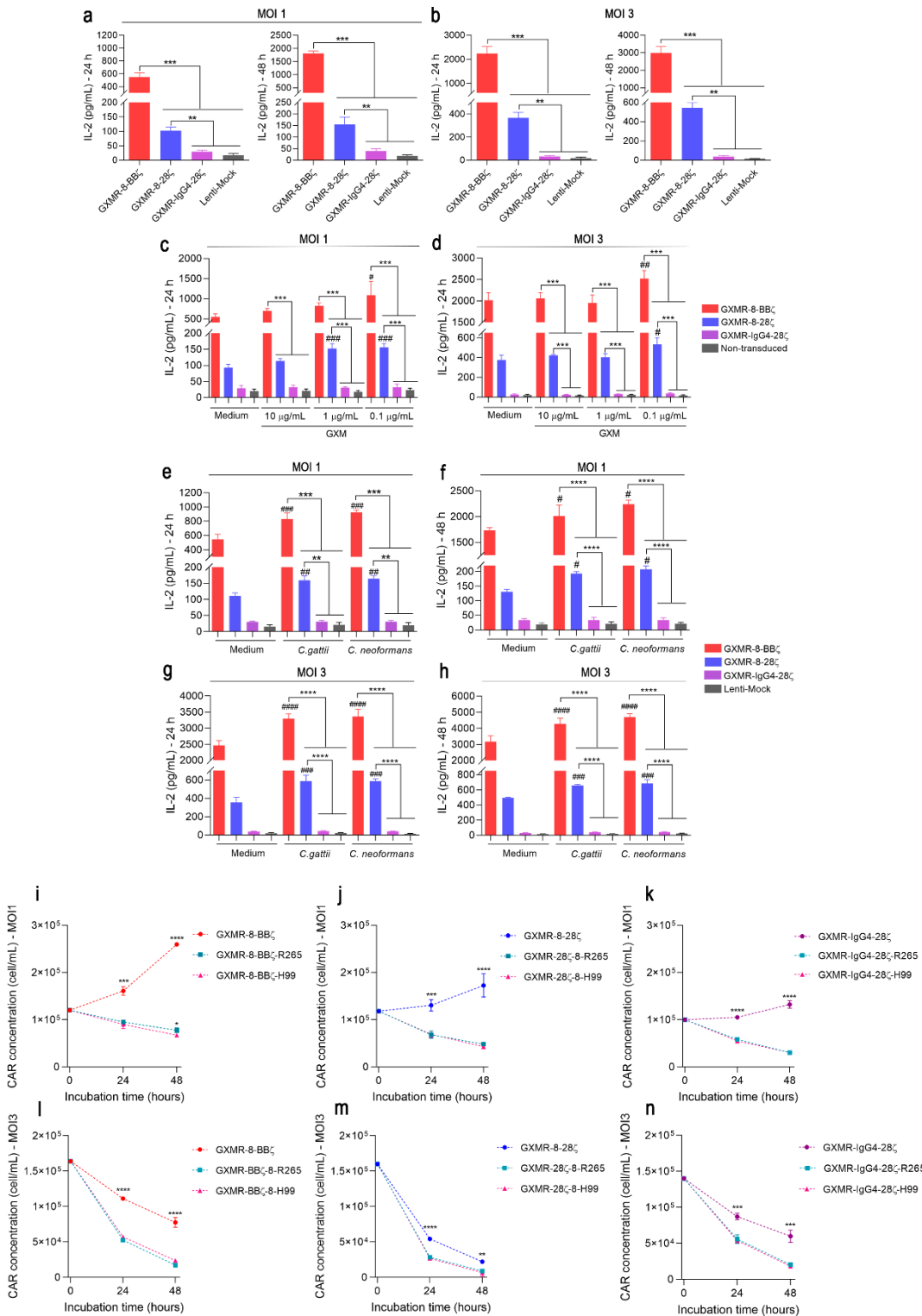
Figures Legends



**Figure 1. GXMR-CAR expression in Jurkat cells is enhanced by CD8 $\alpha$  molecule as hinge/transmembrane domain.** Schematic protocol for production of lentiviral particles carrying the GXMR-CAR sequence, the steps in the transfection of HEK 293-FT cells for GXMR-CAR lentiviral packaging, and the procedure to calculate the titer of lentiviral particles harvested and concentrated (a). DNA sequence for each GXMR-CAR construct indicating the recognition portion of GXM (scFv obtained from anti-GXM antibody, clone 18B7) that is similar for all constructs, and hinge/transmembrane and intracellular domains as specified in the scheme (b). Lentiviral particle titer of distinct GXMR-CAR constructs representative of five independent batches (c). Jurkat cells were transduced with GXMR-CAR at an MOI of 1 and 3, and after 3 days, the cells were analyzed using flow cytometry to measure the percentage of GXMR-CAR-positive cells (d) and the expression of GXMR-CAR (e and f). Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Each experiment was performed in 3 to 5 replicates and repeated at least three times. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , according to one-way ANOVA. ns, not significant.



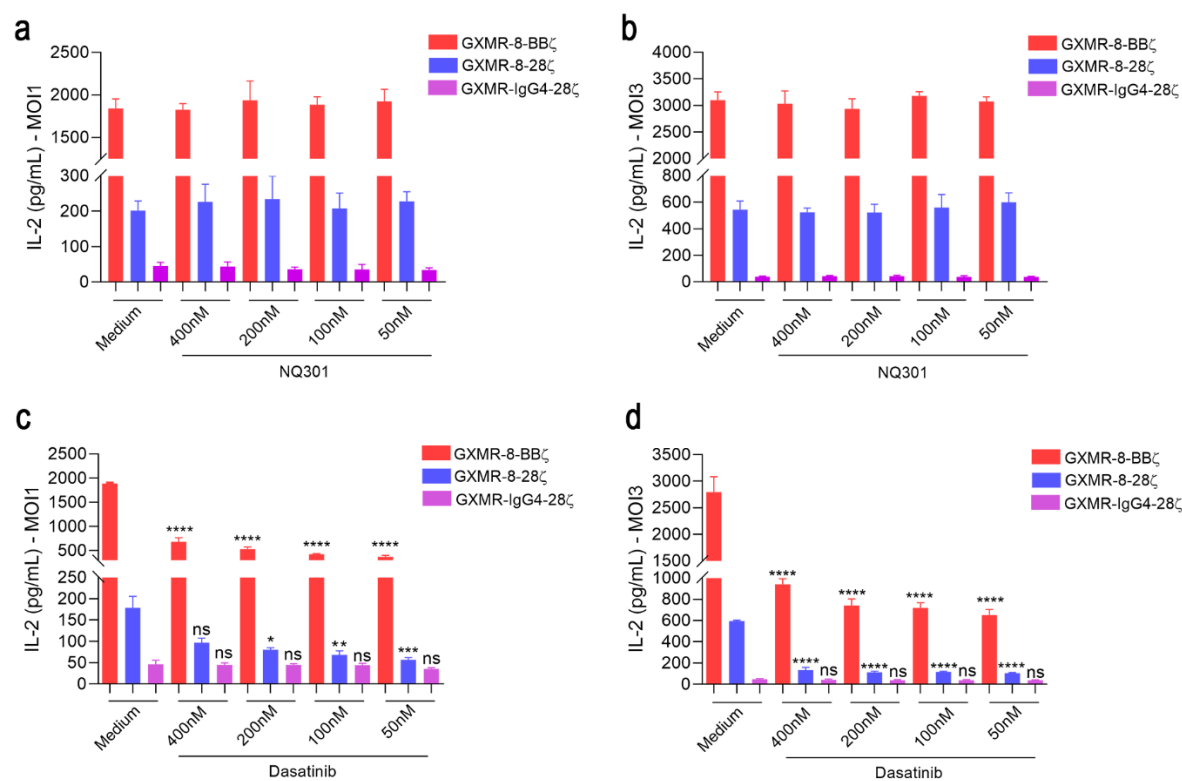
**Figure 2. GXMR-8-BB $\zeta$  expression stands out over GXMR-8-28 $\zeta$  and GXMR-IgG4-28 $\zeta$  during Jurkat expansion.** Jurkat cells expressing GXMR-CAR were incubated with soluble GXM from *C. gattii* R265 (n=3 per condition), as described in the Materials and Methods section (a). The representative histograms show the percentage of GXMR-CAR Jurkat cells able to recognize GXM on the cell surface. Jurkat cells were transduced with MOI 1 (b, d, and f) or MOI 3 (c, e, and g) GXMR-CAR construct or Lenti-mock, and the cell concentration (cells/mL; b and c), percentage of CAR-positive cells (d and e), and CAR expression (represented by MFI; f and g) were measured using flow cytometry to detect GFP expression. These parameters were evaluated within 12 days of culture; \* denotes statistical significance between GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-IgG4-28 $\zeta$ , and # denotes statistical significance between GXMR-8-28 $\zeta$  and GXMR-8-BB $\zeta$  compared to GXMR-IgG4-28 $\zeta$ . GXMR-Jurkat cells were evaluated after exclusion of dead cells using a propidium iodide marker (b-g). Expression of exhaustion markers, PD-1 and TIM-3, and an activation marker, CD25, on day 4 after transduction of Jurkat cells using distinct GXMR-CAR constructs (h). The representative histograms show the percentage of positive cells within CAR+ cells gated. The values are expressed as mean  $\pm$  SD, and scatter plots represent triplicates. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, according to one-way ANOVA.



