



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

**Papel das células dendríticas no direcionamento da resposta dos  
linfócitos T a peptídeos sintéticos derivados da proteína Hsp70 de  
*Cryptococcus gattii***

DEYLANE MENEZES TELES E OLIVEIRA

TERESINA

2016

DEYLANE MENEZES TELES E OLIVEIRA

**Papel das células dendríticas no direcionamento da resposta dos linfócitos T a peptídeos sintéticos derivados da proteína Hsp70 de *Cryptococcus gattii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde. Área de concentração - Métodos diagnósticos e análises das condições de saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva

**Coorientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Semiramis J.H. do Monte

TERESINA

2016

## DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**Mestranda:** Deylane Menezes Teles e Oliveira

**Título:** *Papel das células dendríticas no direcionamento da resposta dos linfócitos T a peptídeos sintéticos derivados da proteína Hsp70 de Cryptococcus gattii.*

**Professor Orientador:** Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva

Data da Defesa \_\_/\_\_/\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva

**(Presidente)**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Liline Maria Soares Martins

**(1º examinadora)**

---

Dr. Rafael Melo Santos de Serpa Brandão

**(2º examinador)**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Semiramis Jamil Hadad do Monte

**(Suplente)**

## Dedicatória

Dedico este trabalho a minha **família**, incentivadores em tempo integral, pelo apoio absoluto, por sempre acreditarem em mim, ainda que eu duvidasse.

Ao casal mais importante da minha vida, **Antônio Teles** e **Izabel Menezes**, meus pais ao nos ensinar que a capacidade do ser humano é aliada a sua perseverança. E, apesar dos poucos recursos financeiros, educaram seus filhos para o caminho do conhecimento, da ética e da honestidade.

Especialmente ao meu pai (*in memoriam*). Como disse Guimarães Rosa “Tudo perdia a eternidade e a certeza; num lufo, num átimo, da gente as mais belas coisas se roubavam. Como podia? Por que tão de repente? Soubesse que ia ser assim, ao menos teria olhado mais...”. Meu amor eterno. Guardarei em minhas lembranças sua lágrima derradeira.

Aos meus adorados irmãos, **Taiany**, **Dalyne**, **Antonia Ilany** e **Jhony**, pelo amor e apoio incondicional durante esta intensa jornada. Até no momento mais doloroso de nossas vidas, não permitiram que eu me abatesse. Reafirmamos nosso afeto diariamente.

Aos meus amados sobrinhos, **Sofia** e **Antônio** por tornarem minha vida leve e feliz.

Ao meu esposo, **Thiago Maciel**, pela paciência, carinho e cuidados dispensados a mim nas horas difíceis. Até mesmo quando não me suporto, ele sempre está lá para dedicar seu amor. Amo-te!

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao meu querido Orientador Professor **Dr. Adalberto Socorro da Silva**. É muito difícil buscar termos apropriados para expressar o meu carinho e admiração por esta pessoa. Apesar desses dois anos árduos, a vida, mais uma vez, foi muito generosa comigo quando me proporcionou o ensejo de conviver com o Prof. Dr. Adalberto, Profissional Biólogo referência para a vida. Sou grata por apreciar sua competência profissional, seu carisma e generosidade em repartir seu conhecimento sem parecer soberbo. Admiro-o, sobremaneira, pela sua história e genialidade. Minha inspiração profissional e exemplo de humildade. Professor, muito obrigada pelas conversas estimuladoras e pelos ensinamentos!

À minha estimada Coorientadora Professora **Dra. Semiramis J. Hadad do Monte**. Minha referência de mulher sábia, ética e competente. Pessoa franca e admirável que me acolheu no Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular – LIB, que confiou nos meus potenciais, insistiu na minha capacitação e ofertou o suporte necessário para desenvolvermos este trabalho, mesmo diante dos infortúnios. Admiro-a por sua competência profissional e sabedoria ao lidar com as adversidades, na tentativa de aperfeiçoar a pesquisa no Estado do Piauí. Muitíssimo obrigada pelo amparo e apoio ininterrupto demonstrado ao longo desses quatro anos!

Por último, mas não menos importante, à Professora **Dra. Liline Maria Soares Martins**, pessoa afetuosa, gentil e extremamente inteligente. Agradeço-a por dedicar seu precioso tempo me acompanhando nos laboriosos experimentos, pelas conversas confortantes, pelos ensinamentos de honestidade e profissionalismo, pelo amor a micologia e por estimular meu crescimento profissional. Admiro-a por suas virtudes, sua dedicação a profissão e por acreditar no melhor das pessoas. Obrigada pelo convívio, ensinamentos e sua amizade!

## AGRADECIMENTOS

Após dois intensos anos de experiência no Mestrado tenho muito a agradecer a Deus pelas as bênçãos e proteção, e as pessoas que me ampararam nessa jornada.

Ao Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB) da Universidade Federal do Piauí sob a Coordenação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Semiramis Jamil Hadad do Monte, e a Comissão de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela permissão da realização deste trabalho.

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Piauí (Hemopi), em especial, a pessoa de Valdomiro da Silva Aragão, Supervisor de Processamento de Sangue, por ter cedido gentilmente bolsas de sangue que seriam usadas para controle de qualidade.

Aos amigos do LIB Vanildo, Rubens, Raimundo, Deusa, Gleiciane, Iraci, Cristina e Hélio, pela valorosa convivência, pessoas maravilhosas que não medem esforços para nos ajudar, esclarecer dúvidas ou até mesmo nos estimular com uma palavra amiga.

Aos meus amados pais **Izabel Menezes** e **Antônio Teles** (*in memoriam*), meus bens mais preciosos e mestres de uma vida toda. Devo tudo a vocês!

Aos meus adorados irmãos, **Taiany**, **Dalyne**, **Antônia Ilany** e **Jhony**, pela cumplicidade de sempre e apoio incondicional.

Ao meu esposo **Thiago Maciel**, pelo companheirismo, amor e paciência. Sua presença me alegra e a certeza de que sempre poderei contar com você me conforta.

Ao meu sogro e minha estimada sogra, **José Antônio Oliveira** e **Deusinete Maciel**, pelo incentivo e confiança depositada em mim.

Ao meu cunhado **Lucas Maciel** e minha querida cunhada **Débora Maciel**. A Débora sou grata pelas sábias palavras de encorajamento, pela ajuda na formatação do trabalho e por nossa amizade.

À minha fiel amiga e irmã de alma, **Ana Márjory**, pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo, por estar ao meu lado nos momentos mais importantes e o mais doloroso. Minha companheira de vida.

Aos meus queridos “**Jumanjis**”, que me fazem tão feliz. Com eles sei que sempre terei uma palavra amiga, um abraço acolhedor, alegria de sobra e boas risadas.

À minha colega de profissão e grande amiga **Anaregina Sousa**, pelo imenso apoio e valorosos ensinamentos em Biologia Molecular. Com ela aprendi a ter paciência e apreender por meio da observação, admiro-a pela grande profissional que é.

À doutoranda, amiga e companheira de laboratório, **Ester Miranda**, pela valiosa ajuda nos experimentos, por não medir esforços em ensinar e compartilhar seus conhecimentos e pelas sábias palavras de encorajamento nos corredores.

À minha amiga **Bruna Pierote**, que em tão pouco tempo me cativou com seu sorriso largo, generosidade e paciência. Agradeço-a pelos ensinamentos e preciosa convivência.

Ao amigo e agora Mestre **Fabiano Vieira**, por levantar cedo, dirigir-se ao Hemocentro e gentilmente trazer as bolsas de sangue até mim. Obrigada pelo apoio, convívio na bancada e por estar sempre de braços abertos para me auxiliar e dividir suas experiências.

Ao **Dr. Rafael Melo Santos de Serpa Brandão**, pelos valorosos ensinamentos em Micologia e pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas de Turma do Mestrado, pela convivência agradável e parcerias das horas difíceis, em especial ao amigo **José Carlos** (*in memoriam*), uma das pessoas mais inteligentes e gentis que já conheci. E não poderia esquecer as minhas “Cocotinhas”, as melhores companheiras de curso e vida que eu poderia ter. Considero-me uma felizarda por tê-las em minha vida.

A Universidade Federal do Piauí, sobretudo ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde por proporcionar conhecimentos de qualidade, e oportunidade de conviver e trocar experiências com distintos profissionais. Além, do incentivo à pesquisa na área da saúde.

Por fim, agradeço a todos aqueles que algum modo contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho e realização de um sonho, muito obrigada!

**“Tudo, aliás, é a ponta de um mistério,  
inclusive os fatos. Ou a ausência deles.  
Duvida? Quando nada acontece há um  
milagre que não estamos vendo.”**

**João Guimarães Rosa**



## RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica de significativa morbiletalidade caracterizada por afecções do trato respiratório e meningoencefalite. Diagnostica-se um milhão de casos novos dessa doença por ano, 60% dos quais irão morrer, a despeito das terapias antifúngicas atualmente empregadas. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os agentes etiológicos da criptococose, tendo o segundo recebido notoriedade nas últimas décadas por causar surtos da doença em regiões antes não endêmicas. A sintomatologia da criptococose é confundida com a de outras patologias pulmonares mais comuns e, normalmente, é subdiagnosticada. Por conseguinte, o tratamento ao qual o paciente é submetido não raro é inadequado. Assim, tanto medidas preventivas quanto o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos são desejáveis para o controle da criptococose. Recentemente nosso grupo mostrou que tanto a proteína Hsp70 de *C. gattii* (genótipo VGII) quanto peptídeos dela derivados são alvos de reconhecimento por anticorpos de pacientes com criptococose. Esse achado, que abre possibilidades para o uso daquela proteína e/ou de seus peptídeos como uma ferramenta diagnóstica, também suscitou uma importante pergunta biológica: tais peptídeos são capazes de elicitar respostas de linfócitos T? No presente trabalho, investigamos essa importante pergunta. Especificamente, avaliamos se células dendríticas humanas estimuladas com peptídeos sintéticos da Hsp70 de *C. gattii* (VGII) são capazes de induzir proliferação de células T autólogas, e se tais linfócitos possuem fenótipo de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>alto</sup> Foxp3<sup>+</sup>). Para tanto, avaliamos a resposta proliferativa de células T (marcadas com CFSE) direcionadas às células dendríticas autólogas previamente pulsadas com os peptídeos sintéticos (H18, H21, H26 e *pool*) da Hsp70 de *C. gattii*. Nossos resultados indicam que os peptídeos H18 e H21, isoladamente ou em *pool*, induzem proliferação de células T autólogas e ativam predominantemente linfócitos T que não expressam o fator de transcrição Foxp3. Os resultados apresentados neste estudo reforçam nossos achados prévios proporcionando o desenvolvimento de novas pesquisas utilizando esses peptídeos como antígenos promissores em imunodiagnóstico e/ou imunoterapia para a criptococose.

**Palavras-Chave:** Criptococose, células dendríticas, peptídeos sintéticos, Hsp70, *Cryptococcus gattii*, linfócitos T.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis of significant morbidity and mortality characterized by disorders of the respiratory tract and meningoencephalitis. Diagnostic up one million new cases of the disease each year, 60% of which will die, despite antifungal therapies currently employed. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are the etiological agents of the cryptococcosis, the second received notoriety in recent decades to cause outbreaks of the disease in regions previously not endemic. The symptoms of cryptococcosis are confused with others common lung diseases and is usually misdiagnosed. Therefore, the treatment to which the patient is subjected becomes inadequate. Thus, both preventative measures and the development of more accurate diagnostic methods are desirable for control of cryptococcosis. Recently our group showed that both Hsp70 protein *C. gattii* (genotype VGII) as peptides derived there from are recognized targets for cryptococcosis in patients with antibodies. This finding, which opens possibilities for use of that protein and/or its peptides as a diagnostic tool also elicited significant biological question, such peptides are able to elicit responses of T lymphocytes? In this paper, we investigate this important question. Specifically, we assessed whether human dendritic cells stimulated with the synthetic peptides of the Hsp70 *C. gattii* (VGII) are able to induce proliferation of autologous T cells, and lymphocytes such phenotype have regulatory T cells (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup>). Therefore, we evaluated the proliferative response of T cells (CFSE labeled) directed to autologous dendritic cells previously pulsed with synthetic peptides (H18, H21, H26 and pool) of Hsp70 *C. gattii*. Our results showed that the H18 and H21 peptides, alone or in pool, induces proliferation of autologous T cells and active predominantly T-lymphocytes that do not express the transcription factor Foxp3. The results of this study reinforce our previous findings encouraging the development of new researches using these peptides as promising antigens for immunodiagnostic and/or immunotherapy to cryptococcosis.

**Keywords:** Cryptococcosis, dendritic cells, synthetic peptides, Hsp70, *Cryptococcus gattii*, T-lymphocytes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de Literatura

- Figura 1.** Ciclo reprodutivo de *Cryptococcus gattii*. A reprodução sexual ocorre pela fusão de duas células de *mating type* opostos, MAT $\alpha$  e MAT $\alpha$ . .....8
- Figura 2.** Evolução Biológica de *C. neoformans* e *C. gattii* .....10

### Procedimentos Experimentais

- Figura 3.** Delineamento do protocolo experimental. Células dendríticas (DC) imaturas (iDC) e maduras (mDC) diferenciadas a partir de monócitos de voluntários saudáveis foram estimuladas com peptídeos sintéticos derivados da Hsp70 de *C. gattii* (VGII).....22

### Resultados e Discussão

- Figura 4.** Imunofenotipagem das células dendríticas por citometria de fluxo. (A) Células dendríticas CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> derivadas de monócitos; (B) Células dendríticas com fenótipos maduro e imaturo.....32
- Figura 5.** Cultivo de células dendríticas a partir de monócitos purificados. (A) Monócitos purificados por separação negativa (B) Grupos de Monócitos iniciando sua diferenciação em células dendríticas imaturas (iDC); (C) Células dendríticas imaturas diferenciadas e (D) Células dendríticas iniciando sua maturação após tratamento com LPS.....33
- Figura 6.** Proliferação de linfócitos T autólogos induzida por células dendríticas derivadas de monócitos em diferentes estádios de maturação.....35
- Figura 7.** Proliferação de células T autólogas para iDC e mDC pulsadas com diferentes peptídeos sintéticos da Hsp70 de *C. gattii* (VGII).....36

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

|        |  |
|--------|--|
| AIDS   | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida                     |
| APC    | Célula Apresentadora de Antígeno                           |
| APC    | Fluorocromo Aloficocianina                                 |
| BHE    | Barreira Hematoencefálica                                  |
| CD     | Grupo de Diferenciação                                     |
| CFSE   | Diacetato de Carboxifluoresceína Succinimidila Ester       |
| CNA    | Gene codante para Calcineurina A                           |
| DC     | Célula Dendrítica  |
| DMSO   | Dimetilsulfóxido   |
| DPOC   | Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica                         |
| EUA    | Estados Unidos da América                                  |
| FCS    | Dispersão Frontal  |
| FITC   | Isotiocianato de Fluoresceína                              |
| FoxP3  | fator de transcrição específico para linfócito T regulador |
| GalXM  | Galactoxilomanana  |
| GM-CSF | Fator estimulante de colônia de Granulócitos e macrófagos  |
| GXM    | Glucoronoxilomanana  |
| HIV    | Vírus da Imunodeficiência Humana                           |
| HLA-DR | Antígeno Leucocitário Humano DR                            |
| Hsp    | Proteína de Choque Térmico                                 |
| iDC    | Célula Dendrítica Imatura                                  |
| IFN    | Interferon   |
| IL     | Interleucina   |
| LAC    | Lacase   |
| LALN   | Linfonodos associados ao pulmão                            |

|              |  |
|--------------|--|
| LPS          | Lipopolissacarídeo                         |
| MAT          | <i>Mating</i>                              |
| mDC          | Célula Dendrítica Madura                   |
| MHC          | Complexo principal de histocompatibilidade |
| MFI          | Mediana de Intensidade de Fluorescência    |
| MLR          | Reação Linfocitária Mista                  |
| MLST         | Tipagem de sequências Multilocus           |
| MP           | Manoproteínas                              |
| PBMC         | Células Mononucleares de Sangue Periférico |
| PBS          | Solução Salina Tamponada por Fosfato       |
| PE           | Ficoeritrina                               |
| PerCP        | Proteína Clorofila Pirimidina              |
| PHA          | Fitoemaglutinina                           |
| RPMI         | Meio de Cultura Celular                    |
| RPM          | Rotações por Minuto                        |
| SI           | Índice de Proliferação                     |
| SNC          | Sistema Nervoso Central                    |
| SUS          | Sistema Único de Saúde                     |
| TGF- $\beta$ | Fator de crescimento transformador beta    |
| Th           | Linfócito T auxiliar                       |
| TNF $\alpha$ | Fator de Necrose Tumoral alfa              |
| TLR          | Receptor Tipo <i>Toll</i>                  |
| Treg         | Linfócito T regulador                      |
| UFRGS        | Universidade Federal do Rio Grande do Sul  |

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | INTRODUÇÃO.....  | 1  |
| 2     | OBJETIVOS.....   | 4  |
| 2.1   | Geral.....   | 4  |
| 2.2   | Específicos.....   | 4  |
| 3     | REVISÃO LITERÁRIA.....   | 5  |
| 3.1   | Criptococose.....  | 5  |
| 3.2   | Epidemiologia.....   | 6  |
| 3.3   | Os Agentes Etiológicos.....  | 7  |
| 3.4   | Imunopatogênese.....   | 10 |
| 3.5   | Fatores Relacionados à Virulência.....   | 12 |
| 3.5.1 | <i>Mating Type</i> .....   | 12 |
| 3.5.2 | Produção de Melanina.....  | 13 |
| 3.5.3 | Síntese de Enzimas.....  | 13 |
| 3.5.4 | Presença da Cápsula Polissacarídica.....   | 15 |
| 3.5.5 | Fungos Termotolerantes a 37°C.....   | 16 |
| 3.6   | Resposta Imune.....  | 16 |
| 3.7   | Células Dendríticas.....   | 18 |
| 3.8   | Proteína de choque térmico (Hsp) – Hsp70.....  | 20 |
| 4     | PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....   | 23 |
| 4.1   | Delineamento do Estudo.....  | 23 |
| 4.2   | Obtenção de células mononucleares periféricas do sangue de indivíduos sadios.....            | 24 |
| 4.3   | Purificação de Monócitos.....  | 24 |
| 4.4   | Purificação e Congelamento de linfócitos T.....  | 25 |
| 4.5   | Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos purificados.....                  | 26 |
| 4.6   | Síntese dos Peptídeos.....   | 27 |
| 4.7   | Pulso de DCs com Peptídeos Sintéticos Derivados da Hsp70 de <i>Cryptococcus gattii</i> ..... | 28 |
| 4.8   | Reatividade de Linfócitos T frente às DCs.....   | 28 |
| 4.8.1 | Descongelamento dos Linfócitos T e Marcação com CFSE.....                                    | 29 |
| 4.8.2 | Preparo das DCs pulsadas com antígenos de Hsp70 para cocultura com Linfócitos T.....         | 30 |

|  |    |
|--|----|
| 4.8.3 Cocultura de DCs e Linfócitos T .....  | 30 |
| 4.9 Avaliação da Proliferação dos Linfócitos T frente às Células Dendríticas, por Citometria de Fluxo .....                    | 30 |
| 4.10 Análise Estatística .....   | 31 |
| 4.11 Questões Éticas .....   | 32 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 33 |
| 5.1 Imunofenotipagem das Células Dendríticas derivadas de Monócitos.....   | 33 |
| 5.2 Caracterização Funcional das Células Dendríticas: DCs imaturas são estimuladores menos eficientes de aloproliferação ..... | 35 |
| 5.3 Peptídeos derivados da Proteína Hsp70 de <i>Cryptococcus gattii</i> induzem reatividade das células T autólogas .....      | 36 |
| 6. CONCLUSÕES .....  | 40 |
| REFERÊNCIAS .....  | 41 |
| ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....   | 55 |

## 1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica de significativa morbiletalidade que afeta animais e humanos podendo causar, nestes, principalmente afecções do trato respiratório e do sistema nervoso central (SPRINGER; CHATURVEDI, 2010; DEL POETA; CASADEVALL, 2012). Os fungos encapsulados *Cryptococcus neoformans* (genótipo VNI-VNIV, VNB) e *Cryptococcus gattii* (genótipo VGI-VGIV) são os agentes etiológicos predominantes da doença (KURTZMAN et al., 2010).

Estas espécies se distinguem em relação ao habitat, distribuição geográfica e manifestações clínicas (SPEED; DUNT, 1995; LIN; HEITMAN, 2006; NGAMSKULRUNGROJ, 2012). *C. neoformans* tem distribuição mundial e afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos. Enquanto, *C. gattii* possui distribuição localizada em regiões tropicais e subtropicais, comportando-se como patógeno primário, capaz de infectar, sobretudo indivíduos sem qualquer evidência de imunodepressão. *C. gattii* ganhou destaque ao causar o surto de criptococose na Ilha de Vancouver no Canadá e se difundir para o Noroeste dos Estados Unidos da América (EUA) (KIDD et al., 2004; DATTA et al., 2009; GALANIS et al., 2010; HEITMAN et al., 2010). Este surto evidenciou a adaptação de *C. gattii* a regiões antes não referidas como endêmicas, expandindo-se rapidamente pelos diferentes continentes, sobretudo nos trópicos (OKAMOTO et al., 2010; CARRICONDE et al., 2011).

Por não ser uma doença de notificação obrigatória, no Brasil a estimativa real sobre sua incidência é limitada. Sabe-se que *C. neoformans* predomina nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país. Enquanto, *C. gattii* é endêmico nas regiões Norte e Nordeste. Estudos clínico-epidemiológicos mostram a importância da criptococose por *C. gattii* em crianças e adultos jovens no Norte e Nordeste brasileiro (sobretudo o genótipo VGII), representando um terço dos pacientes internados com meningite, com letalidade oscilando entre 35 a 50%. (CAVALCANTI 1998; SANTOS et al., 2008; MARTINS. et al., 2011)

O contágio ocorre por meio da inalação de propágulos das espécies fúngicas supracitadas que se instalam nos pulmões e podem evoluir para a doença, dependendo de fatores como a inter-relação com o ambiente, a resposta imune do hospedeiro e a



patogenicidade do fungo. Os mecanismos de resistência ou tolerância à doença se dão pela interação entre a resposta imune do hospedeiro e os fatores de virulência do patógeno (WOZNIAK; OLSZEWSKI; WORMLEY Jr, 2015). O hospedeiro se torna suscetível à criptococose quando as células da imunidade inata, como macrófagos (GOLDMAN et al., 2001), não conseguem conter os patógenos e quando ocorrem falhas nas respostas de células T.

Além dos macrófagos, outras células (e moléculas) são requeridas na defesa do hospedeiro, dentre elas as células dendríticas (DC, do inglês *dendritic cell*). DC exercem um papel expressivo na resposta imune, por funcionar como um elo entre a imunidade inata e adaptativa, capturando e processando antígenos e apresentando peptídeos desses para os linfócitos T (STEINMAN; SWANSON J. 1995; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). A captura e processamento antigênico, que é feito pela DC imaturas (iDC), deflagram nas mesmas vias de sinalização que culminam na sua maturação (mDC). A maturação das DCs é condição necessária para a eficiente apresentação antigênica e ativação de linfócitos T. A apresentação de antígenos por iDC, pode levar á anergia ou tolerância imunológica do antígeno por parte dos linfócitos T.

Segundo Huston et al. (2013) *C. gattii* possui a habilidade de interferir na maturação das DC e se evadir da resposta imune adaptativa protetora. Recentemente, foi sugerido que a infecção por *C. gattii* restringe a resposta das células Th (células T auxiliares, do inglês, *helper*) Th1/Th17 mediada por DC, por limitar a função das DCs e regular negativamente a expressão de quimiocinas pulmonares essenciais na diferenciação das células Th1. Assim, o indivíduo imunocompetente fica impossibilitado de montar uma linha de defesa imunológica efetora contra o fungo (ANGKASEKWINAI et al., 2014).

*C. neoformans* e *C. gattii* expressam uma diversidade de fatores que determinam sua patogenicidade, permitindo a disseminação nos tecidos e modulando o sistema imune do hospedeiro (SABIITI; MAY, 2012). Um de tais fatores é a proteína de choque térmico de 70 KDa (Hsp, do inglês, *Heat shock proteins*). As Hsps são chaperonas intracelulares imunodominantes em condições de estresse que se mantiveram evolutivamente conservadas entre os eucariontes e procariontes (LINDQUIST; CRAIG, 1988; ELLIS; 1990; FEDER; HOFMANN, 1999). Apesar da conservação evolutiva as

Hsps apresentam trechos variáveis, característicos de táxons distintos que podem ser alvos de reconhecimento imune (TOBIAN et al., 2004). Além disso, estudos sugerem que Hsps podem elicitar respostas imunológicas de auto-reatividade (RONQUIST 2006; GULDEN et al., 2008). O fato é que as Hsps são moléculas imunodominantes em condições de estresse e uma quantidade substancial de resposta imune a microorganismos patogênicos é dirigida a peptídeos derivados dessas proteínas (BRANDÃO et al., 2014). Um Estudo recente demonstrou que a Hsp70, homóloga a do *Cryptococcus*, limita o controle da expansão pulmonar de *C. neoformans*, restringindo diretamente a resposta imune inata, por meio da polarização de macrófagos M2 (EASTMAN et al., 2015).

Em trabalhos recentes nosso grupo mostrou que indivíduos imunocompetentes com criptococose apresentam resposta imune humoral dirigida tanto à Hsp70 de *C. gattii* (VGII), quanto a peptídeos sintéticos dela derivados (MARTINS et al., 2013; BRANDÃO et al., 2014). Esses resultados são promissores e nos instigam a investigar se a Hsp70 de *C. gattii* é capaz de induzir também uma resposta imune celular. Além disso, a avaliação da resposta de linfócitos T dirigida às células dendríticas pulsadas com peptídeos sintéticos derivados da Hsp70 de *C. gattii* (VGII), abre caminho para o entendimento da resposta imune ao patógeno e no desenvolvimento de estratégias diagnósticas e protetoras para criptococose.

Estudos como este são essenciais, principalmente em países como o Brasil, onde a criptococose não é de notificação compulsória e que possui o agravante de ser frequentemente confundida com outras patologias do sistema respiratório. Estes dois fatos concorrem para o subdiagnóstico e para o diagnóstico tardio da criptococose no Brasil. Por conseguinte, tanto o paciente quanto o Sistema Único de Saúde (SUS) são prejudicados: (i) o paciente porque enfrenta longo tempo de internação com resultados inadequados (ii) o SUS porque investe em tratamentos inadequados, por serem normalmente terapias para outras doenças pulmonares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Analisar, *in vitro*, a proliferação de linfócitos T humanos autólogos frente a células dendríticas pulsadas com peptídeos sintéticos derivados da Hsp70 de *Cryptococcus gattii* (VGII).

### 2.2 Específicos

- Caracterizar imunofenotipicamente e funcionalmente células dendríticas imaturas e maduras derivadas de monócitos CD14<sup>+</sup> de voluntários saudáveis;
- Determinar os índices de proliferação de linfócitos T cultivados com células dendríticas em diferentes estágios de maturação previamente pulsadas com peptídeos sintéticos derivados da Hsp70 de *C. gattii*;
- Determinar se os linfócitos T proliferados expressam o fator de transcrição Foxp3, tido como marcados de linfócito T regulador.

### 3 REVISÃO LITERÁRIA

#### 3.1 Criptococose

Criptococose é uma importante micose sistêmica, causada predominantemente pelas espécies fúngicas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que acomete humanos e animais. A doença pode afetar o trato respiratório podendo se disseminar para o sistema nervoso central (SNC), comportando-se como uma das infecções fúngicas de significativa morbiletalidade. Estima-se o diagnóstico anual de um milhão de casos novos e uma taxa de mortalidade em torno de 60%, apesar das terapias antifúngicas atualmente vigentes (PARK et al., 2009; SPRINGER; CHATURVEDI, 2010; DEL POETA; CASADEVALL, 2012).

*C. neoformans* tem distribuição mundial, caracterizando-se como importante causa de morbiletalidade em indivíduos imunocomprometidos, tais como (i) portadores da infecção avançada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV/AIDS) (ii) tratados com corticóide (iii) neoplasias e (iv) que apresentam desordens linfoproliferativas ou foram transplantados. Em contraste, infecções por *C. gattii* prevalecem em regiões de clima tropical e subtropical acometendo, predominantemente, indivíduos sem qualquer evidência de imunodepressão, comportando-se como patógeno primário (KWON-CHUNG; VARMA, 2006; MORGAN et al., 2006). Não obstante, *C. gattii* tem emergido em países de clima temperado, como no Canadá, na ilha de Vancouver na Columbia Britânica e Noroeste dos EUA (KIDD et al., 2004; SPRINGER; CHATURVEDI, 2010). A criptococose tem sido estudada, principalmente, em aborígenes da Austrália e Nova Guiné, mas ocorre também em países da África Central, sudeste da Ásia, México, Colômbia, Estados Unidos (Califórnia) e Brasil. *C. gattii* é endêmico na Austrália e na Nova Guiné, onde a criptococose é relatada, sobretudo, em aborígenes (CHEN et al., 2000).

O trato respiratório é a porta de entrada para o fungo por meio da inalação de propágulos infectantes ou leveduras dessecadas. Observa-se, primeiramente, um quadro pulmonar comumente regressivo caracterizando a fase primária da infecção. Dessa fase, a infecção pode se disseminar para outros órgãos por via hematogênica, apresentando

elevado tropismo para Sistema Nervoso Central (SNC), causando meningoencefalite criptocócica associada à elevada taxa de letalidade (CALVO et al., 2001; BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006).

### 3.2 Epidemiologia

Com o aparecimento do HIV/AIDS, a criptococose por *C. neoformans* se tornou uma das principais doenças oportunistas (DROMER et al., 2004). Entre 1980 a 2002, 6% das infecções oportunistas em pacientes HIV soropositivos foram causadas por aquele fungo. Estima-se que 5% a 13% dos pacientes HIV/AIDS desenvolvam a doença. No Brasil a taxa de letalidade é alta, de 45% a 65% em casos de meningite, associada ou não ao HIV/AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2010). Além disso, *C. neoformans* pode afetar usuários de imunossupressores, pessoas com doenças linfoproliferativas, com neoplasias, lúpus e outros distúrbios que comprometem o sistema imunológico (PERFECT; CASADEVALL, 2002; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011).

*C. gattii* tornou-se evidente em virtude do surto de criptococose no oeste do Canadá, Ilha de Vancouver, afetando tanto indivíduos aparentemente imunocompetentes quanto animais. Esta espécie, endêmica de regiões subtropicais e tropicais, adaptou-se facilmente ao clima temperado se disseminando para países antes não reconhecidos como endêmicos (KIDD et al., 2004; 2007; OKAMOTO et al., 2010).

No período de 1999 a 2003 a incidência da infecção por *C. gattii* em Vancouver foi de 37 casos por milhão de habitantes por ano. Esta incidência é significativamente maior do que aquela causada por *C. gattii* na Austrália (0,94 casos por milhão de habitantes por ano), onde *C. gattii* é endêmico (KIDD et al., 2004). Até 2010, 281 casos de infecções em humanos, por *C. gattii* foram registrados na Colúmbia Britânica, representando uma média de 23 casos por ano, demonstrando a mais alta incidência de infecção por esse patógeno já reportada. No total, 70,8% dos casos de criptococose por *C. gattii* (VGII) são residentes da Ilha de Vancouver que foram infectados pela cepa hipervirulenta R265 (BARTLETT et al., 2011).

Surtos de criptococose como o observado em Vancouver, demonstram que *C. gattii* também pode se tornar endêmico em regiões temperadas, apresentando ampla

capacidade de adaptação a outros climas. Há relatos de infecção autóctone por *C. gattii* na Europa, Ásia e Austrália, evidenciando grande expansão mundial dessa espécie fúngica (OKAMOTO et al., 2010; CARRICONDE et al., 2011).

De 2004 a 2010, aproximadamente 60 casos de infecção por *C. gattii* genótipo VGII em humanos foram registrados em quatro estados no Noroeste Pacífico dos EUA (Washington, Oregon, Califórnia e Idaho). Destes, 46 não relataram viagem para Colúmbia Britânica ou outras áreas endêmicas para o fungo, sugerindo que a infecção ocorreu no local onde residem. O potencial de dispersão de linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* capazes de infectar indivíduos imunocompetentes é motivo de preocupação, e *C. gattii* é reconhecido como um patógeno emergente na América do Norte (BYRNES et al., 2010; BYRNES; MARR, 2011).