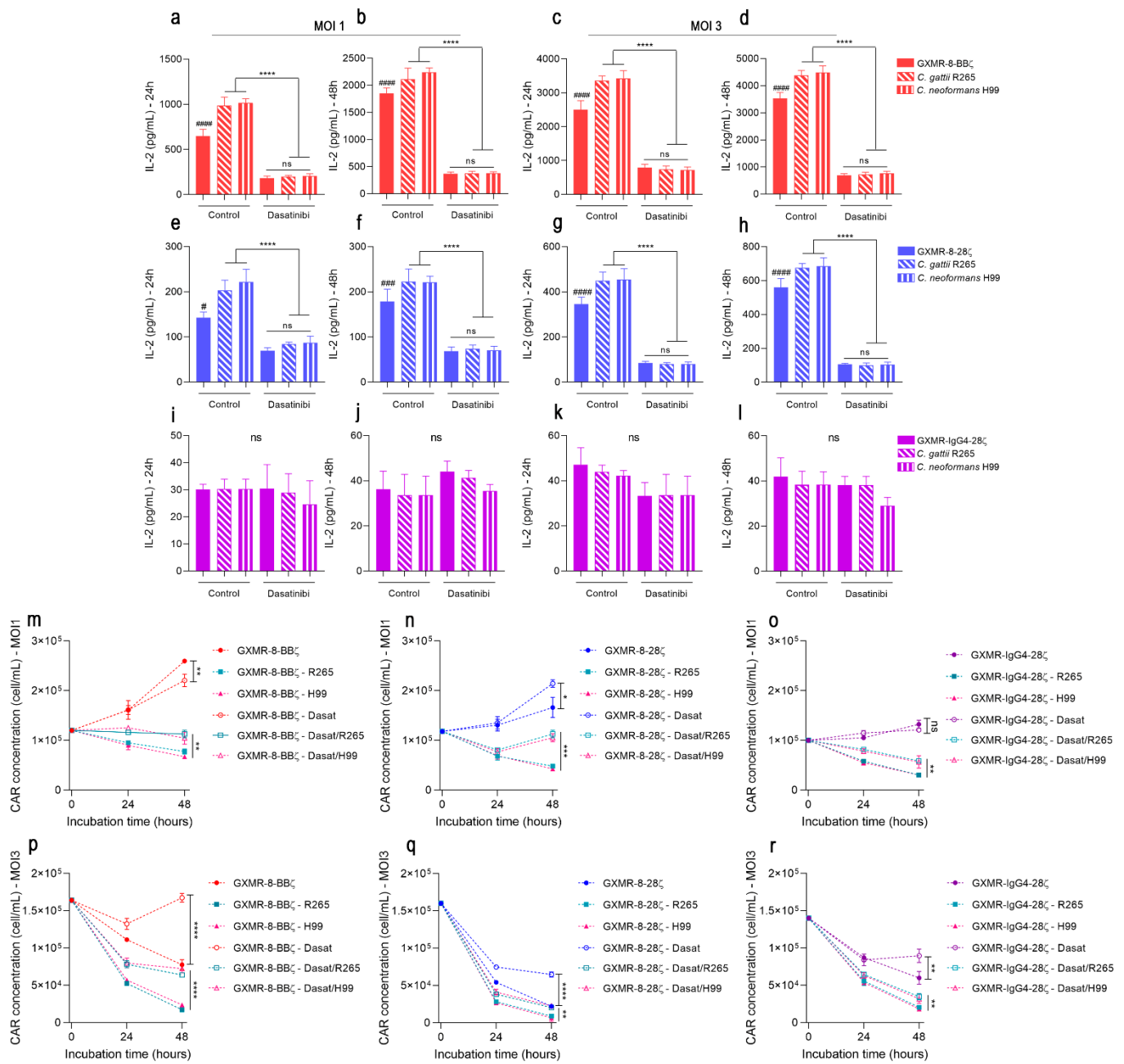
**Figure 3. Jurkat cells expressing GXMR-8-BB $\zeta$  demonstrate a greater signal strength in the presence or absence of *Cryptococcus* spp.** Jurkat cells were transduced with distinct GXMR-CAR or Lenti-mock at an MOI of 1 or 3, and on day 3 after transduction, the modified cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were incubated for 24 and 48 h to evaluate



tonic signaling by measuring the production of IL-2 using ELISA (**a** and **b**). In addition, modified Jurkat cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were incubated with different concentrations of soluble GXM from *C. gattii* R265 for 24 h (**c** and **d**) and also incubated with heat-killed yeast of *C. gattii* R265 or *C. neoformans* H99 at a ratio of 1:1 (cells:yeast) for 24 and 48 h of culture (**e-h**). After 24 and 48 h of incubation, IL-2 levels in the culture supernatant were quantified using ELISA (**c-h**), and cell expansion within 48 h of culture was evaluated using flow cytometry to detect GFP expression, and dead cells were excluded using a propidium iodide marker to determine the cell concentration (cells/mL; **i-n**). The values are expressed as mean  $\pm$  SD. Each experiment was performed in triplicate and repeated at least three times. \*, #p < 0.05; \*\*, ##p < 0.01; \*\*\*, ###p < 0.001; \*\*\*\*, ####p < 0.0001, according to one-way ANOVA. In **c-h**, # denotes statistical significance compared to medium group, and \* represents statistical significance compared to other GXMR-CAR in the same condition. In **i-n**, \* represents statistical significance between GXMR-CAR incubated with or without *Cryptococcus* spp.

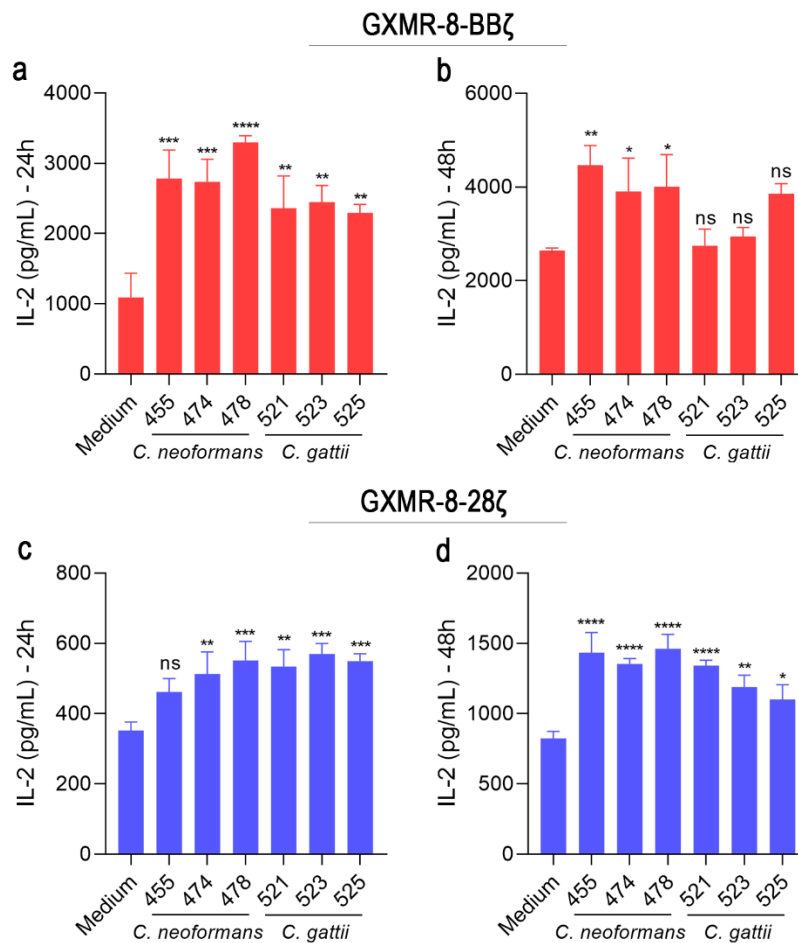


**Figure 4. Dasatinib decreases IL-2 level induced by GXMR-CAR tonic signaling in Jurkat cells.** Jurkat cells were modified by transduction with distinct GXMR-CAR constructs using an MOI of 1 or 3, and 3 days later, the modified Jurkat cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were incubated with different concentrations of NQ301 (**a** and **b**) or dasatinib (**c** and **d**). After 48 h of culture, the IL-2 levels were measured using ELISA, and as a negative control we added a specific volume of DMSO (Medium) equivalent to the highest volume of inhibitors used. The values are expressed as mean  $\pm$  SD. Each experiment was performed in triplicate and repeated at least three times. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, according to one-way ANOVA.



**Figure 5. The response induced by GXMR-CAR in Jurkat cells against *Cryptococcus* spp. was ameliorated by dasatinib.** GXMR-CAR constructs were used for transduction (MOI of 1 or 3) of Jurkat cells, and 3 days after transduction, the modified cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were incubated with heat-killed yeast of *C. gattii* R265 or *C. neoformans* H99 at a ratio of 1:1 (cells:yeast) for 24 and/or 48 h of culture. This approach also considered the previous incubation with dasatinib (50 nM) before the co-culture of GXMR-CAR Jurkat cells with *Cryptococcus* spp., and as negative control, modified cells not treated with dasatinib were used. The quantification of IL-2 levels in the culture supernatant was performed after 24 and 48 h of culture (**a-l**), and cell expansion was measured using flow cytometry within 48 h of culture, as described in Materials and Methods section (**m-r**). The values are expressed as mean  $\pm$  SD.

Each experiment was performed in triplicate and repeated three times. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , according to one-way ANOVA. ns, not significant.



**Figure 6. Heat-killed clinical isolates of *C. neoformans* and *C. gattii* are recognized by GXMR-CARs, inducing T cell activation.** GXMR-8-BB $\zeta$  and GXMR-8-28 $\zeta$  constructs were used for transduction of Jurkat cells using an MOI of 3, and 3 days after transduction, the modified cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were incubated with heat-killed isolates of *C. gattii* or *C. neoformans* at a ratio of 1:1 (cells:yeast) for 48 h of culture. Shown are the quantification of IL-2 levels in the culture supernatant of GXMR-8-BB $\zeta$  cells (**a** and **b**) and GXMR-8-28 $\zeta$  cells (**c** and **d**). The values are expressed as mean  $\pm$  SD. Each experiment was performed in triplicate and repeated three times. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , according to one-way ANOVA. ns, not significant.

### 3.3 Capítulo III: Células GXMR-NK-CAR – Materiais e Métodos

#### 3.3.1 Células NK-92

A linhagem de células *Natural Killer* NK-92, adquirida pela ATCC (CRL-2407), foi rotineiramente cultivada em meio de cultura alfa-MEM suplementado com 12,5% de soro de cavalo (Gibco, USA), 12,5% de soro fetal bovino (Gibco, USA), 0,2 mM de inositol (Sigma-Aldrich), 20 mM de ácido fólico (Sigma-Aldrich), 0,1mM de 2-mercaptoethanol (Gibco, USA), 1% ampicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 200 IU/mL de IL-2 (Peprotech, USA) em atmosfera úmida aquecida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Subculturas foram realizadas a cada 2-3 dias, mantendo a concentração de células entre 3 e 5 x10<sup>5</sup> células/mL.

#### 3.3.2 Geração de células GXMR-NK-CAR

Partículas lentivirais contendo as sequências codificadoras de GXMR-8-BBζ, GXMR-8-28ζ ou GXMR-IgG4-28ζ produzidas em células HEK-293T e tituladas em células Jurkat foram utilizadas para realizar as transduções na linhagem NK-92, por meio do protocolo de *spnoculation*. O vetor Lenti-mock, onde a sequência do GXMR-CAR foi removida, restando apenas a sequência do GFP, foi considerado como controle nos ensaios de transdução. Em placas de 48 poços, 1x10<sup>5</sup> de células NK-92 foram distribuídas em 250 µL de meio fresco, juntamente com volumes de partículas lentivirais correspondentes aos MOI de 3, 5 e 10, e então a placa foi centrifugada por 65 minutos a 850 xg em temperatura ambiente. Após isso, às células foi adicionado 200 IU/mL de IL-2 e as placas foram mantidas em cultura por 3 dias. Decorrido esse tempo, a expressão de GFP e sua intensidade de fluorescência média (MFI) foram avaliados por citometria de fluxo (Guava EasyCyte). Para acompanhar a estabilidade da expressão de GFP, MFI e avaliar o perfil proliferativo das células modificadas durante tempos prolongados de cultivo, as células foram expandidas durante um período de 12 dias de cultura, onde, a cada 3 dias, realizou-se medições da expressão de GFP, estabeleceu-se as concentrações celulares e se adicionou meio fresco, ajustando a concentrações das células para 5x10<sup>5</sup> células/mL. Células NK-92 transduzidas com MOI de 10 com GXMR-8-BBζ, GXMR-8-28ζ ou GXMR-IgG4-28ζ foram expandidas e a população GFP positiva enriquecida em citometria de fluxo por meio de *sorting* das células modificadas.

### 3.3.3 Ensaio de ativação de células GMXR-NK-CAR frente a *Cryptococcus* spp.

Para verificar o reconhecimento das células modificadas frente a leveduras de *Cryptococcus* spp., em placa de 96 poços,  $1 \times 10^6$  de células NK-GXMR-8-BB $\zeta$ , enriquecidas pós *sorting*, ou NK-92 não transduzidas, foram incubadas com leveduras inativadas de *Cryptococcus gattii* R265 ou *Cryptococcus neoformans* H99 a uma proporção de 1:1, em 250  $\mu$ L, por 24 horas. Após esse período, as células e leveduras foram centrifugadas e o sobrenadante clarificado foi colhido para a dosagem por ELISA (*enzyme linked Immunosorbent assay*) da citocina IFN- $\gamma$ , utilizando o kit OptEIA (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.3.4 Ensaios *in vitro* dos efeitos fungicida e fungistático de células GXMR-NK-CAR

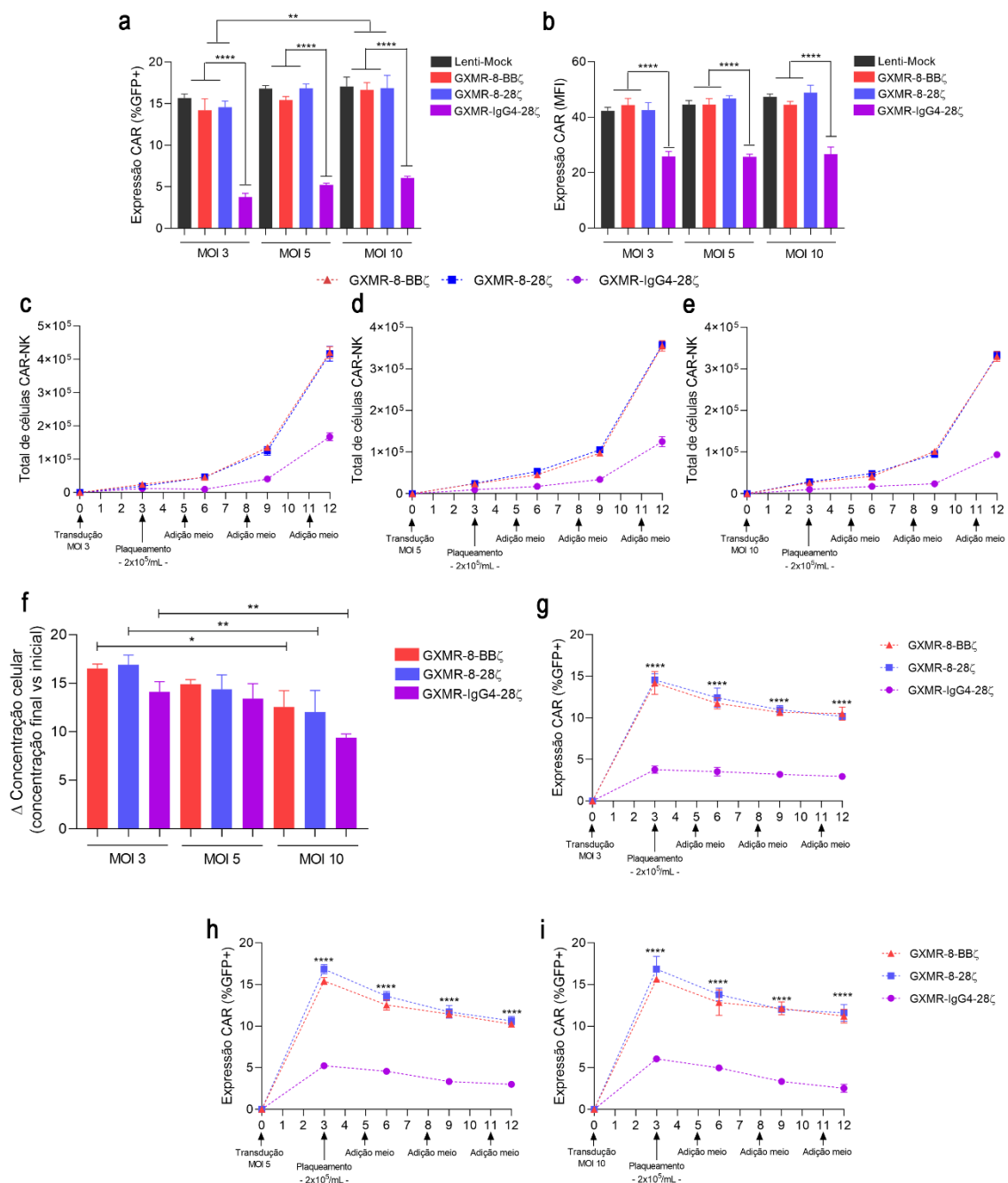
Para avaliação dos efeitos fungicidas e fungistáticos por células NK expressando GXMR-CAR ou células NK-92 não transduzidas, foram considerados três tipos de abordagens: I – co-cultivo de leveduras de *Cryptococcus* spp. com células NK por 5 (efeito fungicida) ou 24 h (efeito fungistático) e posterior plaqueamento de frações do co-cultivo em meio sólido; II – avaliação de efeitos fungicidas sinérgicos entre o antifúngico anfotericina B e células NK, com adição do antifúngico durante o co-cultivo por 24 h e posterior plaqueamento em meio sólido; III – avaliação da susceptibilidade ao antifúngico após o co-cultivo das leveduras com células NK por 24 h e posterior plaqueamento em meio sólido suplementado com anfotericina B. Nesse sentido, células NK-92 expressando GXMR-8-BB $\zeta$  ou células NK-92 não transduzidas foram co-cultivadas com leveduras de *C. gattii* R265 ou *C. neoformans* H99 (cultivadas em meio YNB) em placas de 96 poços a uma proporção de 1 levedura para 200 células, e mantidas em cultura a 37 °C e 5% CO $_2$ . Em placas de Petri contendo meio Sabouraud-dextrose ágar, 50  $\mu$ L de cada condição do co-cultivo foram distribuídos, sendo as placas mantidas a 30 °C por 36 a 48 h. Considerando a condição II, 0.1 $\mu$ g de anfotericina B foi adicionada durante o co-cultivo de células e leveduras, enquanto para condição III, 0.1 ou 1 $\mu$ g de anfotericina B foi adicionada às placas juntamente com Sabouraud-dextrose ágar. Frações do co-cultivo dessas duas condições foram distribuídas nas placas de Petri, que posteriormente foram mantidas a 30 °C pelo período de 36 a 48 h. As colônias de leveduras que se desenvolveram nas placas foram contabilizadas e utilizadas para se estabelecer o cálculo de CFU (*colony forming unit*).