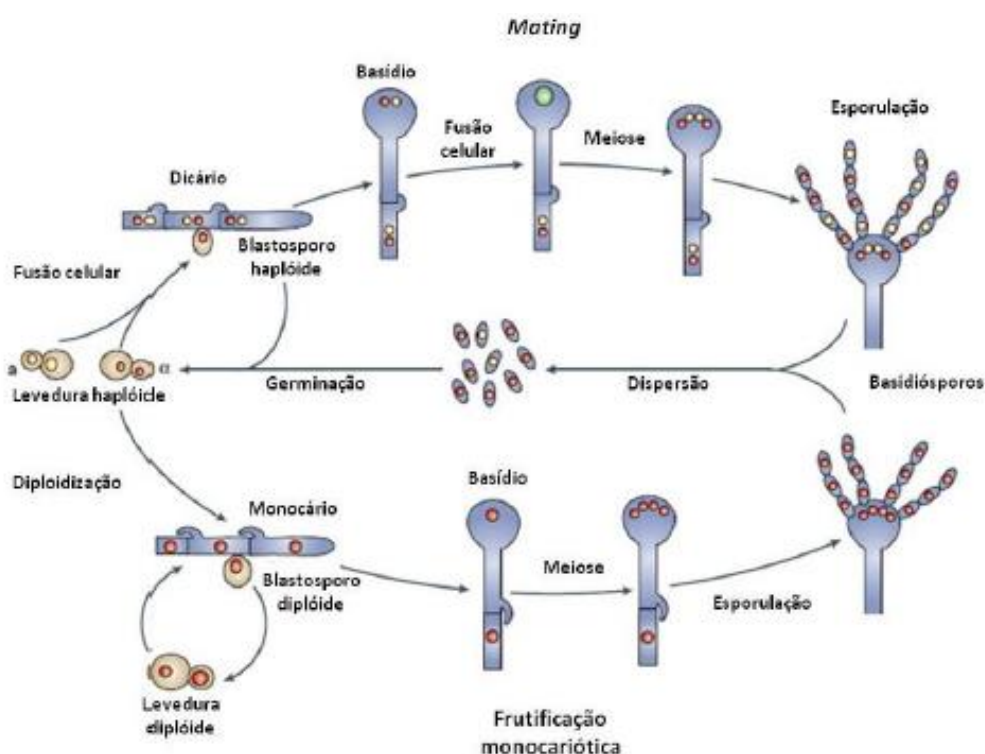
No Brasil, a criptococose não é de notificação compulsória, o que mascara a verdadeira estimativa sobre sua incidência e prevalência. *C. neoformans* prevalece nas regiões Sudeste, Centro-oeste e Sul. Enquanto, *C. gattii* é endêmico no Norte e Nordeste. Estudos clínico-epidemiológicos mostram a importância da criptococose endêmica por *C. gattii* em crianças e adultos jovens no Norte e Nordeste brasileiro, representando um terço dos casos internados, com letalidade oscilando entre 35 a 50%. (SANTOS et al., 2008; MARTINS et al., 2011). Relatos da literatura apontam uma predileção pelos agentes da criptococose por indivíduos do gênero masculino (FERNANDES et al., 2000; COLOM et al., 2001; SANTOS et al., 2008; MARTINS et al., 2011; MORA et al., 2010 e 2012).

### 3.3 Os Agentes Etiológicos

O gênero *Cryptococcus* é conhecido há cerca de um século e corresponde a 68 espécies distribuídas amplamente em habitats como solo, árvores, tocas de tatus, cavernas, materiais em decomposição e excretas de aves (HAWKSWORTH et al., 2011; HEITMAN et al., 2011; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; ENGELTHALER et al., 2014). *C. neoformans* e *C. gattii* são consideradas leveduras não fermentadoras, assimiladoras de inositol, produtoras de urease e reativas ao azul de diazônico B. Atualmente *C. neoformans* e *C. gattii* são as únicas espécies patogênicas do gênero, entretanto, já foi reportado que *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. curvatus* possa ocasionar a infecção em humanos (PFALLER et al., 2009).

Na fase anamorfa ou assexuada são leveduras haplóides, globosas ou ovaladas, com diâmetro de 2-8  $\mu\text{m}$ , possuem uma cápsula espessa e reproduzem-se por brotamento único ou múltiplo (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; LIN, 2009). A fase sexuada ou teleomorfa, observada somente em laboratório, ocorre por *mating type* (fusão de tipos sexuais opostos – MAT $\alpha$  e MAT $a$ ). Há o surgimento de hifas dicarióticas, caracterizando esta fase sexual. Com a união dos núcleos seguidos de divisões meióticas surge o basídio na ponta da hifa. Os quatro núcleos oriundos da meiose permanecem no basídio. Enquanto isso, mitoses sucessivas dão origem a quatro cadeias com cerca de 40 basidiósporos com *mating type* distintos, que serão dispersos no meio (FRASER et al., 2003; IDNURM et al., 2005).

Fraser et al. (2005) demonstraram que tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* se reproduzem por frutificação monocariótica, na ausência de um tipo sexual oposto, produzindo basidiósporos de mesmo *mating type*. A descoberta da reprodução sexuada (Figura 1), além de ratificar um novo ciclo de vida, também, foi um progresso no entendimento da virulência e filogenia das espécies do referido gênero (LIN, 2009).

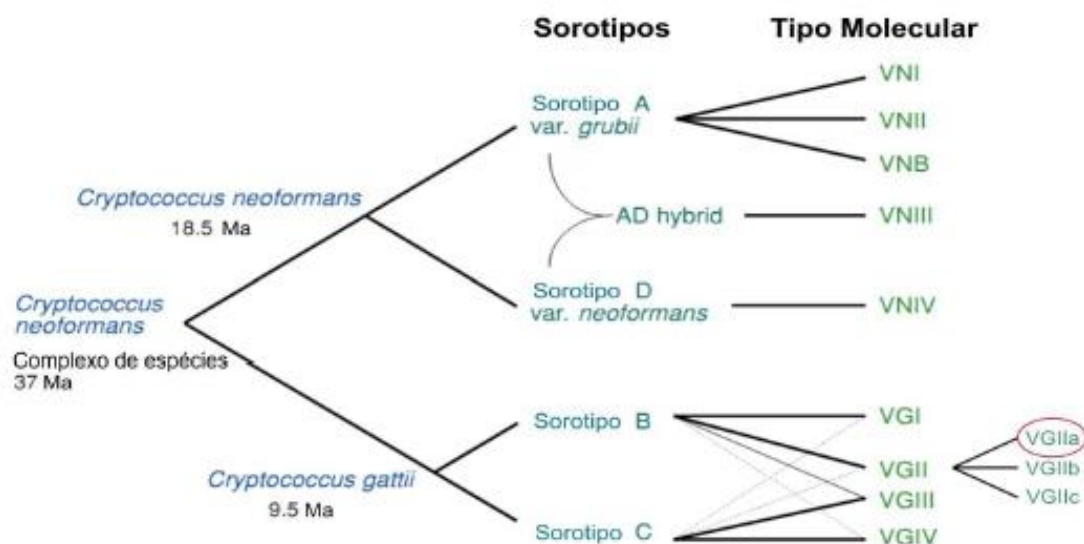


**Figura 1. Ciclo reprodutivo de *Cryptococcus*.** A reprodução sexual ocorre pela fusão de duas células de *mating type* opostos, MAT $\alpha$  e MAT $a$ . Forma-se uma hifa dicariótica após a fusão, que se sofre

divisão meiótica, resultando em basidiósporos com ambos *mating type*. Na frutificação monocariótica, células de mating type iguais sofrem diploidização, procedendo numa hifa monocariótica diplóide. Em seguida, passa por meiose, derivando em basidiósporos de mesmo mating type. Ciclos reprodutivos que liberam basidiósporos para o meio, estes, em circunstâncias ambientais satisfatórias, germinarão, originando as leveduras. (IDNURM et al., 2005).

Não obstante, no passado o agente etiológico da criptococose fosse considerado uma espécie anamórfica homogênea (*C. neoformans*), hoje as duas espécies, *C. neoformans* (sorotipos A, D, e híbrido AD) e *C. gattii* (sorotipos B e C), por diferirem genotipicamente, fenotipicamente, em epidemiologia, bem como na sua distribuição geográfica e ecologia foram separadas (PERFECT; CASADEVALL 2002 e 2010; LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; KWON CHUNG & VARMA 2006). Estudos filogenéticos, empregando a técnica de *multilocus Sequence Typing* (MLST) dividiram as duas espécies em nove genótipos distintos: *C. neoformans var. grubii* em VNI, VNII e VNB; VNIII a um tipo híbrido sorotipo AD e VNIV a *C. neoformans var. neoformans* (sorotipo D); e os tipos moleculares VGI, VGII, VGIII e VGIV correspondem a *C. gattii* (BOVERS et al., 2008; MEYER et al., 2009).

O genótipo VGII foi subdividido em VGIIa, VGIIb e VGIIc (Figura 2) (KIDD et al., 2004; D`SOUZA et al., 2011). Os tipos moleculares VNI e VNII de *C. neoformans* apresentam distribuição global, e são responsáveis por 95% das infecções criptocócicas mundial e 98% em pacientes HIV/AIDS. O genótipo VGIIa foi essencialmente isolado em pacientes e fontes ambientais do surto em Vancouver em 1999 e na Costa Oeste do Pacífico, denotando sua adaptação em regiões temperadas (KIDD et al., 2004).





**Figura 2. Evolução Biológica de *C. neoformans* e *C. gattii*.** Fungos patogênicos que divergiram de um mesmo ancestral há mais de 37 e 18.5 milhões de anos, respectivamente. Duas espécies que se dividem em cinco sorotipos e nove tipos moleculares (Figura adaptada de LIN; HEITMAN, 2006).

Estudos clínico-epidemiológicos realizados no Brasil apontaram que, do mesmo modo que na América Latina, há elevada incidência do tipo molecular VGII nas regiões Norte e Nordeste. O subgrupo VGIIa tem apresentado alta diversidade genética, sendo isolado de casos clínicos e fontes ambientais distintas (PAPPALARDO; MELHEM, 2003; IGREJA et al., 2004; TRILLES et al., 2008 e 2011).

### 3.4 Imunopatogênese

A Criptococose tem início quando o hospedeiro entra em contato com as leveduras desidratadas do ambiente ou por meio da inalação de propágulos infecciosos. A levedura *C. neoformans* e *C. gattii* é um patógeno intracelular que interage com o sistema imunológico humano, sendo capaz de instituir a infecção. As partículas infecciosas se instalam nos alvéolos pulmonares do hospedeiro, mas podem se disseminar para órgãos, como: pele, rins, próstata, ossos e SNC (VELAGAPUDI et al., 2009; SABIITI; MAY, 2012; KROCKENBERGER et al., 2010). Quando há a contaminação, a patogênese é delimitada por três fatores basilares: o status imunológico do hospedeiro, a virulência da cepa e a dimensão do inóculo. Na criptococose o que determinará a resistência ou suscetibilidade da doença são as interações entre a resposta imune do hospedeiro e os fatores de virulência do patógeno (WOZNIAK; OLSZEWSKI; WORMLEY, 2015). O conhecimento sobre a manifestação clínica da doença baseado na relevância individual desses fatores ainda não foi esclarecido, porém, em conjunto, os referidos fatores definirão a apresentação final da criptococose (PERFECT; CASADEVALL, 2010; BRATTON et al., 2013).

Nos alvéolos pulmonares, as leveduras entram em contato com os macrófagos locais e células dendríticas, sendo fagocitadas. Há também, o recrutamento de outras células inflamatórias com a produção de citocinas ou quimiocinas, incidindo na etapa inicial para que seja deflagrada a resposta Th1. Então, uma das três vias pode ocorrer: (i) em indivíduos com sistema imune deprimido ocorre propagação da levedura o que leva a doença pulmonar diferenciada por nódulos pulmonares e/ou inflamação, que se alastra com maior frequência para o SNC; (ii) a infecção pode não se desenvolver com a

completa supressão do patógeno frente a uma resposta imune eficaz ou; (iii) doença assintomática, ficando o fungo latente nos linfonodos pulmonares, ativando a infecção quando há depleção do sistema imune (MORETTI et al., 2008; KRONSTAD et al., 2011; SABIITI; MAY, 2012).

Os macrófagos alveolares constituem a primeira defesa contra o patógeno (GOLDMAN et al., 2001). O processo de fagocitose forma os granulomas (criptococomas), que contém células fúngicas. A formação dos granulomas é importante para suprimir a disseminação extrapulmonar, culminando em uma resposta às células Th1, com produção de citocinas como, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e interleucina-2 (IL-2) (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014). No entanto os mesmos macrófagos também contribuem para a propagação da infecção, como mostrado para a disseminação de leveduras para o cérebro de ratos, pelos mesmos autores acima citados.

O fungo pode transpor a barreira hematoencefálica (BHE) e se difundir no SNC resultando na meningoencefalite, manifestação crítica e muito comum em criptococose. O neurotropismo é motivo de inúmeras especulações. Há três hipóteses que tentam elucidar o mecanismo usado por *C. neoformans* e *C. gattii* para atravessar a BHE: a transcitose, o mecanismo “Cavalo de Tróia” e a transferência paracelular (CHANG et al., 2004; CHARLIER et al., 2009; CASADEVALL, 2010). Na hipótese do mecanismo “Cavalo de Tróia”, muito estudada, a levedura é transportada por células fagocíticas e assim, o fungo cruza a BHE no interior dos fagossomos sem haver exposição ao sistema imune (KRONSTAD et al., 2011; TSENG et al., 2015).

O mecanismo usado pelo *C. gattii* utiliza para se evadir da resposta imune e se difundir para o SNC ainda não está claro (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012). Porém, é possível que a síntese de melanina, por meio da enzima lacase, no cérebro contribua para o processo. Sabe-se que existe L-DOPA e dopamina em níveis elevados no cérebro e que essas moléculas se ligam a uma enzima chamada lacase para sintetizar a melanina, proteína fundamental para a sobrevivência do fungo. Achado este, que tem contribuído para sustentar a propensão de *C. neoformans* infectar o sistema nervoso central (HOGAN, KLEIN; LEVITZ, 1996).

Diante da significância da criptococose, a imunidade celular é uma via de defesa do hospedeiro fundamental na erradicação do fungo. No entanto, alguns fatores como, o tipo de célula ativada, o grau de ativação no hospedeiro e a concentração de células no sítio da infecção, estão associados à eficácia da resposta imune. Um estudo com indivíduos HIV/AIDS ratifica o risco aumentado da infecção quando há elevada depleção de linfócitos T CD4 (PONGSAI; ATAMASIRIKUL; SUNGKANUPARPH, 2010).

### 3.5 Fatores Relacionados à Virulência

*C. neoformans* e *C. gattii*, no decorrer de sua história evolutiva, desenvolveram distintas estratégias para assegurar a sua sobrevivência e replicação no hospedeiro. Dentre tais estratégias figura a habilidade de modulação da resposta imune. Ambos os fungos são capazes de expressar fatores que permitem a disseminação nos tecidos, além de fontes nutricionais e maquinaria que permite a fuga e agressão ao sistema imune do hospedeiro, determinando assim, sua patogenicidade (SABIITI; MAY, 2012). Alguns dos principais determinantes de virulência são: reprodução por *mating type*, produção de melanina, síntese de enzimas, cápsula polissacarídica e a termotolerância a 37° C (LI; MODY, 2010).

#### 3.5.1 *Mating Type*

O *mating type* (MAT) se distingue por um locus com dois alelos alternativos, o MAT $\alpha$  e o MAT $\beta$ , e ambos os patógenos *C. neoformans* e *C. gattii* o possuem. A reprodução sexuada desses fungos se dá pelo cruzamento entre isolados com tipos opostos. Estudos utilizando técnicas de Biologia Molecular concluíram que MAT $\alpha$  tem aproximadamente 120 kb e MAT $\beta$  cerca de 100 kb de tamanho, ambos contem cerca de 20 genes (KAROS et al., 2000; LENGELER et al., 2002; MCCLELLAND et al., 2004). Soma-se a isso, o predomínio de cepas do tipo  $\alpha$  no ambiente (FRASER *et al.*, 2003) sendo essas também, mais virulentas quando comparadas ao MAT $\beta$  (BARCHIESE et al., 2005; NIELSEN et al., 2005).

Apesar das pesquisas sobre o locus *Mating*, que permitiu maior compreensão da epidemiologia desses fungos, identificando a predominância do tipo  $\alpha$ , e sua relação com a virulência dos mesmos, há muito a ser estudado, em especial, o modo como os

genes do referido locus desempenha sua função essencialmente (CHATURVEDI et al., 2002).

### **3.5.2 Produção de Melanina**

As melaninas são macromoléculas hidrofóbicas de elevado peso molecular, que apresentam tonalidade preta ou marrom, e resultam da polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos. É sintetizada pela ação da enzima lacase, codificada por dois genes: LAC1 e LAC2 (WILLIAMSON; WAKAMATSU; ITO, 1998). Como a síntese de melanina está associada à virulência de muitos microorganismos patogênicos, são bastante estudadas (GARCIA- RIVERA; CASADEVALL, 2001; PRATES et al., 2013).

Por apresentar propriedades antioxidantes, acredita-se que a melanina protege o fungo da morte oxidativa por fagócitos durante a infecção (SABIITI; MAY, 2012). Outras funções protetivas da melanina já reportadas são: integridade da parede celular, interferência com a resposta imune celular e fagocitose mediada por anticorpos, além de conferir proteção celular a mudanças críticas de temperatura e antifúngicos (PERFECT, 2010). Células melanizadas mostraram-se resistentes a fármacos oxidantes e antifúngicos como Anfotericina B e Caspofungina (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002; SABIITI; MAY, 2012).

Uma vertente que elucida ao menos em parte o neurotropismo de *C. neoformans* e *C. gattii* pelo SNC é a capacidade de conversão das catecolaminas norepinefrina e dopamina para síntese de melanina. Essa hipótese é amparada pelo fato de que regiões cerebrais ricas nesses neurotransmissores têm maior propensão à infecção durante a meningoencefalite criptocócica (CASADEVALL et al., 2000; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). É importante frisar que o gene codante de lacase, LAC1, apresenta diversidade quando se compara *C. neoformans* e *C. gattii*. Se essa variedade tem ligação com a virulência de *C. gattii* ainda precisa ser elucidado (TANAKA et al., 2005).

### **3.5.3 Síntese de Enzimas**

Uma variedade de enzimas produzidas por *C. neoformans* e *C. gattii*, e que contribuem para suas virulências, comprometem a integridade da célula hospedeira por

degradar as membranas, o que potencializa a dispersão do fungo até o SNC (SABIITI; MAY, 2012). Dentre essas enzimas, estão as fosfolipases, que dependendo do sítio hidrolítico nas ligações éster fosfolipídicas, compõem cinco classes (A1, A2, B, C e D). As fosfolipases B e C estão associadas à virulência de *C. neoformans* e *C. gattii* (COX et al., 2001; SIAFAKAS et al., 2006). A fosfolipase B amplia a adesão às células do epitélio pulmonar, a fagocitose por macrófagos e a sobrevivência intracelular, contribuindo também, para aumentar a penetração da barreira hematoencefálica (GHANNOUM, 2000; SANTANGELO et al., 2004). As fosfolipases exercem uma ação efetiva na evasão do patógeno à resposta imune do hospedeiro, na destruição de tecido pulmonar e os protegem dos macrófagos. Noverr e colaboradores (2003) sugeriram que este último fato pode estar associado à produção de eicosanóides pelo fungo e assim, à modulação negativa da função dos macrófagos.

As proteases correspondem a uma família de enzimas com ação proteolítica, capazes de catalisar a clivagem de ligações peptídicas, digerindo proteínas a peptídeos ou aminoácidos livres. São fatores de virulência para patógenos como bactérias, protozoários e fungos, uma vez que possuem a habilidade de: (i) degradar proteínas da membrana celular do hospedeiro e (ii) inativar proteínas importantes do sistema imunológico (como proteínas do complemento). Dito de outra forma, as proteases permitem ao patógeno invadir e sobreviver em tecidos do hospedeiro (RUMAHAYNES; BROWNLEE; SORRELL, 2000; CASADEVALL; PERFECT, 2011). Juntas, proteases e fosfolipases lesam a membrana fagossomal dos macrófagos, permitindo que *C. neoformans* resista à morte pelas enzimas fagocíticas, além de promover a replicação dos mesmos quando fagocitados pelos macrófagos (TUCKER; CASADEVALL, 2002).

As ureases também contribuem para virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*. Estas são metaloproteínas que catalisam a hidrólise de uréia em amônia e carbamato, o que aumenta tanto a disponibilidade de nitrogênio quanto o pH do meio. Acredita-se que a urease criptocócica é requerida durante a difusão de *C. neoformans* no SNC, e que promova a captação microvascular da levedura para o cérebro (OLSZEWSKI et al., 2004). Em modelo murino, Osterholzer et al. (2009) mostraram que cepa de *C. neoformans* deficiente em urease apresenta menos DCs imaturas no LALN (do inglês, *lung-associated lymph nodes*) quando comparado a cepa do tipo selvagem,

corroborando a hipótese de que a urease contribui para indução do desenvolvimento da imunidade não-protetora por interferir na maturação das DCs na criptococose pulmonar por *C. neoformans*.

#### 3.5.4 Presença da Cápsula Polissacarídica

A cápsula polissacarídica que recobre os microorganismos possui importância efetiva para a sobrevivência destes. Além de apresentar outras funções, a cápsula fornece proteção ao interagir com o meio e resistir às diversas condições hostis a célula, como a desidratação. Um fato interessante quando relacionamos todas as micoses sistêmicas com *C. neoformans* e *C. gattii* é a distinta morfologia da cápsula, sendo particular nesses fungos (RODRIGUES; CASADEVALL; ZARAGOZA, 2011). Em *C. neoformans* e *C. gattii* a cápsula é uma estrutura extracelular composta por dois polissacarídeos: cerca de 90% de glucoronoxilomanana (GXM); galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (MP), que se ligam a glicanos ricos em manose (ZARAGOZA et al., 2005, 2009; DE JESUS et al., 2010; GARCÍA-RODAS et al., 2014).

A síntese da cápsula em *C. neoformans* e *C. gattii* é tida como o fator predominante de virulência, pois atribui aos patógenos propriedades anti-fagocíticas, além de associar-se na regulação de resposta imune do hospedeiro (ZARAGOZA et al., 2009). No gênero *Cryptococcus*, o tamanho da cápsula é variável, sendo o habitat um dos fatores que contribui para a dimensão capsular (ZARAGOZA et al., 2005). Há evidências indicando que cepas criptocócicas pouco capsuladas ou acapsulares são menos virulentas, e linhagens com cápsulas muito espessas são altamente virulentas, sendo menos fagocitadas pelos macrófagos (ALSPAUGH; PERFECT; HEITMAN, 1998; ZARAGOZA et al., 2009). Além de proteger o fungo do estresse oxidativo quando fagocitado, a cápsula é uma barreira antifagocítica que: (a) inativa o complemento, (b) inibe produção de anticorpos, (c) altera a secreção de citocinas e apresentação de antígenos, deixando o microambiente envolto da levedura muito propício para sua dispersão (MONARI et al., 2008; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004; ZARAGOZA et al., 2008).

Não obstante, a cápsula de *C. neoformans* ainda atua negativamente nas células dendríticas, influenciando no padrão de expressão gênica e moléculas requeridas na ativação de células T. Ao inibir a maturação das DCs e expressão de receptores de

superfície, proteínas de membrana e citocinas como, IL2, IL12, IL 1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL10, TNF $\alpha$ , inativando genes críticos no processamento e apresentação antigênica, bem como no ciclo celular ou apoptose (LUPO et al., 2008; VECCHIARELLI et al., 2003; 2013).

### 3.5.5 Fungos Termotolerantes a 37°C

Quase todos os fungos nocivos aos mamíferos são termotolerantes e crescem bem no hospedeiro à temperatura de 37° C. *C. neoformans* e *C.gattii* são as únicas espécies do gênero *Cryptococcus* que se desenvolvem a 37° C. Segundo Perfect (2006) há uma multiplicidade gênica relacionada a termotolerância das referidas espécies. Em *C. neoformans* esses genes associam-se a diversos processos biológicos.

Rosa e Silva et al. (2008) avaliaram a expressão gênica diferenciada por *C. neoformans* na temperatura corpórea humana, e identificaram produtos gênicos associados à habilidade de proliferação a 37° C, um fator de virulência significativo. Da diversidade gênica regulada pela temperatura, está o gene CNA1 codante da calcineurina A indispensável na integridade celular em leveduras e resposta ao estresse (ODOM et al., 1997).

Ainda que *C. gattii* seja mais virulento e apresente a capacidade de sobreviver a 37° C, não se desenvolve bem nesta temperatura, apresentando temperatura ótima em torno de 35° C (HAMILTON e HOLDON, 1997; RIPPON, 1988). Há diferenças também entre as linhagens de *C. neoformans*, sendo o genótipo VNIV é mais sensível a temperaturas elevadas quando comparado ao genótipo VNI. Um estudo sugeriu que essa menor susceptibilidade a altas temperaturas pode estar relacionada à maior prevalência de isolados de *C. neoformans* (VNIV) em regiões temperadas (MARTINEZ; GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001).

## 3.6 Resposta Imune

Os efeitos da criptococose estão diretamente vinculados a interação entre a resposta imune do hospedeiro e os fatores de virulência do patógeno (WOZNIAK; OLSZEWSKI; WORMLEY Jr., 2015). Uma infinidade de células e citocinas compõem a defesa do hospedeiro. A suscetibilidade à criptococose surge por falha na resposta imune adaptativa, essencialmente respostas de células T. Porém, mesmo nessas

condições, os macrófagos alveolares desempenham função essencial na fagocitose do patógeno e modulam uma resposta imune adequada, por meio da secreção de citocinas, recrutamento de outras células de defesa e apresentação de antígenos (GOLDMAN et al., 2001).

As células T CD4<sup>+</sup> desempenham função central na erradicação da doença. Dependendo do estímulo, estas células podem se diferenciar em linfócitos T auxiliares (Th, do inglês T helper) com perfil inflamatório (linfócitos Th1 e Th17) ou com perfil regulador (Th2). Células Th1 são as produtoras clássicas de IFN- $\gamma$ ; células Th2 sintetizam IL-4, IL-5 e IL-13; e células Th17 produzem IL-17 e IL17F (PAPPU et al., 2008; WOZNIAK et al., 2011). Uma vez ativadas, as células T CD4<sup>+</sup> auxiliam linfócitos B, macrófagos e células T CD8<sup>+</sup> a desempenharem as suas funções (LUCKHEERAM et al., 2012). A ativação das células T CD4, no entanto, depende da apresentação de antígenos previamente capturados, processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC), no contexto de moléculas MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal, do inglês *major Histocompatibility Complex*). As DCs, que juntamente com macrófagos e linfócitos B constituem o grupo das APCs, são capazes de fagocitar *C. neoformans* opsoniza com anticorpos ou proteínas do sistema complemento. De fato, quando comparadas a macrófagos alveolares, DCs são mais eficientes na apresentação de antígenos de *C. neoformans* para linfócitos T (SYME et al., 2002).

CDs existem em dois estágios de maturação distintos: imaturo (iDC) e maduro (mDC). iDCs são eficientes na captura e processamento, mas não na apresentação do antígeno para LT. mDCs, por outro lado, são eficientes apresentadoras, mas não possuem a capacidade de capturar e processar antígenos. Assim, a captura e o processamento de antígenos iDCs, juntamente com outros estímulos, deflagram a maturação das DCs (EASTMAN; OSTERHOLZER; OLSZEWSKI., 2015). Huston et al. (2013) sugeriram que *C. gattii* possui a capacidade de inibir a maturação das DCs, evadindo-se, assim, da resposta imune adaptativa protetora. Um estudo recente mostrou que a infecção por *C. gattii* limita a resposta Th1/Th17 mediada por DC, por restringir a função dessas células e regular negativamente a expressão de quimiocinas pulmonares requeridas na diferenciação das células Th1. Dessa forma, o hospedeiro é incapaz de



modular a defesa imunológica funcional contra o fungo (ANGKASEKWINAI et al., 2014).

A cápsula polissacarídica de *C. neoformans* é capaz de ativar as proteínas do sistema complemento tanto pela via alternativa quanto pela via clássica (HARDISON et al., 2010.). A ativação do sistema complemento resulta na opsonização do patógeno, que promove a sua fagocitose, ao tempo em que induz resposta inflamatória (BRUMMER; STEVENS, 1994; SCHOP, 2007; MERSHON et al., 2009; WOZNIAK et al., 2011). Estudos mostram que camundongos infectados por *C. gattii* apesar de possuir a capacidade restrita de ativar a via alternativa do complemento, o acionamento da cascata por outras vias é essencial na infecção, pois o C3 pode se ligar ao componente capsular GXM e retardar o processo infeccioso (BRUMMER; STEVENS, 1994; MERSHON et al., 2009; WOZNIAK et al., 2011). Além do complemento, a imunidade celular humoral dependente de células B atua na infecção criptocócica. Hardison et al. (2010) demonstraram, em modelo murino, que células B são predominantes no processo inflamatório pulmonar em resposta a infecção por *C. neoformans*.

### 3.7 Células Dendríticas

Desde sua descoberta na década de 1970 as DCs têm sido objeto de investigação por vários grupos de pesquisadores (STEINMAN, 2007). Inicialmente, tais estudos eram muito limitados devido ao baixo número de DCs circulantes do sangue. O advento do desenvolvimento de métodos de diferenciação de DCs, *in vitro*, possibilitou muitas descobertas de suas propriedades biológicas e moleculares foram realizadas (CAUX et al., 1992; INABA et al., 1994; ROMANI, GRUNER et al., 1994; STEINMAN, 2007).

As DCs são populações celulares heterogêneas, únicas na ativação de células T por meio da captura, processamento e apresentação de antígenos (STEINMAN; SWANSON, 1995; MORRIS et al., 1994; PFEIFER et al., 1993). A morfologia ramificada dessas células é de extrema importância, pois aumenta a superfície de contato dessas células, otimizando não só a captura de antígenos como também a apresentação destes para os linfócitos T. Esta característica, aliada ao fato de que as DCs estão estrategicamente dispostas nos principais sítios de entrada de antígenos no

organismo, tornam-nas um elo entre a imunidade inata e adaptativa. Esse atributo das DCs tem atraído a atenção de pesquisadores que vislumbram o desenvolvimento de protocolos experimentais utilizando tais células, não só para o tratamento de doenças malignas e infecciosas, mas também para a produção de vacinas (PALUCKA; BANCHEREAU, 2013).

Há a possibilidade de indução da maturação das DCs *in vitro* com o uso de citocinas, como TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) ou LPS de *Escherichia coli*. Já DCs imaturas podem ser geradas a partir de células progenitoras da medula óssea quando estimuladas com GM-CSF e IL-4 (PALUCKA; BANCHEREAU, 1999). Dependendo do protocolo de diferenciação utilizado é possível a geração, *in vitro*, de DCs com características notavelmente distintas, tais como: indutoras de imunidade ou indutoras de tolerância, dependendo dos precursores e dos meios utilizados para diferenciá-las (INOHARA; NUÑEZ, 2003; O'NEILL, 2004; JONULEIT; SCHMITT, 2003). Cabe lembrar que em condições fisiológicas, a captura de antígenos pela DC pode ocorrer: (i) na presença de estímulos, o que resulta na maturação das mesmas e indução da resposta imune ativa contra aquele antígeno (INOHARA; NUÑEZ, 2003; O'NEILL, 2004); (ii) na ausência de estímulos, o que resulta na indução de respostas tolerogênicas pelos linfócitos T (JONULEIT; SCHMITT, 2003).

Os múltiplos fatores associados à polarização da resposta imune induzida pelas células dendríticas são: o estágio de maturação da DC; os diferentes subtipos de DCs; a natureza do antígeno apresentado, bem como as citocinas presentes no meio (VIEIRA, 2000; LWASAKI; KELSALL, 2001; MANICKASINGHAM et al., 2003; JONULEIT; SCHMITT, 2003; O'NEILL, 2004; WALLET; SEN; TISCH, 2005). As DCs em seus estágios de maturação, além de diferirem quanto à expressão de moléculas MHC e coestimuladoras, também secretam perfis diferenciados de citocinas. Enquanto iDCs parecem secretar IL-10 e não produzir IL-12 (um perfil predominantemente regulador), mDCs produzem níveis elevados de IL-12 e TNF- $\alpha$ , mas não secretam IL-10 (um perfil predominantemente inflamatório). É importante salientar a existência de DCs ditas semi-maduras, que apresentam um perfil anti-inflamatório intermediário (RUTELLA, LEMOLI, 2004).