### 3.4 Capítulo III: Células GXMR-NK-CAR – Resultados e Discussão

#### 3.4.1 GXMR-CAR contendo CD8 $\alpha$ como *hinge*/transmembrana tem maior expressão em células NK-92 comparado com GXMR-IgG4-28 $\zeta$

A eficiência de transdução da linhagem NK-92 para expressar GXMR-8-BB $\zeta$ , GXMR-8-28 $\zeta$  ou GXMR-IgG4-28 $\zeta$  foi avaliada através do uso de MOI de 3, 5 e 10 de partículas lentivirais. O vetor Lenti-Mock, contendo apenas a sequência para expressão do GFP foi considerado como controle. Decorridos três dias pós transduções, a expressão de GFP e sua intensidade de fluorescência média foram avaliados por citometria de fluxo e, assim como verificado em células Jurkat, a eficiência de transdução em células NK-92 com os construtos contendo CD8 $\alpha$  na porção *hinge*/transmembrana (GXMR-8-BB $\zeta$  e GXMR-8-28 $\zeta$ ) se mostrou superior em relação ao construto contendo IgG4/CD28 na região em questão, verificado pela porcentagem de células GFP positivas<sup>+</sup> (Figura 2a). A eficiência na transdução de GXMR-8-BB $\zeta$ , GXMR-8-28 $\zeta$  e Lenti-mock não demonstraram diferenças significativas entre si, porém, as células transduzidas com esses constructos em MOI de 10 apresentaram porcentagens significativamente maiores em comparação com as células transduzidas em MOI de 3 (Figura 2a). O nível de expressão do GXMR-CAR, observado pelo MFI, também foi significativamente superior nas células transduzidas com GXMR-8-BB $\zeta$  ou GXMR-8-28 $\zeta$  em comparação com GXMR-IgG4-28 $\zeta$ , (Figura 2b). O efeito da expressão de GXMR-CAR na expansão das células NK-92 modificadas indicou que o comportamento proliferativo das células NK-GXMR-CAR apresentou perfis semelhantes, estando na fase *lag* até aproximadamente o quarto dia de cultivo e entrando na fase logarítmica entre o sétimo e oitavo dia, considerando os três constructos e três MOIs avaliados (Figura 2b, c e d). Considerando o delta da concentração celular (razão da concentração final pela inicial) durante o período de expansão, não houve diferenças significativas entre os valores obtidos nas distintas populações GXMR-CAR positivas geradas sob as mesmas condições (Figura 2e). Entretanto, o aumento na expressão de GXMR-CAR em células NK-92 verificado na transdução com MOI de 10 impactou a expansão celular comparado com as células modificadas com MOI de 3 (Figura 2e). Em relação à estabilidade da expressão de GXMR-CAR durante o período considerado, de forma geral, a porcentagem de células expressando GXMR-8-BB $\zeta$  ou GXMR-8-28 $\zeta$  se mantiveram significativamente maiores do que as células modificadas com GXMR-IgG4-28 $\zeta$  (Figura 2f, g e h). Em conjunto, esses resultados corroboram os achados verificados em células Jurkat expressando GXMR-CAR, pois a substituição da sequência de IgG4 por CD8 $\alpha$  na região

*hinge*/transmembrana conferiu melhor taxa de transdução e maior capacidade de expressão do GXMR-CAR. Além disso, as células NK modificadas com GXMR-8-BB $\zeta$  ou GXMR-8-28 $\zeta$  não diferem na taxa de expansão celular, mesmo após transdução com MOI elevado, o que demonstra um efeito positivo para a criopreservação das linhagens modificadas e também para a expansão celular visando aplicação de estudos em modelo experimental.



**Figura 2.** A substituição da molécula IgG4 por CD8 $\alpha$  em GXMR-CAR aumenta sua expressão em células NK-92. Células NK-92 foram transduzidas com os constructos GXMR-8-BB $\zeta$ , GXMR-8-28 $\zeta$ , GXMR-IgG4-28 $\zeta$  ou Lenti-mock nos MOI's de 3, 5 e 10 e, após 3 dias, avaliou-se em citometria de fluxo as (a) porcentagens de células GFP positivas e (b) MFI. c-e, Expansão das células CAR-NK em diferentes MOI's durante o período de 12 dias de cultivo. f,

$\Delta$  da concentração de células CAR-NK durante a expansão considerando 3 dias pós transdução como concentração inicial e 12 dias pós transdução como concentração final. **g-i**, Expressão do CAR (%GFP) nas células modificadas com diferentes MOI's durante o cultivo por 12 dias. Os dados são expressos como média  $\pm$  SD, com pelo menos 3 replicatas técnicas por experimento. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  de acordo com *one-way* ANOVA. (**g-i**) \* indica significância estatística de GXMR-8-137z e GXMR-8-28z contra GXMR-IgG4-28z.

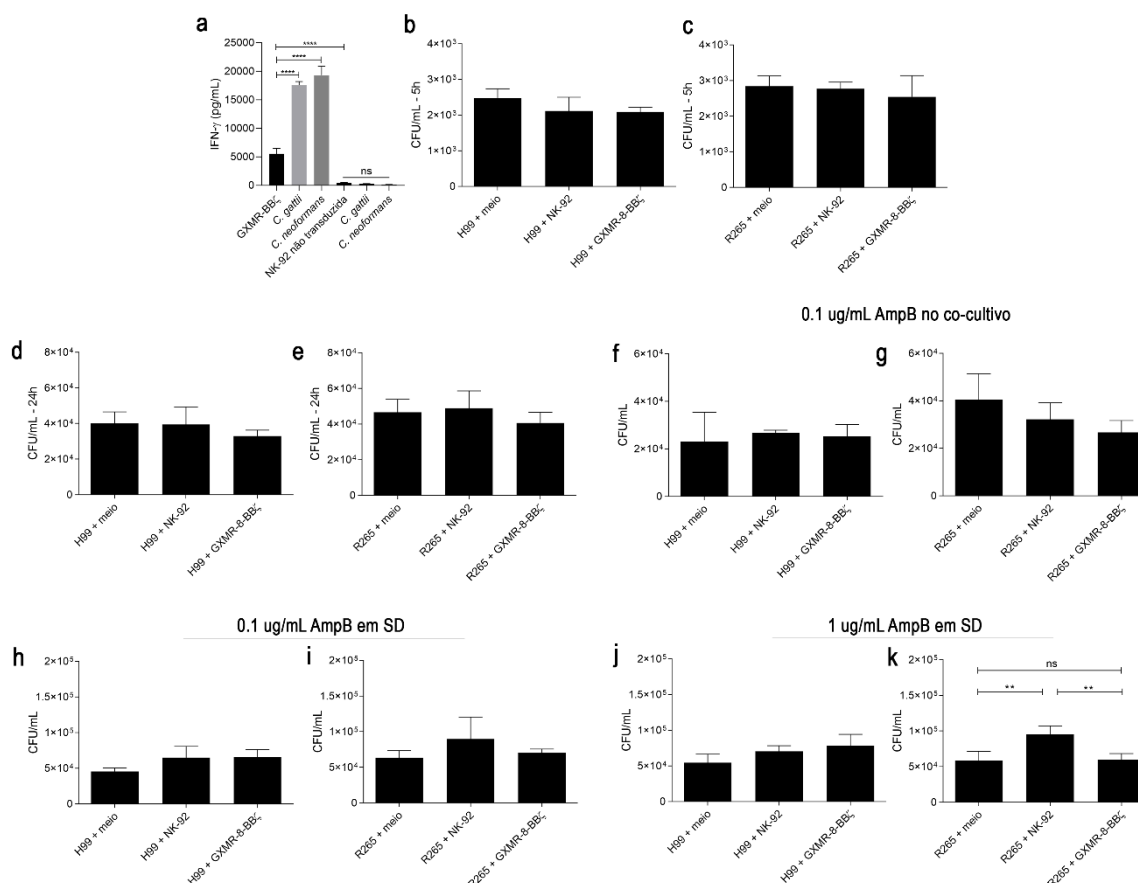
### 3.4.2 Células NK-92 expressando GXMR-8-BB $\zeta$ são ativadas frente à *Cryptococcus* spp., porém não controlam o crescimento fúngico

A partir de células NK-92 expressando GXMR-8-BB $\zeta$ , GXMR-8-28 $\zeta$  ou GXMR-IgG4-28 $\zeta$ , transduzidas com MOI de 10, até o presente momento, somente o enriquecimento da população positiva para GXMR-8-BB $\zeta$  através de *cell sorting* foi concluído, permitindo a criopreservação e estabelecimento de uma população com mais de 90% de expressão desse receptor, mesmo após o descongelamento e prolongados períodos de cultivo. Portanto, os ensaios descritos a seguir foram conduzidos somente considerando essa população de células.

Inicialmente, avaliou-se o reconhecimento de leveduras inativadas de *C. gattii* R265 e *C. neoformans* H99 por células NK-GXMR-8-BB $\zeta$ -CAR, e se essa interação desencadearia a ativação das células. A incubação de células e leveduras inativadas ocorreu por 24 h, e o sobrenadante de cultura foi utilizado na dosagem de IFN- $\gamma$ . Células NK-92 não transduzidas foram consideradas como controle negativo. A detecção de altos níveis de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de células NK-GXMR-8-BB $\zeta$ -CAR na ausência do ligante indica que a modificação dessa linhagem com GXMR-CAR, assim como na linhagem de células Jurkat, desencadeia eventos de sinalização tônica (Figura 3a). Apesar da expressão do GXMR-CAR nessas células induzir esse estado de ativação sem a presença do ligante, a incubação com as leveduras inativadas de *Cryptococcus* spp. e o reconhecimento das mesmas pelo CAR aumentou significativamente os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos pelas células, não havendo, entretanto, diferenças entre as concentrações produzidas na incubação com *C. gattii* ou *C. neoformans* (Figura 3a). Posteriormente, os efeitos fungicidas e fungistático mediados por células NK-GXMR-8-BB $\zeta$ -CAR ou aquelas não transduzidas foram ensaiados frente às leveduras viáveis de *C. gattii* R265 ou *C. neoformans* H99. A incubação das leveduras com as células NK-GXMR-8-BB $\zeta$ -CAR ou NK-92 não transduzida não resultou em diminuição significativa do CFU em relação às leveduras não co-cultivadas com as células; esse resultado se refere ao período de 5 e 24 h de co-cultivo (Figura 3b-e). Considerando a segunda abordagem, a avaliação de um



possível efeito sinérgico das células NK-GXMR-8-BB $\zeta$ -CAR com a droga antifúngica anfotericina B ao adicioná-la no momento do co-cultivo de células NK com as leveduras de *Cryptococcus* spp., revelou que a recuperação de *C. gattii* ou *C. neoformans* não foi comprometida de forma significativa (Figura 3f e g), apesar de uma diminuição no CFU de *C. gattii* após o co-cultivo com células NK-GXMR-8-BB $\zeta$ -CAR ser notada, em comparação com as leveduras cultivadas na ausência dessas células (Figura 3h). Por outro lado, considerando a possível susceptibilidade à anfotericina B causada pelo co-cultivo das leveduras com as células NK (terceira abordagem), a formação de colônias em meio contendo 1  $\mu\text{g/mL}$  da droga antifúngica por *C. gattii* foi significativamente comprometida após o co-cultivo com células NK-GXMR-8-BB $\zeta$ -CAR, enquanto o mesmo não ocorreu quando as leveduras foram co-cultivadas com células NK-92 não transduzidas (Figura 3h). Entretanto, o mesmo não ocorreu considerando a recuperação de *C. neoformans* nas mesmas condições, ou na recuperação das duas espécies em meio contendo 0.1  $\mu\text{g/mL}$  de anfotericina B (Figura 3h, i e j).



**Figura 3. Efeito das células NK-92 expressando GXMR-CAR no crescimento de leveduras de *C. gattii* e *C. neoformans*.** a, Quantificação de IFN-gama no sobrenadante de cultura de células NK-92 expressando GXMR-8-BB $\zeta$  pós *sorting* após incubação com *C. gattii* R265 ou *C. neoformans* H99 na proporção de 1:1 por 24 horas. b-k, Células CAR-NK-BB $\zeta$  foram co-

cultivadas com leveduras de *C. gattii* R265 ou *C. neoformans* H99 na proporção de 1:200 (leveduras:células) e foram plaqueadas em meio Sabouraud-dextrose ágar após 5 (**b** e **c**) ou 24 horas (**d** e **e**) de co-cultivo; após 24 horas de co-cultivo na presença de 1 ug/mL de anfotericina B (**f** e **g**); ou após 24 horas de co-cultivo e plaqueadas em meio Sabouraud-dextrose ágar suplementado com 0.1 (**h** e **i**) ou 1 ug/mL (**j** e **k**) de anfotericina B. Os dados são expressos como média  $\pm$  SD, com pelo menos 4 replicatas técnicas por experimento. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  de acordo com *one-way* ANOVA. ns, não significativo.

Na literatura há diversos trabalhos que pontuam a importância de células NK no controle de infecções fúngicas causadas por diversas espécies, incluindo *Cryptococcus* spp., e especificando os mecanismos de ação envolvidos na atividade antifúngica (SCHMIDT; TRAMSEN; LEHRNBECHER, 2017). Considerando especificamente *Cryptococcus* spp., trabalhos recentes demonstram claramente que o receptor NKp30 é um dos principais PRR responsáveis por mediar o reconhecimento dessas espécies fúngicas e ativar células NK para a produção de grânulos citotóxicos (LI et al., 2013, 2018b; OGBOMO et al., 2018). Esse receptor é responsável por se ligar a moléculas de  $\beta$ -1,3-glucanos presentes na parede celular de diversas espécies fúngicas, além de *Cryptococcus* spp., e seu engajamento leva à sua clusterização, que resulta em uma cascata de sinalização que promove a ativação e a polarização de vesículas contendo grânulos citotóxicos em convergência com a sinapse imunológica formada entre a célula NK e fungo, onde ocorre a degranulação de perforinas com maior atividade fungicida sobre *Cryptococcus* spp. (LI et al., 2013, 2018b; OGBOMO et al., 2018). O reconhecimento de  $\beta$ -1,3-glucanos é particularmente prejudicado em *Cryptococcus* spp. por conta de sua cápsula polissacarídica, que mascara a presença desses epítopos de parede celular. De fato, a ausência da cápsula em linhagens mutantes, como CAP67 de *C. neoformans*, aumentou o nível de expressão de perforinas na linhagem YT de células NK quando incubadas com essas leveduras em comparação com a cepa encapsulada B3501 (MARR et al., 2009). Uma característica em comum entre os trabalhos onde se estabeleceu o NKp30 como essencial na montagem da resposta citotóxica de células NK contra *Cryptococcus* spp. foi a utilização da linhagem YT ou de NK's de origem primária. Em comparação, atualmente não existem trabalhos na literatura avaliando o potencial antifúngico da linhagem NK-92 contra *Cryptococcus* spp. Análises do proteoma e expressão gênica comparando as linhagens NK-92 e YT revelaram diferenças importantes entre essas duas linhagens de células, indicando que a linhagem NK-92 apresenta um fenótipo que se assemelha ao subtipo de células NK caracterizado como CD56**bright**, enquanto a linhagem YT apresenta um fenótipo semelhante ao subtipo CD56**dim**

(GUNESCH et al., 2019). Esses subtipos são utilizados para classificar as populações de células NK constituintes do sangue periférico, e essa diferenciação é baseada na combinação da expressão de diversos receptores que, por sua vez, refletem o fenótipo e função dessas duas populações. Dentre outras características, células NK classificadas como *CD56bright* apresentam baixo potencial citotóxico, devido à baixa produção de grânulos citotóxicos, porém, demonstram potencial de produzir grandes quantidades de citocinas, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , em resposta a estímulos, além de serem precursores da subpopulação *CD56dim* (POLI et al., 2009). É descrito que durante a diferenciação para o fenótipo *CD56dim*, ocorre um aumento significativo no potencial de atividade citotóxica dessas células, com alta produção de grânulos citotóxicos e receptores associados a respostas citolíticas, como KIRK, CD16 e CD57, além da manutenção da capacidade de produção de altas concentrações de citocinas mediante estímulos (MORETTA, 2010). Apesar das linhagens NK-92 e YT demonstrarem atividade citolítica comparável quando incubadas com células tumorais alvo, a expressão de genes relacionados ao fenótipo *CD56bright*, como FCGR3A e SELL, serem maiores em células NK-92, e o aumento da expressão de genes relacionados ao fenótipo *CD56dim*, como DNAM-1, KIR2DL2/L3 e KIR3DL1, na linhagem YT, poderia indicar a diferentes origens dessas linhagens, que, por sua vez, estaria associado a um maior potencial citotóxico pela linhagem YT (GUNESCH et al., 2019).

Considerando os resultados observados na incubação de células NK-92 não transduzidas com leveduras de *Cryptococcus* spp., apesar dessa linhagem de fato expressar o receptor NKp30, a ausência no controle do crescimento das leveduras pode estar associado a uma combinação de fatores que consideram o perfil fenotípico originário dessas células em conjunto com as características estruturais de *Cryptococcus* spp., como a cápsula polisacarídica, que dificulta o reconhecimento pelas células NK-92, permitindo o escape das leveduras. Resultados recentes gerados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a linhagem de células NK-92 de fato não inibe o crescimento de *Cryptococcus* spp, reforçando a nova hipótese de que possivelmente o uso de células NK-92 sem expressar o CAR não seja adequada no controle da criptococose. Em contrapartida, o uso da linhagem NK-92 no presente estudo se baseou na hipótese de que mediante a modificação com GXMR-CAR a capacidade efetora dessas células seria direcionada especificamente para o *Cryptococcus* spp. Porém, a molécula co-estimulatória presente no GXMR-CAR avaliado (4-1BB) é possivelmente responsável pela ausência de um elevado efeito fungicida. A transposição da tecnologia do CAR para abranger células NK se deu