Teoricamente, DC completamente maduras podem ser usadas para indução de imunidade, ao passo que DC imaturas podem ser usadas para o tratamento de doenças

autoimunes, neoplasias e AIDS bem como em protocolos de indução de tolerância a alotransplantes (BORGES et al., 2010, 2013; ELENI-KYRIAKI et al., 2014; YVES LEVY et al., 2014).

A indução de respostas tolerogênicas por iDC pode envolver pelos menos três mecanismos distintos: (i) apoptose de células T efectoras reativas (RODIG et al., 2003; SUH. et al., 2003); (ii) indução de células T reguladoras (JONULEIT et al., 2000) e (iii) apresentação do antígeno na ausência de co-estimulação ótima (INABA et al., 1994). Esta visão, entretanto, tem sido provocada pela ideia de que diferentes subgrupos de DC regulam a imunidade versus tolerância, e que DCs fenotipicamente maduras também podem induzir tolerância de células T, especialmente células T CD8<sup>+</sup> (SHORTMAN; HEATH, 2001; SAUTER et al., 2000; VREMEC; SHORTMAN, 1997).

Os mecanismos pelos quais as DCs induzem tolerância no contexto de auto-reatividade patológica e da rejeição de alotransplante, ainda são objeto de intensa investigação. Um número crescente de pesquisadores acredita que a indução de células T reguladoras produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$  seja um dos principais mecanismos envolvidos na regulação negativa da resposta imune inflamatória (MOTTA et al., 2007). No entanto, é possível que outros fatores presentes nos enxertos ou produzidos por microrganismos também contribuam significativamente para a sustentação de tal processo. Nesse contexto, as proteínas de choque térmico (Hsp) apresentam-se como boa ferramenta.

### **3.8 Proteína de choque térmico (Hsp) – Hsp70**

Descobertas na década de 1960 em cromossomos politênicos de glândula salivar da mosca de fruta e agrupadas em famílias de acordo com o seu peso molecular aproximado em kilodalton (kDa), as Hsps são chaperonas intracelulares que se mantiveram altamente conservadas ao longo da evolução (DE MAIO et al., 2012; FEDER e HOFMANN, 1999; ELLIS, 1990; LINDQUIST; CRAIG, 1988). Uma das principais características dessas proteínas é o grau elevado de homologia de sequência entre Hsps de famílias equivalentes, derivadas de eucariotos e procariotos, sugerindo um alto nível de conservação funcional. Este conceito, no entanto, é questionado por resultados de diferentes estudos, todos os quais indicam que Hsp de uma mesma família, porém de espécies distintas, podem realizar funções notavelmente distintas

(EASTMAN et al., 2015; SILVEIRA et al., 2013; MOTTA et al., 2007; KOL et al., 2000).

As Hsps são proteínas de “*stress*” conhecidas como proteínas de choque térmico, como as Hsp60 e Hsp70, que têm se mostrado antígenos significativos no direcionamento da resposta imune em humanos (COHEN; YOUNG, 1991). Proteínas de estresse em geral têm sido previamente identificadas como antígenos imunodominantes em condições inflamatórias, e uma infinidade de resposta imune a patógenos é direcionada a peptídeos delas derivados (VAN EDEN et al., 1989; BRANDÃO et al., 2014). Nas últimas duas décadas, entretanto, os imunologistas descobriram o potencial imunorregulador dessas proteínas e estudos recentes utilizando Hsp70 têm focado em sua capacidade de modular a resposta imune (BORGES et al., 2010; 2013; SILVEIRA et al., 2013).

Devido à similaridade filogenética entre Hsps de microorganismos e mamíferos, há grande probabilidade de que o reconhecimento cruzado entre epítomos destas proteínas funcione como uma ligação entre infecção e auto-imunidade. Estudos sugerem que a reatividade à Hsp pode ser um mecanismo fisiológico de regulação da resposta imune. Essa hipótese é apoiada pela observação de que a indução de reatividade de células T à Hsp70 exógena regula negativamente a doença em modelos experimentais de artrite reumatóide, por mecanismos que envolvem a participação de células T CD4+ produtoras de citocinas reguladoras (DETANICO et al., 2004; TANAKA et al., 1999).

Alguns autores têm mostrado o envolvimento das Hsps na regulação de diversas doenças autoimunes inflamatórias (KAMPHUIS et al., 2005; RAZ et al., 2001). Neste sentido, tem-se investigado os prováveis mecanismos usados pela Hsp70 na regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e em sua capacidade de induzir células T reguladoras (BORGES et al., 2010, 2013; YANG; LUO; HU, 2006). Apesar do recente progresso na manipulação das Hsps rumo à imunoterapia clinicamente aplicável, importantes questões sobre os mecanismos pelos quais essas proteínas exercem sua função imunomoduladora ainda permanecem apenas parcialmente compreendidos.

Ao lançar mão de uma estratégia integrando imunoproteômica e imunoinformática, nosso grupo mostrou que a Hsp70 é um antígeno imunodominante

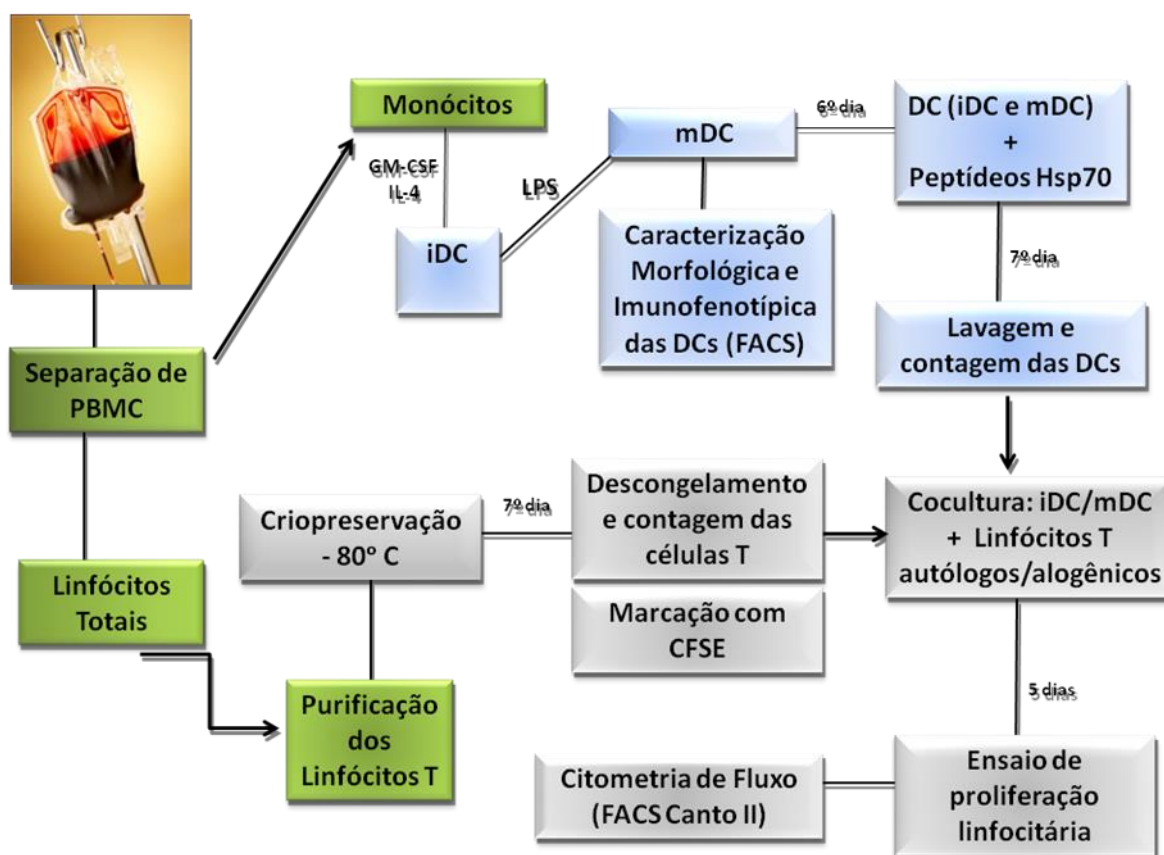
na criptococose por *Cryptococcus gattii* (VGII) e que, peptídeos sintéticos dela derivados, são imunorreativos (MARTINS et al., 2013; BRANDÃO et al., 2014), sendo alvo de reconhecimento por anticorpos de paciente com aquela doença. Esse achado promissor, que se coaduna com outros relatos da literatura, nos motivou a realizar experimentos *in vitro*, com vistas ao entendimento da resposta celular dirigida ao *C. gattii*, particularmente aquela elicitada por peptídeos da Hsp70 (RODRIGUES et al., 2008a, 2008b).

Nesse contexto, considerando o potencial das DCs na indução e sustentação da resposta imune, assim como da Hsp70 na modulação de resposta imunológica, levantamos a hipótese que peptídeos sintéticos derivados da Hsp70 de *C. gattii* (VGII) apresentados por DC podem ativar respostas efetoras de células T. Baseados nos conhecimentos acima reportados, exploramos, *in vitro*, o potencial das DCs no direcionamento da resposta de células T quando previamente estimuladas com os peptídeos da Hsp70 de *C. gattii*. Pretendemos com esse estudo entender a resposta celular contra *C. gattii*, visando melhorias no diagnóstico e/ou desenvolvimento de imunoterapias para a criptococose.

## 4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 4.1 Delineamento do Estudo

O estudo de natureza experimental de caráter investigativo envolveu células mononucleares humanas isoladas a partir do sangue de indivíduos adultos saudáveis, obtidas do descarte de bolsas de sangue usadas como controle de qualidade no Hemocentro de Teresina. A Figura 3 sintetiza a protocolo experimental adotado.



**Figura 3. Delineamento do protocolo experimental.** Células dendríticas (DC) maduras (mDC) e imaturas (iDC) diferenciadas a partir de monócitos de voluntários saudáveis foram estimuladas com peptídeos sintéticos derivados da Hsp70 de *C. gattii* (VGII). DCs estimuladas e não estimuladas com os peptídeos da Hsp70 de *C. gattii* foram cocultivadas com linfócitos T autólogos e alogênicos, e a linfoproliferação autóloga foi determinada pelo índice de proliferação linfocitária por Citometria de Fluxo (FACS Canto II). PBMC: células mononucleares periféricas; GM-CSF: fator estimulante de granulócitos e macrófagos; IL-4: interleucina-4; LPS: lipopolissacarídeo; Hsp70: proteína do choque térmico de 70 KDa; CFSE: diacetato de carboxifluoresceína succinimidyl ester.

## 4.2 Obtenção de células mononucleares periféricas do sangue de indivíduos saudáveis

As células mononucleares foram isoladas de rejeitos de bolsas de sangue provenientes de doadores atendidos no Hemocentro de Teresina, Piauí. O conteúdo sanguíneo das bolsas (cerca de 90 ml) foi depositado em tubos falcon estéreis de 50 ml e centrifugadas a 850g por 30 minutos a 25° C, com aceleração 5 e desaceleração zero. Após centrifugação, realizou-se o descarte do sobrenadante, e obtenção das células brancas (*buffy coat*). Estas foram diluídas 1:2 em solução salina isotônica e submetidas a protocolo de separação das mononucleares em gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/l, Ficoll: Pharmacia Biotech, Sweden e Hypaque: Urografina 370, Schering, Brasil). Os tubos falcon com capacidade para 15 ml e contendo 3,5 ml de Ficoll-Hypaque foram acrescentados 7 ml do *buffy coat* previamente diluído e homogeneizado. Os tubos foram centrifugados a 380g por 20 minutos a 25° C. O resultado foi a estratificação das células sanguíneas no gradiente de densidade formado. A interface entre o PBS (Solução Salina Tamponada por Fosfato) e o ficoll foi retirada (nuvem branca de células) e transferida para outro tubo falcon de 50 ml. Em seguida prosseguiu-se com três lavagens com PBS intercaladas por centrifugação (i) 300g por 15 minutos, a 25° C (ii) 130g por 8 minutos, a 25° C (iii) 95g por 10 minutos, a 25° C, sempre com aceleração 5 e desaceleração zero. Após a última lavagem, as células mononucleares (PBMC do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) foram ressuspensas em 3ml de PBS para determinação da concentração celular por meio da contagem em câmara citométrica de Neubauer.

Para contagem, foi retirada uma alíquota de 10 µl de células PBMC para um eppendorf e homogeneizada em 10 µl de Azul de Tripan. A contagem foi efetuada em microscópio óptico, observando-se cinco quadrantes da câmara de Neubauer (um quadrante central e quatro externos). A viabilidade celular foi determinada, e somente contagens  $\geq 90\%$  de células vivas foram consideradas adequadas para os experimentos subsequentes.

## 4.3 Purificação de Monócitos

Os monócitos enriquecidos a partir de PBMC foram obtidos por processo de separação negativa utilizando-se *beads* magnéticas (Monocyte isolation kit II para humanos, Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach- Alemanha), de acordo as instruções do fabricante. Brevemente, as PBMCs foram duplamente marcadas: marcação primária (coquetel de anticorpos monoclonais conjugados com biotina) e marcação secundária (anticorpos monoclonais anti-biotina conjugados às contas). Para a marcação primária foram usados 10 $\mu$ l do coquetel de anticorpo biotilado para 10<sup>7</sup> células totais e para a marcação secundária 20  $\mu$ l de anti-biotina para 10<sup>7</sup> células totais. Entre as duas etapas de marcação não foi feita qualquer lavagem das células. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS por adição de 10 a 20 vezes o volume do tubo e centrifugada a 300g por 10 minutos. Depois, retirou-se completamente o sobrenadante e ressuspendeu-se para 10<sup>8</sup> células em 500  $\mu$ l de PBS.

Em seguida, as PBMCs em suspensão foram aplicadas em uma coluna MACS (Miltenyi, Biotec GMBH, Bergisch Gladbach, Alemanha) para separação celular, submetida a um campo magnético. Esse processo permite a passagem de monócitos enriquecidos através da coluna e retenção das células não monocíticas na mesma. Seguiu-se com a lavagem da coluna MS com adição apropriada de Tampão PBS (MS: 3x 500  $\mu$ l). Procedeu-se com o cálculo de rendimento de monócitos por meio da contagem em câmara de Neubauer como supracitado.

#### **4.4 Purificação e Congelamento de linfócitos T**

As células T foram purificadas a partir de PBMC por processo de seleção negativa com *beads* imunomagnéticas (Pan T cell isolation Kit II para humanos, Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach- Alemanha) de acordo as instruções do fabricante. Essas células foram duplamente marcadas: marcação primária (coquetel de anticorpos monoclonais conjugados com biotina) e marcação secundária (anticorpos monoclonais anti-biotina conjugados às contas). Para a marcação primária foi usado 10 $\mu$ l do coquetel de anticorpos para 10<sup>7</sup> células totais e para a marcação secundária 20  $\mu$ l de anticorpos para 10<sup>7</sup> células. Entre os dois passos de marcação as células não foram lavadas. Após a marcação, as etapas subsequentes são as mesmas aplicadas para a obtenção de monócitos mencionadas acima.



As PBMCs em suspensão foram aplicadas em uma coluna MACS MS (Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach- Alemanha) e submetidas a um campo magnético para separação negativa de linfócitos T. De posse da suspensão de células T purificadas, seguiu-se com o cálculo do rendimento de Linfócitos T por meio da contagem em câmara de Neubauer e centrifugação da suspensão a 300g por 10 minutos para posterior congelamento celular.

Para a solução de congelamento usou-se 40% de meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina (LGC, Brasil), 50% de Soro fetal bovino inativado (FCS, Gibco, BRL) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA). O DMSO evita o rompimento da membrana celular no processo de congelamento. Em um isopor com gelo, o botão de células T foi cuidadosamente misturado a solução de congelamento, homogeneizado e dispensado em criotubos em uma concentração de  $10^7$ /ml. Por último, os linfócitos T armazenados nos tubos de congelamento foram estocados em um recipiente com isopropanol específico para congelamento celular gradual e mantidos a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior uso em cocultura com células dendríticas.

A pureza dos linfócitos foi avaliada, na etapa final do protocolo experimental, por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton & Dickinson) e a análise dos dados feita por meio do programa Infinicity (Cytognos, Santa Marta de Tormes, Salamanca, Espanha).