inicialmente com o uso de CAR's carregando sequências de moléculas co-estimulatórias associadas às células T e, atualmente, diversos estudos pré-clínicos ainda se baseiam em constructos tendo principalmente 4-1BB ou CD28 (ou ambos) como regiões de co-estímulo, apesar de a prospecção de novas construções estarem sendo consideradas (ZHANG et al., 2022). Em um estudo recente, observou-se que a atividade citolítica de células NK-92 modificadas com CAR-4-1BB $\zeta$  contra células tumorais alvo resultou em baixa produção de grânulos citotóxicos e TNF- $\alpha$ ; essa atividade citolítica foi significativamente elevada com a substituição do 4-1BB da região co-estimulatória pela molécula NK-2b4 (XU et al., 2019). De fato, estudos indicam que a sinalização de 4-1BB em células NK tende a induzir efeitos inibitórios, diferindo significativamente dos efeitos observados em células T (BARAO, 2012). Baessler et al. (2010) concluíram que a sinalização via 4-1BB em células NK após o seu engajamento com seu ligante (4-1BBL), expresso em células T leucêmicas, diminuiu a atividade citotóxica e de produção de citocinas, que foi posteriormente restaurado com a utilização de agonistas de 4-1BB (BAESSLER et al., 2010). Em linfócitos T, por outro lado, a sinalização via 4-1BB/4-1BBL aumentou a atividade citotóxica contra a mesma categoria de células leucêmicas (HOUTENBOS et al., 2007). Em contraste ao observado em humanos, a sinalização via 4-1BB de origem murina é relacionada ao aumento nas atividades efectoras de células NK (BARAO, 2012). A possível explicação para esse cenário pode estar contida nas diferenças estruturais entre essas duas moléculas, refletindo em diferentes resultados após os eventos sinalizatórios. Tanto 4-1BB de origem humana quanto murina apresentam na região citoplasmática sítios de ligação a proteínas adaptadoras, denominadas TRAF 1 e TRAF2 (ARCH; THOMPSON, 1998). A associação com TRAF2 resulta na ativação de vias de sinalização que recrutam fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B, JNK, and p38, levando à ativação tanto de células NK quanto linfócitos T (WANG et al., 2009). Entretanto, 4-1BB de origem humana, mas não murina, pode também interagir com uma terceira molécula adaptadora, TRAF3 (JANG et al., 1998). A ligação de TRAF3 ao sítio citoplasmático de 4-1BB leva à formação de heterotrímeros com TRAF2, inibindo a ativação da via de NF- $\kappa$ B (HÄCKER; TSENG; KARIN, 2011). Portanto, se tem como hipótese que o engajamento de TRAF3 aja como um regulador negativo da sinalização de 4-1BB, prejudicando a ativação de células NK (baixa expressão de grânulos citotóxicos e TNF- $\alpha$ ) através da inibição da via de NF- $\kappa$ B (BARAO, 2012; XU et al., 2019). Além disso, certas sequências de aminoácidos presentes somente na cauda citoplasmática de 4-1BB humano, podem recrutar moléculas regulatórias; um exemplo

disso é a constatação que uma dessas regiões se assemelha a um motif inibitório de imuno-tirosinas (ITIM) (BAESSLER et al., 2010).

Com base no exposto acima, conclui-se que as células NK-GXMR-8-BB $\zeta$ -CAR apresentaram baixa atividade fungicida sobre leveduras de *Cryptococcus* spp. devido, potencialmente, à presença da molécula co-estimulatória 4-1BB que não favorece a polarização de grânulos citotóxicos diretamente para a região de interação com o fungo, além de induzir um perfil inibitório na ativação de células NK. Em virtude disso, uma possível alternativa que vem sendo executada é a substituição do domínio de sinalização de GXMR-8-BB $\zeta$  representado pela molécula co-estimuladora 4-1BB e cadeia zeta de CD3, pela região intracelular de NKp30, responsável pela indução da ativação de células NK. Dessa forma, geraremos um novo constructo contendo a região de reconhecimento de *Cryptococcus* spp., através da interação com GXM, com a capacidade de induzir a via de sinalização de NKp30, essencial na indução de mecanismos antifúngicos frente a *Cryptococcus* spp.

Conclusão

#### 4 CONCLUSÃO

Os estudos realizados viabilizaram a caracterização e otimização dos novos construtos de GXMR-CAR através da modificação das regiões *hinge*, transmembrana e co-estimulatória. Essas modificações culminaram no construto GXMR-8-BB $\zeta$  que permitiu uma maior expressão do CAR acompanhado por um melhor reconhecimento do antígeno e ativação celular, baseado nas modificações de células Jurkat e células NK-92. Além disso, demonstramos uma aplicação do dasatinibe como ferramenta no controle do nível de ativação mediado por GXMR-CAR. Em relação ao efeito fungicida mediado por GXMR-8-BB $\zeta$  expresso em células NK-92, há um efeito positivo dessas células no aumento da susceptibilidade de *C. gattii* frente a anfotericina B. A modificação de células NK-92 com GXMR-CAR abriu caminho para futuras modificações no CAR afim de satisfazer as características particulares de células NK, e assim, possivelmente aumentar sua capacidade efetora. Portanto, através desse trabalho, conseguimos gerar distintos construtos de GXMR-CAR e avalia-los frente ao ligante, em diferentes tipos celulares, e isso elencou os domínios de GXMR-CAR com melhor funcionalidade na terapia celular contra a criptococose, considerando as células T e NK-92.

## 5 BIBLIOGRAFIA

ABATE-DAGA, D. et al. A novel chimeric antigen receptor against prostate stem cell antigen mediates tumor destruction in a humanized mouse model of pancreatic cancer.

**Human Gene Therapy**, v. 25, n. 12, 2014.

AGHAJANIAN, H.; RURIK, J. G.; EPSTEIN, J. A. **CAR-based therapies: opportunities for immuno-medicine beyond cancer***Nature Metabolism*, 2022. .

AJINA, A.; MAHER, J. **Strategies to address chimeric antigen receptor tonic signaling***Molecular Cancer Therapeutics*, 2018. .

ALABANZA, L. et al. Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains. **Molecular Therapy**, v. 25, n. 11, 2017.

ALBUQUERQUE, P. et al. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 5, n. 1, 2013.

ALMÅSBÄK, H. et al. Inclusion of an IgG1-Fc spacer abrogates efficacy of CD19 CAR T cells in a xenograft mouse model. **Gene Therapy**, v. 22, n. 5, 2015.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, 2006.

ALVES SOARES, E. et al. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012 A descriptive epidemiological study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, 2019.

ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 5, 2014.

ARCH, R. H.; THOMPSON, C. B. 4-1BB and Ox40 Are Members of a Tumor Necrosis Factor (TNF)-Nerve Growth Factor Receptor Subfamily That Bind TNF Receptor-Associated Factors and Activate Nuclear Factor  $\kappa$ B. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 1, 1998.

BAESSLER, T. et al. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. **Blood**, v. 115, n. 15, 2010.

BARAO, I. The TNF receptor-ligands 4-1BB-4-1BBL and GITR-GITRL in NK cell responses. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, 2012.

BAUMAN, S. K.; NICHOLS, K. L.; MURPHY, J. W. Dendritic Cells in the Induction of



Protective and Nonprotective Anticryptococcal Cell-Mediated Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 1, 2000.

BELAY, T. et al. Reactivity patterns and epitope specificities of anti-Cryptococcus neoformans monoclonal antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay and dot enzyme assay. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, 1997.

BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. **Cell Reports**, v. 3, n. 2, 2013.

BENHAM, R. W. Cryptococci—their identification by morphology and by serology. **Journal of Infectious Diseases**, v. 57, n. 3, 1935.

BENHAM, R. W. CRYPTOCOCCOSIS AND BLASTOMYCOSIS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 50, n. 10, 1950.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . **Annual Review of Immunology**, 1997. .

BOULWARE, D. R. Cryptococcus: from human pathogen to model yeast. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 434, 1 jun. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309911701402>>. Acesso em: 22 maio. 2020.

BRENTJENS, R. J. et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 18, 2007.

BRENTJENS, R. J. et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 177, 2013.

BRIDGEMAN, J. S. et al. The Optimal Antigen Response of Chimeric Antigen Receptors Harboring the CD3 $\zeta$  Transmembrane Domain Is Dependent upon Incorporation of the Receptor into the Endogenous TCR/CD3 Complex. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, 2010.

BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Predictors of Mortality and Differences in Clinical Features among Patients with Cryptococcosis According to Immune Status. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

BROCKER, T.; KARJALAINEN, K. Signals through T cell receptor- $\zeta$  chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 5, 1995.

CAMPUZANO, A.; WORMLEY, F. L. Innate immunity against cryptococcus, from recognition to elimination. **Journal of Fungi**, 2018. .

CAPPELL, K. M.; KOCHENDERFER, J. N. **A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains***Nature Reviews Clinical Oncology*, 2021. .

CARPENITO, C. et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 9, 2009.

CASADEVALL, A. et al. Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 6, 1998.

CASADEVALL, A. et al. **The capsule of *Cryptococcus neoformans****Virulence*, 2019. .

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 7, 1994.

CHEN, L. C. et al. Antibody response to *Cryptococcus neoformans* proteins in rodents and humans. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, 1999.

CHEN, S. et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, 2000.

CHERNIAK, R. et al. Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. **Molecular Immunology**, v. 17, n. 8, 1980.

CHIAPELLO, L. S. et al. *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric oxide in a caspase-independent pathway. **International Immunology**, v. 20, n. 12, 2008.

CHMIELEWSKI, M. et al. T Cell Activation by Antibody-Like Immunoreceptors: Increase in Affinity of the Single-Chain Fragment Domain above Threshold Does Not Increase T Cell Activation against Antigen-Positive Target Cells but Decreases Selectivity. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 12, 2004.

CHOWDHARY, A. et al. **Environmental prevalence of *cryptococcus neoformans* and *cryptococcus gattii* in India: An update***Critical Reviews in Microbiology*, 2012. .

CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, 2011.

COX, G. M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection**

**and Immunity**, v. 68, n. 2, 2000.

DA SILVA, T. A. et al. Glucuronoxylomannan in the *Cryptococcus* species capsule as a target for Chimeric Antigen Receptor T-cell therapy. **Cytherapy**, v. 23, n. 2, 2021.

DATTA, K. et al. **Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest Region of the United States***Emerging Infectious Diseases*, 2009. .

DAVIS, M. J. et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **mBio**, v. 4, n. 3, 2013.

DE ALMEIDA, J. R. F. et al. The efficacy of humanized antibody against the *Sporothrix* antigen, gp70, in promoting phagocytosis and reducing disease burden. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, 2017.

DENLINGER, N.; BOND, D.; JAGLOWSKI, S. **CAR T-cell therapy for B-cell lymphoma***Current Problems in Cancer*, 2022. .

DESHAW, M.; PIROFSKI, L. A. Antibodies to the *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan are ubiquitous in serum from HIV+ and HIV- individuals. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 99, n. 3, 1995.

DONG, Z. M.; MURPHY, J. W. Cryptococcal polysaccharides induce L-selectin shedding and tumor necrosis factor receptor loss from the surface of human neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 3, 1996.

DOS SANTOS, M. H. et al. Titan cells and yeast forms of *cryptococcus neoformans* and *cryptococcus gattii* are recognized by gxmrcar. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, 2021.

ELSEGEINY, W.; MARR, K. A.; WILLIAMSON, P. R. **Immunology of cryptococcal infections: Developing a rational approach to patient therapy***Frontiers in Immunology*, 2018. .

EMMONS, C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 6, 1951.

EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **American Journal of Epidemiology**, v. 62, n. 3, 1955.

ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e180057, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29668825>>. Acesso em: 22 maio. 2020.

EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. **Journal of**

**immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 64, n. 5, 1950.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; CASADEVALL, A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. **Microbiology**, v. 147, n. 8, 2001.

FIGUEIREDO, A. B. C. et al. Monoclonal antibodies against cell wall chitooligomers as accessory tools for the control of cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 12, 2021.

FINNEY, H. M. et al. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 6, 1998.

FRIGAULT, M. J. et al. Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 4, 2015.

GERSTEIN, A. C. et al. Polyploid titan cells produce haploid and aneuploid progeny to promote stress adaptation. **mBio**, v. 6, n. 5, 2015.

GIL, D.; SCHRUM, A. G. Strategies to stabilize compact folding and minimize aggregation of antibody-based fragments. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 04, n. 04, 2013.

GILES, S. S. et al. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: An essential link between antioxidant function and high-temperature growth. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, 2005.

GOLDMAN, D. L. et al. Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, 2000.

GOLDMAN, D. L. et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, 2001.

GOTTLIEB, D. J. et al. Prophylactic antigen-specific T-cells targeting seven viral and fungal pathogens after allogeneic haemopoietic stem cell transplant. **Clinical and Translational Immunology**, v. 10, n. 3, 2021.

GRANGER, D. L.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*: Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 2, 1985.

GROSS, G. et al. Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with

- antibody type-specificity. **Transplantation Proceedings**, v. 21, n. 1 I, 1989.
- GROSS, G.; WAKS, T.; ESHHAR, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 24, 1989.
- GUEDAN, S. et al. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/ TH1 cells. **Blood**, v. 124, n. 7, 2014.
- GUEDAN, S. et al. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. **JCI insight**, v. 3, n. 1, 2018.
- GUEDAN, S. et al. **Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors** *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 2019. .
- GUEST, R. D. et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: Evaluation of four different scFvs and antigens. **Journal of Immunotherapy**, v. 28, n. 3, 2005.
- GUNESCH, J. T. et al. Genome-wide analyses and functional profiling of human NK cell lines. **Molecular Immunology**, v. 115, 2019.
- GUPTA, S. et al. Disseminated cryptococcal infection in a patient with hypogammaglobulinemia and normal T cell functions. **The American Journal of Medicine**, v. 82, n. 1, 1987.
- HÄCKER, H.; TSENG, P. H.; KARIN, M. **Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator** *Nature Reviews Immunology*, 2011. .
- HARDISON, S. E. et al. Interleukin-17 is not required for classical macrophage activation in a pulmonary mouse model of *Cryptococcus neoformans* infection. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, 2010.
- HASO, W. et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 121, n. 7, 2013.
- HE, W. et al. Phagocytic activity and monocyte chemotactic protein expression by pulmonary macrophages in persistent pulmonary Cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 2, 2003.
- HOMBACH, A. A. et al. OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4+ T cells. **OncoImmunology**, v. 1, n. 4, 2012.
- HOUTENBOS, I. et al. Leukemia-specific T-cell reactivity induced by leukemic dendritic cells is augmented by 4-1BB targeting. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 1,

2007.

HU, Y.; TIAN, Z.; ZHANG, C. Natural Killer Cell-Based Immunotherapy for Cancer: Advances and Prospects. **Engineering**, v. 5, n. 1, 2019.

HUANG, H. et al. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal  $\beta$ -glucans and toll-like receptor agonists. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, 2009.

HUDECEK, M. et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 12, 2013.

HUDECEK, M. et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 2, 2015.

IMAI, C. et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. 4, 2004.

IRVING, B. A.; WEISS, A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor  $\zeta$  chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. **Cell**, v. 64, n. 5, 1991.

IYER, K. R. et al. **Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook** *Nature Reviews Microbiology*, 2021. .

JANG, I. K. et al. Human 4-1BB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor- $\kappa$ B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, n. 3, 1998.

JENSEN, M. C. et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 16, n. 9, 2010.

JIANG, S. Immunity against fungal infections. **Immunology and Immunogenetics Insights**, v. 8, 2016.

KAWALEKAR, O. U. et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. **Immunity**, v. 44, n. 2, 2016.

KECHICHIAN, T. B.; SHEA, J.; DEL POETA, M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, 2007.

KELLY, S. L. et al. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol  $\Delta 8 \rightarrow 7$

isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **FEMS Microbiology Letters**, v. 122, n. 1–2, 1994.

KERSHAW, M. H. et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 20 PART 1, 2006.

KONTOYIENNIS, D. P. et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: Overview of the transplant-associated infection surveillance network (TRANSNET) database. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 8, 2010.

KOZEL, T. R. et al. Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular O acetylation or xylosyl side chains. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, 2003.

KOZEL, T. R.; GOTSCHLICH, E. C. The capsule of *cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 129, n. 4, 1982.

KOZEL, T. R.; MASTROIANNI, R. P. Inhibition of phagocytosis by cryptococcal polysaccharide: dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis. **Infection and Immunity**, v. 14, n. 1, 1976.

KRAUS, P. R. et al. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 5, 2003.

KRAUSE, A. et al. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 4, 1998.

KRONSTAD, J. W.; HU, G.; JUNG, W. H. **An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*** **Trends in Microbiology**, 2013. .

KUMARESAN, P. et al. Automated cell enrichment of cytomegalovirus-specific T cells for clinical applications using the cytokine-capture system. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 104, 2015.

KUMARESAN, P. R. et al. Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 29, 2014.

KUMARESAN, P. R.; DA SILVA, T. A.; KONTOYIANNIS, D. P. Methods of Controlling Invasive Fungal Infections Using CD8+ T Cells. **Frontiers in immunology**,

- v. 8, p. 1939, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29358941>>. Acesso em: 21 maio. 2020.
- KUÛNKELE, A. et al. Functional tuning of CARs reveals signaling threshold above which CD8+ CTL antitumor potency is attenuated due to cell fas-FasL-Dependent AICD. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 4, 2015.
- KUWANA, Y. et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 149, n. 3, 1987.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. Systematics of the Genus *Cryptococcus* and Its Type Species *C. neoformans*. In: **Cryptococcus**. [s.l: s.n.]
- KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, 2015.
- LARSEN, R. A. et al. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, 2005.
- LEE, H. et al. TUP1 disruption in *Cryptococcus neoformans* uncovers a peptide-mediated density-dependent growth phenomenon that mimics quorum sensing. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 3, 2007.
- LI, G. et al. 4-1BB enhancement of CAR T function requires NF- $\kappa$ B and TRAFs. **JCI insight**, v. 3, n. 18, 2018a.
- LI, S. S. et al. The NK receptor NKp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients. **Cell Host and Microbe**, v. 14, n. 4, 2013.
- LI, S. S. et al. Identification of the fungal ligand triggering cytotoxic PRR-mediated NK cell killing of *Cryptococcus* and *Candida*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018b.
- LIN, J.-S. et al. Dendritic Cells Cross-Present Exogenous Fungal Antigens to Stimulate a Protective CD8 T Cell Response in Infection by *Histoplasma capsulatum*. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 10, 2005.
- LINDNER, S. E. et al. **Chimeric antigen receptor signaling: Functional consequences and design implications** *Science Advances*, 2020. .
- LIU, L.; TEWARI, R. P.; WILLIAMSON, P. R. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, 1999.



- LOYSE, A. et al. **Cryptococcal meningitis: Improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries***The Lancet Infectious Diseases*, 2013. .
- LUPO, K. B.; MATOSEVIC, S. **Natural killer cells as allogeneic effectors in adoptive cancer immunotherapy***Cancers*, 2019. .
- MA, L. L. et al. NK Cells Use Perforin Rather than Granulysin for Anticryptococcal Activity. *The Journal of Immunology*, v. 173, n. 5, 2004.
- MARR, K. J. et al. Cryptococcus neoformans directly stimulates perforin production and rearms NK cells for enhanced anticryptococcal microbicidal activity. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 6, 2009.
- MATA, M. et al. Inducible activation of myD88 and CD40 in CAR T cells results in controllable and potent antitumor activity in preclinical solid tumor models. *Cancer Discovery*, v. 7, n. 11, 2017.
- MATTHEWS, R. C. et al. Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 7, 2003.
- MAY, R. C. et al. **Cryptococcus: From environmental saprophyte to global pathogen***Nature Reviews Microbiology*, 2016. .
- MCCLELLAND, E. E. et al. Ab binding alters gene expression in Cryptococcus neoformans and directly modulates fungal metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 4, 2010.
- MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 3, 2006.
- MCFADDEN, D. C. et al. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in Cryptococcus neoformans. *Eukaryotic Cell*, v. 6, n. 8, 2007.
- MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of Cryptococcus neoformans affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 4, 2005.
- MERRIFIELD, E. H.; STEPHEN, A. M. Structural investigations of two capsular polysaccharides from cryptococcus neoformans. *Carbohydrate Research*, v. 86, n. 1, 1980.
- MILONE, M. C. et al. Chimeric Receptors Containing CD137 Signal Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy In