#### **4.5 Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos purificados**

Após a separação de monócitos utilizando o kit (Monocyte isolation kit II para humanos, Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach- Alemanha) e contagem em câmara de Neubauer, as células dendríticas foram geradas a partir de monócitos  $\text{CD14}^+$ .  $2 \times 10^6$  monócitos  $\text{CD14}^+$  purificados foram plaqueados em placas de cultura de seis poços (Costar, Cambridge, MA, EUA) em 3 ml de meio RPMI 1640 (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute Medium*) suplementado com L-glutamina (LGC Brasil) com 5% de soro fetal bovino inativado e 1% de Penicilina/Estreptomicina (10000 U/ml), na presença de 20 ng/ml de GM-CSF (do inglês, *granulocyte macrophage colony stimulating factor*) e 20 ng/ml de IL-4 (interleucina-4) (eBioscience, San Diego, California, EUA). As placas foram cultivadas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa úmida a uma tensão

constante de 5% de CO<sub>2</sub> por cinco dias para obtenção das células dendríticas imaturas (iDC).

Após 48 horas de cultivo celular foi efetuada a troca de metade do meio em cada poço da placa, contendo as mesmas concentrações de GM-CSF e de IL-4 (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA). Após 96 horas de cultivo, parte das células (agora iDC) foram tratadas com 200 ng/ml de LPS de *Escherichia coli* (lipopolissacarídeo) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por dois dias adicionais para maturação. No sexto dia de cultivo tanto iDCs quanto mDCs foram centrifugadas a 300g por 10 minutos, tiveram o sobrenadante descartado e foram ressuspendidas em 3 ml de meio de cultivo sem os fatores de crescimento GM-CSF e IL-4. As células foram então pulsadas com um dos seguintes estímulos: peptídeos H18, H21, H26 ou pool desses em placas de seis poços.

Para caracterização Imunofenotípica, as células dendríticas foram centrifugadas a 300g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e sua concentração acertada para  $2 \times 10^5$  em 25 µl de tampão FACS (PBS com 2% de FCS). A suspensão celular foi adicionada de quantidade relevante de anticorpos conjugados (2.5 µl/tubo) e incubada por 30 minutos a 4° C ao abrigo da luz. Foram utilizados anticorpos monoclonais marcados com fluorescência (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, EUA) dirigidos as seguintes moléculas: CD1a e CD86 (conjugado ao Isotiocianato de fluoresceína - FITC); CD14, CD80 e CD19 (conjugado a Fococeritrina - PE); antígeno leucocitário humano-DR (HLA-DR) (conjugado a proteína clorofila pirimidina - PerCP); e CD83 e CD45 (conjugado a alofococianina - APC). Um tubo com células dendríticas não coradas foi utilizado como controle negativo.

Finalizada a reação, as células foram lavadas duas vezes com 1 ml de solução tampão FACS e centrifugadas a 300g a 25° C por 5 minutos. Finalmente o sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas em 400 µl de solução FACS e adquiridas em citômetro de fluxo (FACSCanto II). A análise foi feita por meio do *software* BD FACSDiva®, usando como parâmetros a dispersão frontal (FSC – do inglês *Forward Scatter*) e dispersão lateral (SSC – do inglês *Side Scatter*).

#### **4.6 Síntese dos Peptídeos**

Os peptídeos sintéticos da proteína imunorreativa Hsp70 de *C. gattii* (genótipo VGII) foram idealizados a partir do mapeamento epitópico das células B para aquela proteína por meio de ferramentas de imunoinformática. Apenas os peptídeos identificados concomitantemente pelos *softwares* ABCpred e BCpred foram considerados putativos alvos antigênicos em imunoenaios para criptococose (MARTINS *et al.*, 2013). Utilizando esta estratégia, pudemos selecionar seis peptídeos da proteína.

As sequências de aminoácidos dos seis peptídeos sintéticos da Hsp70 de *C. gattii* (PEPTIDE 2.0, Chantilly, VA, EUA) estão depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) com o número: BR 10 2015 027 885 3. Dos seis peptídeos, três peptídeos (H18, H21 e H26) foram utilizados neste estudo, porque apresentaram grande acurácia frente ao reconhecimento por anticorpos de pacientes com criptococose (BRANDÃO *et al.*, 2014).

#### **4.7 Pulso de DCs com Peptídeos Sintéticos Derivados da Hsp70 de *Cryptococcus gattii***

Para a realização dos ensaios funcionais propostos aqui, trabalhamos com células dendríticas maduras e imaturas em duas diferentes situações: não pulsadas e pulsadas com peptídeos sintéticos da Hsp70 de *C. gattii*. Para tanto, diferenciamos DC humanas a partir de monócitos sanguíneos com fatores de diferenciação apropriados durante 5 dias. As DCs assim diferenciadas e foram pulsadas com os peptídeos sintéticos (PEPTIDE 2.0, Chantilly, VA, EUA) derivados da proteína de choque térmico de 70 kDa – Hsp70 de *C. gattii* (VGII). Para o estudo usou-se os peptídeos H18, H21, H26 e *pool* desses peptídeos. Os dois grupos de DCs, iDC e mDC, foram pulsados com peptídeos isoladamente na concentração de 0,2 µg/ml. Cada experimento foi realizado de maneira emparelhada tendo como o controle DCs não-pulsadas. Ambos os grupos de DCs pulsadas e não pulsadas foram levadas à estufa e mantidas a 37° C com tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

#### **4.8 Reatividade de Linfócitos T frente às DCs**

Para avaliar o potencial das DCs diferenciadas *in vitro* de ativar linfoproliferação cultivamos tais células (iDC e mDC) com linfócitos T alogênicos. Para avaliarmos o

efeito dos peptídeos sobre a proliferação de linfócitos T, cultivamos linfócitos T autólogos com iDC e mDC pulsadas com os peptídeos sintéticos da Hsp70 de *C. gattii*. O cultivo foi feito durante cinco dias em meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, Brasil) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/ml) e 5% de soro fetal bovino inativado pelo calor. DCs previamente pulsadas com peptídeos sintéticos (0,2 µg/ml) derivados da Hsp70 de *C. gattii* ( $2 \times 10^4$  células/poço) e linfócitos T purificados ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com fundo em U. O ensaio foi realizado em triplicata. Para mensurar a proliferação de células T, foi realizada a marcação com CFSE utilizando o kit Cell Trace™ CFSE (Diacetato de Carboxyfluoresceína Succinimidyl Ester) (Invitrogen) de proliferação celular seguindo as instruções do fabricante. Passados cinco dias de cocultura, as células T foram coletadas, lavadas, e adquiridas em um citômetro FACSCanto II e os resultados analisados com o auxílio do *software* Infinicyt (Cytognos, Santa Marta de Tormes, Salamanca, Espanha). Linfócitos T apenas não estimulados e células T cultivadas na presença de fitohemaglutinina (PHA) foram utilizados como controles negativos e positivos, respectivamente.

#### **4.8.1 Descongelamento dos Linfócitos T e Marcação com CFSE**

Os criotubos contendo as células T foram retirados do Freezer -80° C e imediatamente imersos em banho térmico a 37° C. Antes do descongelamento completo todo o volume foi transferido para um tubo falcon de 12 ml contendo 9 ml de meio RPMI 1640 (LGC, Biotecnologia, Brasil) e prontamente centrifugado a 300g por 8 minutos a 25° C, com aceleração 5 e desaceleração zero. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado, o botão celular foi ressuspendido em 3 ml de meio RPMI 1640 e as células foram contadas em câmara de citométrica. As células foram consideradas ideais para o uso quando sua viabilidade foi  $\geq 90\%$ .

A marcação dos linfócitos T foi feita utilizando o kit Cell Trace™ CFSE (Invitrogen). Brevemente, 18µl de DMSO foram acrescentados a um *vial* contendo Cell Trace™ CFSE (Invitrogen). Esta solução estoque foi diluída em 20 ml de PBS e aquecida a 37° C para obter uma solução de 5 cM. Dez ml dessa solução foram usadas para ressuspende os linfócitos T um tubo de ensaio de 50 ml, que foi incubado por 20 minutos a 37° C em banho térmico. Após incubação, os tubos foram centrifugados a

300g por 5 minutos a 25° C, com aceleração 5 e desaceleração zero. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular ressuspense na concentração de  $2 \times 10^5$  células/200  $\mu$ l em meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina (LGC Biotecnologia, Brasil).

#### **4.8.2 Preparo das DCs pulsadas com antígenos de Hsp70 para cocultura com Linfócitos T**

Após dois dias de cultivo na presença de peptídeos sintéticos da Hsp70 de *C. gattii* (VGII), iDC e mDC foram retiradas da estufa para utilização em protocolos de cocultura com células T. cada grupo de células foi centrifugado a 130g por 8 minutos a 25° C, com aceleração 5 e desaceleração zero. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e cada grupo de DC ressuspense em 1 ml de meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, Brasil) para contagem em câmara de citométrica. Uma vez determinadas a quantidade e a viabilidade de cada grupo de DC, sua concentração foi acertada para  $2 \times 10^4$  células/200  $\mu$ l em placa de 96 poços com fundo em U.

#### **4.8.3 Cocultura de DCs e Linfócitos T**

As coculturas de linfócitos T com iDC ou mDC previamente pulsadas como descrito acima foi feito na razão de 20 Linfócitos T para uma DC em volume de 200  $\mu$ l em placa com fundo em U. Cada experimento foi realizado em triplicata. Cada experimento teve os seguintes controles negativos: linfócitos T cultivados na ausência de DC e linfócitos T cultivados com DCs não pulsadas. Como controles positivos foram utilizados linfócitos T cultivados com DCs na presença de fitoemaglutinina (PHA). Após o plaqueamento, as placas foram levadas a estufa e mantidas por cinco dias a 37° C com tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.9 Avaliação da Proliferação dos Linfócitos T frente às Células Dendríticas, por Citometria de Fluxo**

O efeito que as iDCs e mDCs pulsadas com peptídeos sintéticos da Hsp70 de *C. gattii* (VGII) exercem sobre a proliferação dos linfócitos T autólogos foram avaliados por citometria de fluxo. Ao término de cinco dias de cocultura, as placas foram retiradas da estufa e todo o conteúdo celular foi cuidadosamente transferido para os tubos falcon

de polietileno de 5 ml (Corning Science, Reynosa, Tamaulipas, México) específico para citometria de fluxo.

Cada tubo foi acrescido de 1 ml de PBS, centrifugado a 300g por 5 minutos a 25° C, com aceleração 5 e desaceleração zero, por três ciclos de repetição. Finalizadas as lavagens, o sobrenadante foi desprezado e o botão celular dissociado por meio de agitação em vortex. As células assim dissociadas foram tratadas com 1 ml de solução de fixação/permeabilização de Foxp3 (eBioscience, *Flow Cytometry*) e incubadas por 40 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao término da incubação, sem lavar, a cada tubo foi adicionado 2 ml de tampão de permeabilização 1x e centrifugado a 350g por 5 minutos a 25° C, com aceleração 5 e desaceleração zero.

Desprezado o sobrenadante, o botão celular foi ressuspenso em 100µl de tampão de permeabilização 1x, e sem lavar foram adicionados os anticorpos conjugados a fluorocromos (2,5µl de cada anticorpo por tubo). Foram utilizados os seguintes anticorpos: CD3 conjugado a PerCP (do inglês, *Peridinin chlorophyll protein*); CD45 conjugado a APC (do inglês, *allophycocyanin*) e Foxp3 conjugado a PE (do inglês, *phycoerythrin*). Após adição dos marcadores, os tubos foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Finalizado o período de incubação as células foram lavadas duas vezes com tampão de permeabilização (2 ml por lavagem/tubo), centrifugadas a 350g por 5 minutos a 25° C, com aceleração 5 e desaceleração zero e o descarte do sobrenadante ao fim de cada lavagem. Ao final da última lavagem foram ressuspendidas em 300µl de tampão PBS e adquiridas em citômetro de fluxo (BD, FACSCanto II), e analisados por meio do *software* Infinicyt (Cytognos, Santa Marta de Tormes, Salamanca, Espanha). Os valores de expansão linfocitária foram expressos pelo índice de proliferação (SI). A proliferação linfocitária foi avaliada como índice de proliferação (SI) em relação á proliferação de linfócitos T cultivados na ausência de estímulos,

#### **4.10 Análise Estatística**

Para análise dos dados obtidos em nossos resultados, utilizamos teste não-paramétrico (teste de Turkey) associado ao pós-teste de Dunn quando apropriado.

Consideramos como significativos valores de  $p \leq 0,05$ , adotando-se um intervalo de confiança de 95%.

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa computacional Graphpad Prism (GraphPad, Inc., San Diego, CA, EUA) versão 5.0.

#### **4.11 Questões Éticas**

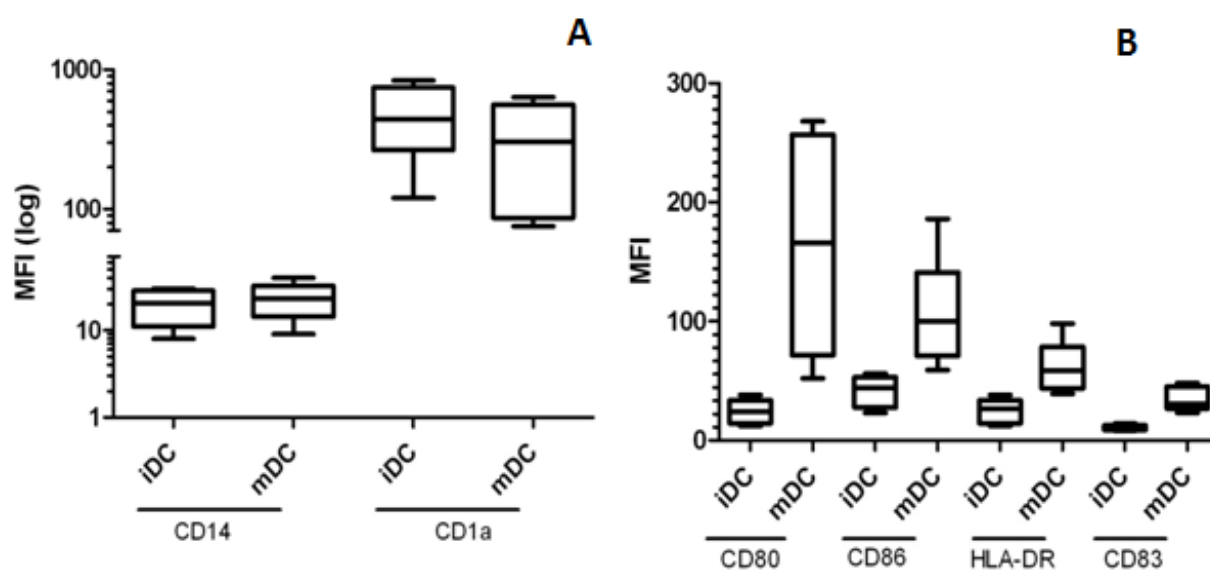
A pesquisa realizada envolveu material biológico humano, e passou por avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, mediante cadastro na Plataforma Brasil, para análise e parecer, levando em conta, portanto, aspectos éticos dispostos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí (Nº CAAE 31224813.5.0000.5214) sob o número de parecer 826733.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Imunofenotipagem das Células Dendríticas Derivadas de Monócitos

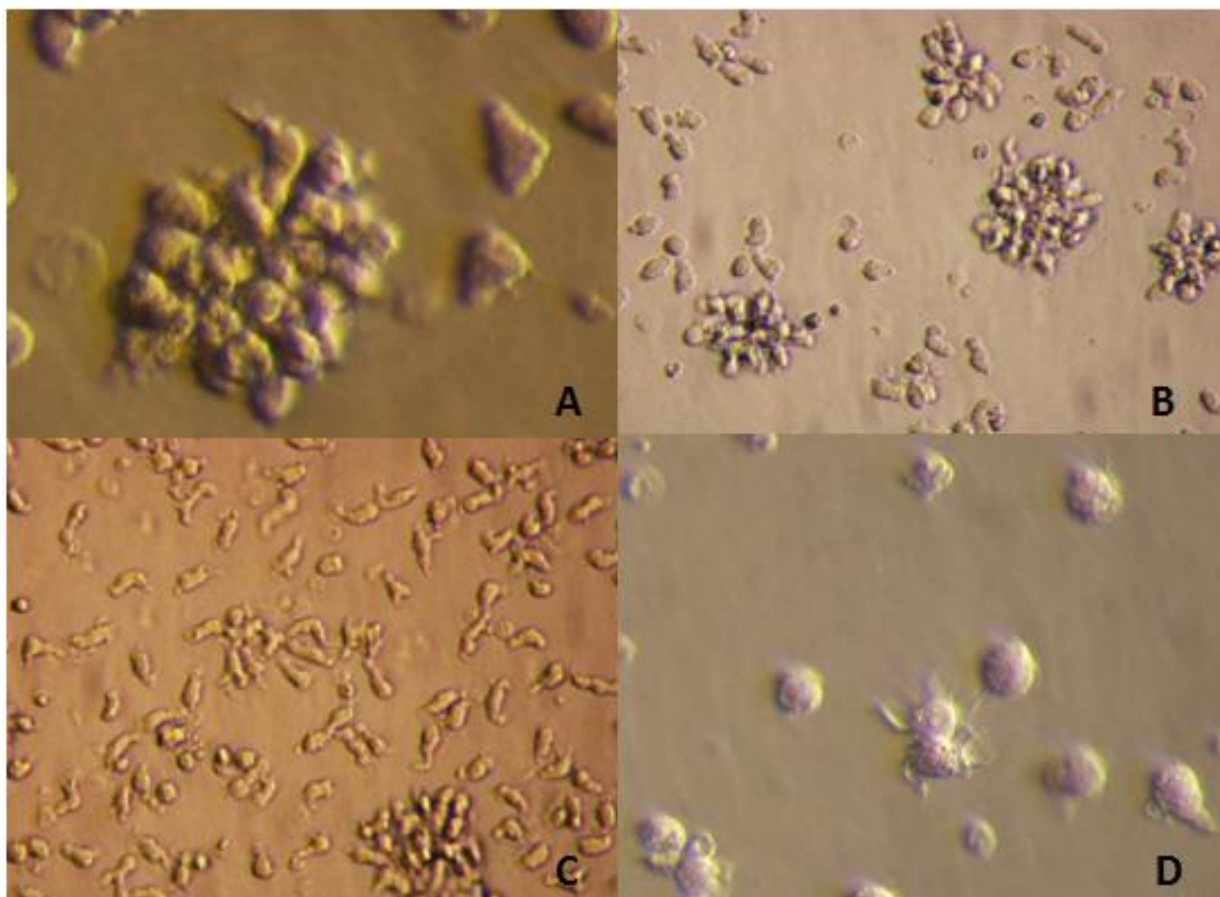
Células dendríticas de oito voluntários saudáveis foram diferenciadas a partir de monócitos obtidos por separação negativa (pureza  $\geq 90\%$ ) como determinada por análises de citometria de fluxo. Após cinco dias de cultura, aproximadamente 90% dos monócitos cultivados se diferenciaram em células dendríticas imaturas  $CD1a^+ CD14^-$ , como mostra a Figura 4A. O tratamento dos monócitos com os fatores de crescimento GM-CSF e IL-4 promoveu a diferenciação das células dendríticas com fenótipo imaturo, evidenciado pela baixa expressão dos marcadores  $CD83^{\text{negativo}}$ ,  $CD80^{\text{baixo}}$ ,  $CD86^{\text{baixo}}$  e  $HLA-DR^{\text{baixo}}$ . Além disso, as iDCs se tornaram fenotipicamente maduras (mDC) após tratamento com LPS, apresentando o perfil fenotípico  $CD83^+$ ,  $CD80^{\text{elevado}}$ ,  $CD86^{\text{elevado}}$  e  $HLA-DR^{\text{elevado}}$  (Figura 4B). Esses dados indicam que fomos bem sucedidos tanto em diferenciar DCs a partir de monócitos quanto maturá-las *in vitro*.



**Figura 4. Imunofenotipagem de células dendríticas derivadas de monócitos humanos por Citometria de Fluxo.** Monócitos humanos purificados negativamente foram cultivados durante cinco dias em meio RPMI contendo GM-CSF e IL-4. (A) Aquisição do fenótipo imunológico de DC imaturas (iDC), como indicado pela regulação negativa de CD14 e regulação positiva de CD1a. (B) Tratamento das iDCs com LPS por 48 horas adicionais transformou-as eficientemente em mDCs, como confirmado pela regulação positiva de CD80, CD83, CD86 e HLA-DR. MFI (Mediana de intensidade de Fluorescência).



A caracterização morfológica das DCs foi realizada pela análise de fotodocumentação das mesmas em microscópio óptico. A Figura 5A mostra monócitos CD14<sup>+</sup> purificados e plaqueados no primeiro dia de cultivo. A Figura 5B destaca o início da diferenciação monocítica em DC imaturas. A Figura 5C evidencia DC fenotipicamente imaturas em sua totalidade. Finalmente, a Figura 5D mostra células maduras após o tratamento com LPS exibindo dendritos característicos de mDC.



**Figura 5. Cultivo de células dendríticas a partir de monócitos purificados.** (A) Monócitos purificados por separação negativa. (B) Grupos de Monócitos iniciando sua diferenciação em células dendríticas imaturas (iDC); (C) Células dendríticas imaturas diferenciadas e (D) Células dendríticas maduras após tratamento com LPS.

Em conjunto, e considerando a elevada expressão de CD1a e baixa expressão de CD14 estes resultados nos dois grupos de DCs comprovam que houve uma diferenciação expressiva (pelo menos 90%) das células dendríticas a partir de monócitos (CD14) de sangue periférico.

O GM-CSF usado para a diferenciação de DC a partir de monócitos é uma citocina fundamental na geração de DCs. Estudos têm evidenciado a importância desta citocina na imunidade contra criptococose, ao mostrarem *in vivo* que (i) a presença de anticorpos anti-GM-CSF resultam em elevadas taxas da disseminação de *C. gattii* para o SNC em humanos (ii) a produção de TNF- $\alpha$  em camundongos com criptococose deficientes em GM-CSF é significativamente reduzida quando comparada ao grupo selvagem (CHEN et al., 2007; SAIJO et al., 2014). Estes achados sugerem que GM-CSF é requerido para a ativação da resposta imune adaptativa, provavelmente por estimular o desenvolvimento das DCs e assim, induzir a imunidade adaptativa.

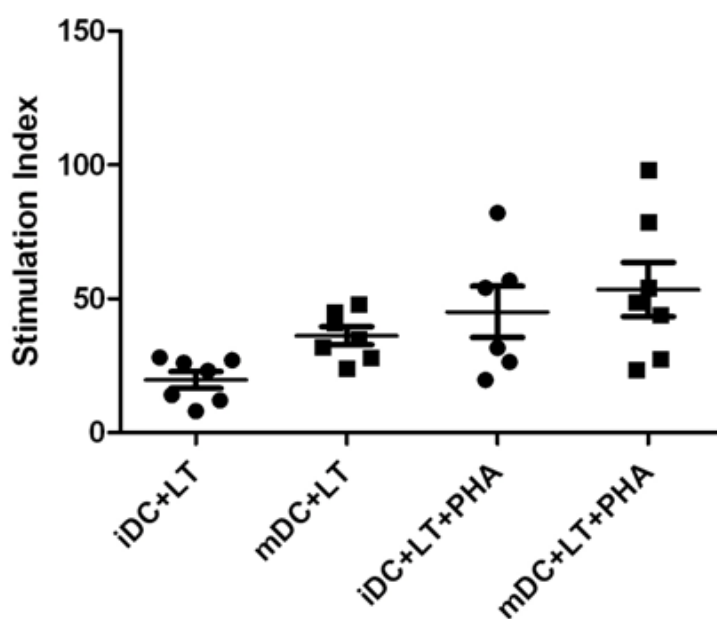
## **5.2 Caracterização Funcional das Células Dendríticas: DCs imaturas são estimuladores menos eficientes de aloproliferação**

Avaliamos a habilidade dos dois tipos distintos de DCs de induzir proliferação de linfócitos T alogênicos. O ensaio misto de reação linfocitária (MLR) nos mostrou que ambas, iDC e mDC, foram capazes de induzir proliferação das células T alogênicas. No entanto, a magnitude da resposta linfoproliferativa distinguiu entre os grupos de DCs imaturas e maduras. O grupo mDC apresentou maior capacidade de ativação das células T alogênicas quando comparada a iDC, (SI = 36,4 versus SI = 19,6 com  $p < 0,05$ ).

A interação *in vivo* das células dendríticas fenotipicamente maduras com as células T promove suas respostas específicas e as diferencia em DCs maduras funcionais. Estas são caracterizadas por apresentarem habilidade limitada de captar antígenos e apresentam grande capacidade de apresentação antigênica para as células T (GROLLEAU-JULIUS, 2006). DCs imaturas, por outro lado, apresentam alta atividade endocítica/fagocítica e baixa expressão de moléculas acessórias para ativação de células T (GUERMONPREZ et al., 2002). Além de expressarem moléculas MHC de Classe II intracitoplasmática e não expressam CD83 (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). Após a internalização, *in vivo*, do antígeno pelas células dendríticas, a ligação DC-antígeno, na presença de citocinas inflamatórias, pode estimular a maturação dessas células (VINEY, 2001).

### 5.3 Peptídeos Derivados da Proteína Hsp70 de *Cryptococcus gattii* Induzem Reatividade das Células T Autólogas

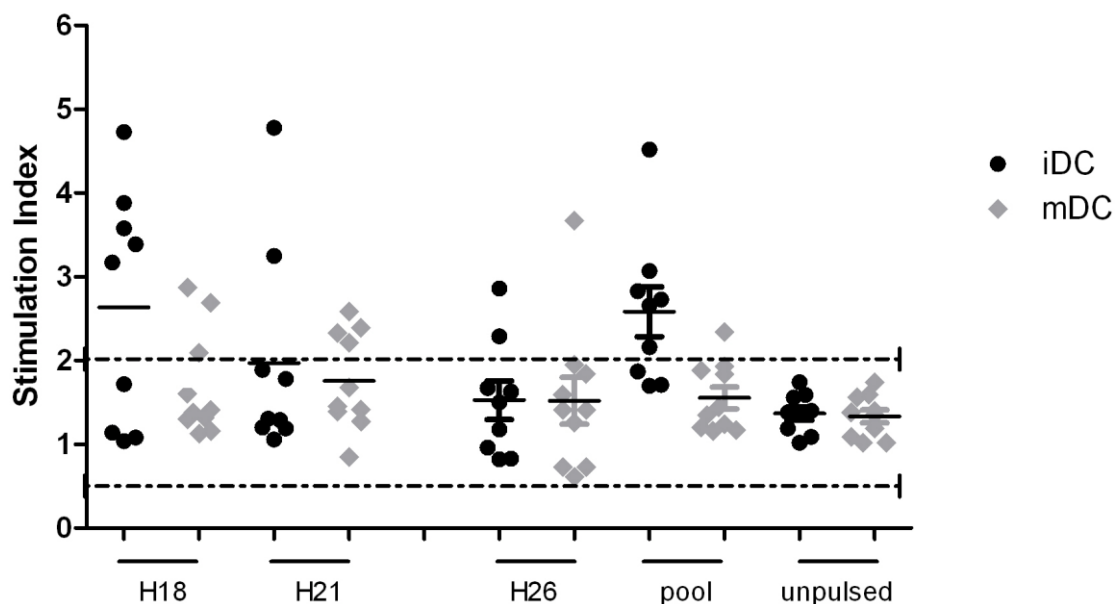
Avaliamos as respostas proliferativas de células T autólogas induzidas por células dendríticas imaturas e maduras (auto-reatividade das células T para DC). Ambas, iDC e mDC, foram capazes de induzir auto-reatividade, esta, porém foi mais frequentemente detectada no grupo mDC do que em iDC, inclusive quando os linfócitos T autólogos foram também co-cultivados com PHA, um mitógeno muito utilizado para estimulação inespecífica de células T *in vitro*, (Figura 6). Avaliamos a capacidade dos peptídeos sintéticos derivados da Hsp70 de *C. gattii* (VGII) em modificar a intensidade de proliferação das células T (marcação com CFSE), nos ensaios em que houve auto-reatividade de linfócitos T para células dendríticas. Do mesmo modo, comparamos a proliferação observada em culturas de DC não pulsados com peptídeos sintéticos da Hsp70 de *C. gattii*.



**Figura 6. Proliferação de linfócitos T autólogos induzida por células dendríticas derivadas de monócitos em diferentes estágios de maturação.** Índices de estimulação (SI) de linfócitos T alogênicos (LT) no período de cinco dias de estimulação com iDC e mDC. mDC induziu mais intensamente a aloproliferação de linfócitos T. Teste de Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$ .

Foi observado que os peptídeos sintéticos derivados da Hsp70 de *C. gattii* (VGII) intensificaram o índice de proliferação de linfócitos T autólogos direcionados a DCs,

sobretudo os peptídeos H18 e H21. Vale salientar que consideraríamos como potenciais estimuladores da resposta imune de células T qualquer antígeno capaz de induzir autorreatividade proliferativa em pelo menos 50%. Vimos que os peptídeos testados H18 e H21 exibiram um papel dominante na regulação positiva da resposta linfoproliferativa autóloga nos grupos de células dendríticas imaturas e maduras (Figura 7).



**Figura 7. Proliferação de células T autólogas para iDC e mDC pulsadas com diferentes peptídeos Hsp70 de *Cryptococcus gattii* (VGII).** Células dendríticas imaturas (iDC) ou maduras (mDC) não pulsados e previamente pulsadas (peptídeos H18, H21 ou H26) foram co-cultivadas, *in vitro*, por cinco dias com linfócitos T autólogos. O efeito dos diferentes peptídeos na proliferação de células T está exposto. Os resultados são apresentados pelo Índice de estimulação (SI). A indução de proliferação foi considerada quando  $SI \geq 2$ ; inibição da proliferação =  $SI \leq 0,5$ . Os peptídeos H18 e H21 induziram expressivamente a proliferação de células T no grupo iDC. Mann-Whitney  $p < 0,05$ .

Perguntamo-nos se os peptídeos derivados da Hsp70 de *C. gattii* (VGII) poderiam atuar sinergicamente na resposta dos linfócitos T aumentando a proliferação dessas células. Para isso, testamos a proliferação linfocitária com DCs pulsadas com o *pool* dos peptídeos H18, H21 e H26. A resposta linfoproliferativa induzida por DCs pulsadas com o *pool* de peptídeos foi muito similar ao efeito de indução com o peptídeo H18 sozinho.

Ao observarmos a proliferação linfocitária induzida pelos peptídeos supracitados, investigamos se, os linfócitos T que se proliferavam em resposta aos peptídeos

sintéticos da Hsp70 de *C. gattii* apresentados pelas DCs, tinham fenótipo de células T reguladoras (Tregs). E nossos resultados mostraram que não houve diferença na expressão de Foxp3 quando os linfócitos T cocultivados com as células dendríticas previamente pulsadas com peptídeos (H18, H21, H26 e *Pool*) foram comparados com linfócitos T cultivados apenas em meio RPMI suplementado com L-Glutamina. Assim, os linfócitos T proliferantes em resposta aos peptídeos supracitados não parecem ser linfócitos T reguladores.

A evasão da resposta imune é apontada como uma estratégia comumente empregada pelos diferentes tipos de fungos, incluindo o gênero *Cryptococcus*. *C. gattii* tem se mostrado capaz de infectar não apenas células pulmonares e neuronais, mas também, células da imunidade inata, entre elas macrófagos e células dendríticas (YKEDA-DANTSUJI et al., 2015; HUSTON et al., 2013), dois tipos celulares que são importantes na apresentação de antígenos para linfócitos T.

A apresentação antigênica pelas DCs depende de seus estágios de maturação, portanto, alguma interferência no processo de maturação pode impedir que o agente patogênico seja eficientemente apresentado as células T, resultando na evasão imune. Tem sido relatado que os fatores de virulência do fungo, como a urease de *C. neoformans* possa restringir a imunidade antifúngica por interferir no estágio de maturação das células dendríticas (CHEN et al., 2008; LIN et al., 2008; OSTERHOLZER et al., 2009). A proteína Hsp70 secretada de *Cryptococcus* também tem sido apontada como um fator de virulência (SILVEIRA et al., 2013). No entanto, ao contrário de proteína estrutural, peptídeos H18 e H21 da Hsp70 de *C. gattii* (VGII) parecem induzir maturação das DCs, uma vez que, nossos resultados mostraram que iDC previamente pulsadas com estes peptídeos induziu intensa proliferação de células T autólogas.