- Vivo. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 8, p. 1453–1464, 1 ago. 2009. Disponível em: <[https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(16\)31868-8?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1525001616318688%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(16)31868-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1525001616318688%3Fshowall%3Dtrue)>. Acesso em: 22 maio. 2020.
- MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, 1995.
- MONTOYA, M. C.; MAGWENE, P. M.; PERFECT, J. R. **Associations between cryptococcus genotypes, phenotypes, and clinical parameters of human disease: A review***Journal of Fungi*, 2021. .
- MORETTA, L. **Dissecting CD56dim human NK cells***Blood*, 2010. .
- MORIN, S. O. et al. In the absence of its cytosolic domain, the CD28 molecule still contributes to T cell activation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 14, 2015.
- MOVAHED, E. et al. Lung-infiltrating T helper 17 cells as the major source of interleukin-17A production during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **BMC Immunology**, v. 19, n. 1, 2018.
- MUKAREMERA, L.; NIELSEN, K. Adaptive Immunity to *Cryptococcus neoformans* Infections. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 4, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29333430>>. Acesso em: 29 jun. 2020.
- MULLARD, A. **FDA approves first CAR T therapy***Nature Reviews Drug Discovery*, 2017. .
- MULLER, Y. D. et al. The CD28-Transmembrane Domain Mediates Chimeric Antigen Receptor Heterodimerization With CD28. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.
- MUNSHI, N. C. et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 8, 2021.
- NARNI-MANCINELLI, E.; VIVIER, E.; KERDILES, Y. M. **The “T-cell-ness” of NK cells: Unexpected similarities between NK cells and T cells***International Immunology*, 2011. .
- NEELAPU, S. S. et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 26, 2017.
- NEOFYTOS, D. et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: Analysis of multicenter prospective antifungal therapy (PATH) alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 3,

2009.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. **Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006. .

NOVERR, M. C. et al. CNLAC1 Is Required for Extrapulmonary Dissemination of *Cryptococcus neoformans* but Not Pulmonary Persistence. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, 2004.

O, Z. et al. Capsule Enlargement in *Cryptococcus Neoformans* Confers Resistance to Oxidative Stress Suggesting a Mechanism for Intracellular Survival. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 10, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18554313/>>. Acesso em: 22 maio. 2020.

OGBOMO, H. et al. Granule-Dependent NK Cell Killing of *Cryptococcus* Requires Kinesin to Reposition the Cytolytic Machinery for Directed Cytotoxicity. **Cell Reports**, v. 24, n. 11, 2018.

OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, 2010.

OKAGAKI, L. H.; NIELSEN, K. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 6, 2012.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, 2004.

OST, K. S. et al. The *Cryptococcus neoformans* Alkaline Response Pathway: Identification of a Novel Rim Pathway Activator. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 4, 2015.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 3, 2009.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. **An insight into the antifungal pipeline: Selected new molecules and beyond** *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010. .

PACHL, J. et al. A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 10, 2006.

PAGANO, L. et al. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: Results of the SEIFEM B-2004 study - Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine nelle Emopatie Maligne. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 9, 2007.

- PAN, K. et al. **CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy** *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 2022. .
- PAPADOPOULOU, A. et al. **Adoptive transfer of Aspergillus-specific T cells as a novel anti-fungal therapy for hematopoietic stem cell transplant recipients: Progress and challenges** *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016. .
- PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. **Cryptococcosis: A review of the Brazilian experience for the disease** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2003. .
- PERRUCCIO, K. et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood*, v. 106, n. 13, 2005.
- PETZOLD, E. W. et al. Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 10, 2006.
- PIROFSKI, L. anne; CASADEVALL, A. **What is infectiveness and how is it involved in infection and immunity?** *BMC Immunology*, 2015. .
- POLI, A. et al. **CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset** *Immunology*, 2009. .
- PORTER, D. L. et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Science Translational Medicine*, v. 7, n. 303, 2015.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 8, p. 873–881, 1 ago. 2017. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(17\)30243-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(17)30243-8/fulltext)>. Acesso em: 21 maio. 2020.
- RICHIE, D. L. et al. Nonspecific effect of mycograb on amphotericin B MIC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 7, 2012.
- ROSAS, Á. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiology Letters*, v. 153, n. 2, 1997.
- SALAS, S. D. et al. Effect of the laccase gene, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Experimental Medicine*, v. 184, n. 2, 1996.
- SAM, Q. H. et al. **Immunomodulation as therapy for fungal infection: Are we closer?** *Frontiers in Microbiology*, 2018. .

- SCHMIDT, S. et al. Natural killer cell line nk-92-mediated damage of medically important fungi. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, 2021.
- SCHMIDT, S.; TRAMSEN, L.; LEHRNBECHER, T. **Natural killer cells in antifungal immunity***Frontiers in Immunology*, 2017. .
- SCHUSTER, S. J. et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 1, 2019.
- SHOURIAN, M.; QURESHI, S. T. **Resistance and tolerance to cryptococcal infection: An intricate balance that controls the development of disease***Frontiers in Immunology*, 2019. .
- SIDDIQI, O. K. et al. Molecular diagnosis of central nervous system opportunistic infections in HIV-infected zambian adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 12, 2014.
- SOE, W. M. et al. Using expanded natural killer cells as therapy for invasive aspergillosis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, 2020.
- SONG, D. G.; POWELL, D. J. **Pro-survival signaling via CD27 costimulation drives effective CAR T-cell therapy***OncoImmunology*, 2012. .
- SPRINGER, D. J. et al. Development of an Aerosol Model of Cryptococcus Reveals Humidity as an Important Factor Affecting the Viability of Cryptococcus during Aerosolization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.
- STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, 2001.
- STERNER, R. C.; STERNER, R. M. **CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies***Blood Cancer Journal*, 2021. .
- STOIBER, S. et al. **Limitations in the design of chimeric antigen receptors for cancer therapy***Cells*, 2019. .
- STONE, N. R. H. et al. **Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions***Drugs*, 2016. .
- SUBRAMANIAM, K. et al. 244-251 IgM + memory B cell expression predicts HIV-associated cryptococcosis status. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 2, 2009.
- SYME, R. M. et al. Phagocytosis and protein processing are required for presentation of

Cryptococcus neoformans mitogen to T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, 2000.

TENFORDE, M. W. et al. **Treatment for HIV-associated cryptococcal meningitis** *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018. .

TONN, T. et al. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. **Infusionstherapie und Transfusionsmedizin**, v. 28, n. SUPPL. 1, 2001.

TONN, T. et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. **Cytotherapy**, v. 15, n. 12, 2013.

VALDEZ, P. A. et al. Prostaglandin E2 Suppresses Antifungal Immunity by Inhibiting Interferon Regulatory Factor 4 Function and Interleukin-17 Expression in T Cells. **Immunity**, v. 36, n. 4, 2012.

VAN DER STEGEN, S. J. C.; HAMIEH, M.; SADELAIN, M. **The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors** *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015.

VARTIVARIAN, S. E. et al. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 1, 1993.

VILLENA, S. N. et al. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 6, 2008.

VITENSHTEIN, A. et al. NK Cell Recognition of *Candida glabrata* through Binding of NKp46 and NCR1 to Fungal Ligands Epa1, Epa6, and Epa7. **Cell Host and Microbe**, v. 20, n. 4, 2016.

VOELZ, K. et al. "Division of labour" in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

WAGER, C. M. L.; WORMLEY, F. L. **Classical versus alternative macrophage activation: The Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections** *Mucosal Immunology*, 2014. .

WANG, C. et al. **Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: Complexities and challenges** *Immunological Reviews*, 2009. .

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, 1994a.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. **Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-Dopa decreases its susceptibility to amphotericin B** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994b. .

- WILDER, J. A. et al. Complementation of a capsule deficient *Cryptococcus neoformans* with Cap64 restores virulence in a murine lung infection. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, 2002.
- WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic Grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 127, n. 3, 1968.
- WOZNIAK, K. L.; VYAS, J. M.; LEVITZ, S. M. In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, 2006.
- XU, Y. et al. 2B4 costimulatory domain enhancing cytotoxic ability of anti-CD5 chimeric antigen receptor engineered natural killer cells against T cell malignancies. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 12, n. 1, 2019.
- YANG, J. C.; ROSENBERG, S. A. Adoptive T-Cell Therapy for Cancer. In: **Advances in Immunology**. [s.l: s.n.]130.
- YI, Z. et al. Optimizing EphA2-CAR T Cells for the Adoptive Immunotherapy of Glioma. **Molecular Therapy - Methods and Clinical Development**, v. 9, 2018.
- Z, E. et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 2, 1993.
- ZARAGOZA, O. et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, 2010.
- ZARAGOZA, O. **Basic principles of the virulence of Cryptococcus** Virulence, 2019. .
- ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C.; CASADEVALL, A. Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO<sub>2</sub>. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, 2003.
- ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. **Titan cells in Cryptococcus neoformans: Cells with a giant impact** Current Opinion in Microbiology, 2013. .
- ZHANG, L. et al. **CAR-NK cells for cancer immunotherapy: from bench to bedside** Biomarker Research, 2022. .
- ZHAO MING DONG; MURPHY, J. W. Mobility of human neutrophils in response to *Cryptococcus neoformans* cells, culture filtrate antigen, and individual components of the antigen. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, 1993.
- ZHAO, Z. et al. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor

Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. **Cancer Cell**, v. 28, n. 4, 2015.

ZHONG, X. S. et al. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI 3 kinase/AKT/Bcl-X L activation and CD8 T cell-mediated tumor eradication. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 2, 2010.