A nossa interpretação dos resultados obtidos nesse trabalho que os peptídeos sintéticos H18 e H21 têm o potencial de induzir as células dendríticas imaturas ao seu estágio de maturação, tornando-as capazes de ativar respostas de células T contra *C. gattii*. Além disso, uma vez que as mDCs também induziram a proliferação de células T, é provável que: (i) vias, como apresentação direta do peptídeo por moléculas MHC nas células dendríticas estejam envolvidas na ativação de células T ou que (ii) H18 e H21 tenham a capacidade de competir com peptídeos ligados a moléculas MHC na

superfície de mDCs. Pode-se perguntar que tipo de receptor de membrana se ligaria a estes peptídeos? Apesar de não termos abordado neste estudo as vias alternativas envolvidas nas DCs pulsadas com tais peptídeos, é possível que receptores de tipo *Toll* (*Toll like*), bem como receptor DC-SIGN sejam candidatos em potencial no reconhecimento desses antígenos. De fato, se iDC sofreram o processo de maturação (mDC), vias de sinalização como p38 MAPK, uma via induzida por DC-SIGN envolvida na maturação funcional das células dendríticas pode ter sido ativada (NAKAHARA et al., 2006).

Assim, os resultados dos nossos estudos anteriores sobre a resposta humoral na criptococose e os dados do presente trabalho, reforçam os nossos achados prévios na imunodominância da Hsp70 de *C. gattii* (VGII), e nos levam a estabelecer as bases para futuros testes com os peptídeos sintéticos derivados da Hsp70 de *C. gattii* (H18 e H21) com vistas ao desenvolvimento de imunoterápicos (MARTINS et al., 2013; BRANDÃO et al., 2014). Isso por si só é um importante avanço, dado que em se tratando de micoses sistêmicas, como é o caso da criptococose, pouco se tem avançado no que tange ao desenvolvimento de vacinas (CALDINI et al., 2012).

Tem sido relatado que proteínas Hsps apresentam diversidade funcional (efetora versus reguladora) na geração de resposta imune, dependendo do grau de conservação evolutiva da região ponderada (ASEA et al., 2000; TOBIAN et al., 2004; MOTTA et al., 2007; BORGES et al., 2013). Assim, analisamos se os peptídeos testados eram capazes de induzir as DCs a modificar os níveis de expressão do marcador FoxP3 em população de células T autólogas. Verificamos que células T proliferantes contra os peptídeos H18 e H21 não expressam Foxp3 específico de células T reguladoras. Considerando a relevância das Hsps ao longo da evolução e na homeostase das espécies, podemos levantar a hipótese que peptídeos derivados de Hsp70 de *C. gattii* em indivíduos com criptococose, incluindo H18 e H21, podem interagir com DCs, elicitando a sua maturação e assim, induzir a proliferação de células T Hsp específicas.

Os resultados aqui apresentados são promissores, pois mostraram pela primeira vez que células dendríticas previamente estimuladas com peptídeos sintéticos, H18 e H21, derivados da Hsp70 de *C. gattii* (VGII) induzem, *in vitro*, significativa proliferação de linfócitos T com fenótipo não regulador.

## 6. CONCLUSÕES

- A obtenção de células dendríticas fenotipicamente imaturas e maduras (iDC e mDC) derivadas de monócitos CD14<sup>+</sup> purificados é seguramente alcançada a partir do tratamento com GM-CSF, IL-4 e LPS, respectivamente. Essa diferenciação estável das DCs pode ser confirmada por imunofenotipagem.
- Apesar de ambas, iDC e mDC induzirem proliferação de células T alogênicas, mDC é significativamente mais eficaz na aloproliferação linfocitária.
- Na resposta linfoproliferativa autóloga, ambas, iDC e mDC, são capazes de induzir auto-reatividade. No entanto, o maior índice de estimulação linfocitária é detectado no grupo mDC, inclusive os linfócitos T autólogos pulsados com PHA.
- Os peptídeos sintéticos da Hsp70 de *C. gattii* (VGII) induzem reatividade de células T, sobretudo H18 e H21 que indicam dominância na linfoproliferação autóloga nos grupos iDC e mDC. E a linfoproliferação não é intensificada com o *pool* dos peptídeos H18, H21 e H26.
- A proliferação linfocitária parece não apresentar fenótipo de células T reguladoras (Tregs), uma vez que não houve diferença na expressão de Foxp3.
- Nossos resultados são promissores, reforçando a imunodominância da Hsp70, e alicerçam a prática de futuros testes com os peptídeos H18 e H21 como potenciais antígenos em diagnóstico e (ou) imunoterapias para a criptococose.

## REFERÊNCIAS

ALSPAUGH, J.A.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genet Biol**, v. 25, n. 1, p. 1-14, Out 1998.

ANGKASEKWINAI, P. et al. *Cryptococcus gattii* Infection Dampens Th1 and Th17 Responses by Attenuating Dendritic Cell Function and Pulmonary Chemokine Expression in the Immunocompetent Hosts. **American Society for Microbiology**, v. 82, n. 9, P. 3880-3890, Set 2014.

ASEA, A. et al. Hsp70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nat Med**. V.6, p. 435-42, 2000.

BANCHEREAU J.; STEINMAN R.M. Dendritic cell and control immunity. **Nature**, v. 392, n.6673, p. 245-252, Mar 1998.

BARCHIESI, F. et al. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. **J Infect**. v. 51, n. 1, p. 10-6, 2005.

BARTLETT, K.H.; CHENG P.Y.; DUNCAN C. et al. A Decade of Experience: *Cryptococcus gattii* in British Columbia. **Mycopathologia**, Sep 2011.

BIVANCO, F.C.; MACHADO C.D.S.; MARTINS E.L. Criptococose cutânea. **Arq. Méd. ABC**, v. 31, n. 2, p. 102-9, 2006.

BORGES T.J.; PORTO B.N.; TEIXEIRA C.A. et al. Prolonged Survival of Allografts Induced by Mycobacterial Hsp70 Is Dependent on CD4+CD25+Regulatory T Cells. **PloS One**, v. 5, n. 12, p. e14264, 2010.

BORGES, T. J. et al. Extracellular Hsp70 inhibits pro-inflammatory cytokine production by IL-10 driven down-regulation of C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$ . **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 5, p. 1-9, Jun 2013.

BOVERS, M. et al. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. **Fungal Genet Biol**, v.45, n.4, p.400-21, 2008.

BRANDÃO, R. M. S. S. et al. Immunoreactivity of synthetic peptides derived from proteins of *Cryptococcus gattii*. **Future Microbiology**, V. 9, n. 7, p. 871-878, 2014.

BRATTON, E.W. et al. Approaches to Antifungal Therapies and Their Effectiveness among Patients with Cryptococcosis. **American Society for Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 2485-2495, 2013.



BRUMMER, E.; STEVENS D. A. Anticryptococcal activity of macrophages: role of mouse strain, C5, contact, phagocytosis, and L-arginine. **Cell Immunol**, v.157, n.1, p.1-10, Aug 1994.

BYRNES, E.J. 3rd; MARR K.A. The Outbreak of *Cryptococcus gattii* in Western North America: Epidemiology and Clinical Issues. **Curr Infect Dis Rep**.v. 13, p. 256-261, 2011.

BYRNES, E.J., 3rd; *et al.* Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, v.6, n.4, p.e1000850, 2010.

CALDINI, C.P. *et al.* Synthetic peptides mimic gp75 from *Paracoccidioides brasiliensis* in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**. v.174, n.1, p. 1-10, 2012.

CALVO, B.M. *et al.* Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic arytotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brasil, Chile, and Venezuela. **J Clin Microbiol**. V. 39, n. 2, p. 348-50, 2001.

CARRICONDE, F. *et al.* Clonality and Alpha-a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population-an emerging outbreak in Australia. **PloS One**, v. 6, n. 2, p. e16936, 2011.

CASADEVALL, A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? **J Clin Invest**, v.120, n. 5, p. 1389-92, 2010.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R.. *Cryptococcus neoformans*. Washington: **ASM Press**, p. 595, 2011.

CAUX, C. *et al.* GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. **Nature**. v. 360, n. 6401, p. 258-61, 1992.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A.L.; NOSANCHUK, J.D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**. V. 3, n. 4, p. 354-8, Aug 2000.

CAVALCANTI, M.A.S. Criptococose e seu agente no Meio-Norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil. 1998. Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) e Universidade Federal do Piauí, Teresina, 154pp.

CHANG, Y.C. *et al.* Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 4985-95, 2004.

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

CHATURVEDI, V. *et al.* Molecular genetic analyses of mating pheromones reveal intervariety mating or hybridization in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**. v. 70, n. 9, p. 5225-35, 2002.

CHATURVEDI, V; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends Microbiology**. v. 19, n.11, p.564-71, 2011.

CHEN, O.S.; KAPLAN, J. CCC1 suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. **J Biol Chem**. v.275, n. 11, p. 7626-7632, 2000.

CHEN G.H. *et al.* Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in host defense against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection during murine allergic bronchopulmonary mycosis. **Am. J. Pathol**. v. 170, n. 3, p. 1028–1040, 2007.

CHEN G.H, *et al.* Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model. **Infect. Immun**. v.76, n. 6, p. 2379–2391, 2008.

COATES, P. *et al.* Pharmacologic, biologic, and genetic engineering approaches to potentiation of donor-derived dendritic cell tolerogenicity. **Transplantation**. v. 75, n. 9 (Suppl), p. 32S, 2003.

COELHO, C.; BOCCA, A.L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Pathol**. v. 9, p. 219-38, 2014.

COHEN I.R.; YOUNG D.B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. **Immunology Today**, v. 12, n.4, p. 105, 1991.

COLOM, M.F. *et al.* Epidemiological study of cryptococcosis in Spain: first results. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, n. 3, p. 99-104, 2001.

COX, G.M. *et al.* Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v.39, n. 1, p. 166-75, Jan 2001.

DATTA, K. *et al.* Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. **Emerg Infect Dis.**, v. 15, n. 8, p. 1185–1191, Ago 2009.

DE JESUS, M. *et al.* Galactoxylomannans from *Cryptococcus neoformans* varieties *neoformans* and *grubii* are structurally and antigenically variable. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 7, p. 1018-28, Jul 2010.

DE MAIO, A. *et al.* Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. **Cell Stress Chaperones**. v. 17, n. 2, p. 139-43, Mar 2012.

DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten Challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 303-10, Jun 2012.

DETANICO, T. *et al.* Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation. **Clin Exp Immunol**, v. 135, p. 336–342, 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/194/12/5999>>. Acesso em: 02/1/16.

DROMER, F., et al. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post- HAART eras. **AIDS**, v.23, n.1, p. 82-90, Jul 2004.

D'SOUZA, C.A., et al. Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. **MBio**, v.2, n.1, p.e00342-10, 2011.

EASTMAN, A.J. et al. Cryptococcal Heat Shock Protein 70 Homolog Ssa1 Contributes to Pulmonary Expansion of *Cryptococcus neoformans* during the Afferent Phase of the Immune Response by Promoting Macrophage M2 Polarization. **The Journal of Immunology**, v. 194, p. 5999-6010, Mai 2015.

ELENI-KYRIAKI, V. et al. A Circulating Subpopulation of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells as an Independent Prognostic/Predictive Factor in Untreated Non-Small Lung Cancer Patients. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, 659294, 12 pages, Nov 2014.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1642-4, 1990.

ENGELTHALER, D. M., et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. **mBio**, v. 5, p. e01464-14, 2014.

FEDER, M.E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu Rev Physiol**, v. 61, p. 243-82, 1999.

FERNANDES, O. de F. L., et al. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 33, n. 1, jan./fev 2000.

FRASER, J.A., et al. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryot Cell**, v. 2, n.5, p. 1036-45, Oct 2003.

FRASER, J.A., et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v.437, n.7063, p.1360-4, Oct 27 2005.

GALANIS, E. et al. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerg Infect Dis.**, v.16, n. 2, p. 251–257, Fev 2010.

**GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. Med Mycol. v. 39, n.4, p. 353-7, Ago 2001.**

GARCÍA-RODAS, R., et al. Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. **mBio**, v. 5, n. 3, p. e00945-14, 2014.

GHANNOUM, M.A. Potencial role of Phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 1, p. 122-43, 2000.

GOLDMAN, D.L. et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. E66, Mai 2001.

GROLLEAU-JULIUS, A. et al. Effect of aging on bone marrow-derived murine CD11c+CD4-CD8alpha- dendritic cell function. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 61, n. 10, p.1039-1047, 2006.

GUERMONPREZ P. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 621-67, 2002.

GULDEN, E. et al. Heat shock protein 60 induces inflammatory mediators in mouse adipocytes. **FEBS Letters**, v. 582, n.18, p. 2731-6, Ago 2008.

HAMILTON, A.J.; HOLDOM, M.D. Biochemical comparison of the Cu, Zn superoxide dismutases of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Infect Immun**, v. 65, n. 2, p. 488-94, 1997.

HARDISON, S. E., et al. Pulmonary infection with an interferon-gamma-producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection. **Am J Pathol**, v.176, n.2, p.774-85, Feb 2010.

HAWKSWORTH, D.L. et al. The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. **IMA Fungus**. v. 2, n.1, p. 105–112. Jun 2011.

HEITMAN, J. et al. *Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast. **Am Soc Microbiol**, p. 327–357, 2010.

HEITMAN, J. Evolution of eukaryotic microbial pathogens via covert sexual reproduction. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 1, p 86-99, Jun 22 2011.

HOGAN, L.M.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 4, p. 469-88, 1996.

HUSTON S.M.; SHU SHUN L.; STACK D. et al. *Cryptococcus gattii* Is Killed by Dendritic Cells, but Evades Adaptive Immunity by Failing To Induce Dendritic Cell Maturation. **The Journal of Immunology**. v. 191, p.249-261. Jun 2013.

IDNURM, A., et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n.10, p.753-64, Oct 2005.

IGREJA, R.P., et al. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Med Mycol**, v.42, n.3, p.229-38, Jun 2004.  
**in early childhood**. *Pediatrics* 107. 2001.

INABA, K. et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n.5, p. 1849, 1994.

INOHARA, N.; NUÑEZ, G. N. Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 5, p.371, 2003.

JONULEIT, H. et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 9, p. 1213, 2000.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **The Journal of Immunology**, v. 171, n.12, p. 6323, 2003.

KAMPHUIS, S. et al. Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. **The Lancet**, v. 8, n. 366 (9479), p. 50-6, Jun 2005.

KAROS, M. et al. Mating of the *Cryptococcus neoformans* MATalpha locus: presence of mating type-specific mitogen-activated protein kinase cascade homologs. **J Bacteriol**, v. 182, n. 21, p. 6222-7, 2000.

KIDD, S.E., et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 17258-63. 2004.

KIDD, S.E., et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Appl Environ Microbiol.**, v.73, n. 5, p. 1433-1443, Mar 2007.

KOL, A., et al. Heat shock protein (HSP) 60 activates the immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. **J Immunol**. v.164, n. 1, p. 13-7, 2000.

KROCKENBERGER, M.B. et al. Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus gattii* infection: a rat model. **Mycopathologia**, v. 170, n.5, p. 315-30, 2010.

KRONSTAD, J.W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. In: **Nat Rev Microbiol England**, v.9, n.3, p. 193-203, Mar 2011.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts: A Taxonomic Study, **fifth ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands**, p. 1665–1740, 2010.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 574-587, 2006.

LAZÉRA, M.S.; IGREJA, R.P.; WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *Micologia Médica: A luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.89-101, 2004.

LENGELER, K.B. et al. Mating-type of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. **Eukaryot Cell**, v.1, n. 5, p. 704-18, 2002.

LI, S.S.; MODY, C.H. *Cryptococcus*. **Proc Am Thorac Soc**, v.7, n.3, p. 186-96, 2010.

LIN X.; HEITMAN J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69–105, 2006.

**LIN K.L., et al. CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. J. Immunol. v.180, n. 4, p. 2562–2572, 2008.**

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 4, p. 401-16, 2009.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annu Rev Biochem**, v. 55, p. 11151–1191, 1986.

LINDQUIST. S.; CRAIG, E. A. The Heat-Schock Proteins. **Annu Rev Genet**, v. 22, p. 631-677, 1988.

LUCKHEERAM, R.V. et al. CD4+ T cells: differentiation and functions. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 925135, Mar 2012.

LUCKHEERAM, R.V., et al. CD4+ T cells: differentiation and functions. **Clin. Dev. Immunol.** V. 2012, p. 925135, 2012.

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

LWASAKI, A.; KELSALL B. L. Unique functions of CD11b<sup>+</sup>, CD8 alpha<sup>+</sup>, and double-negative peyer`s patch dendritic cells. **J. Immunol.** v. 166, n. 8, p. 4884-90, 2001.

MANICKASINGHAM S. P. *Et al.* The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. **Eur J Immunol.** v. 33, p. 101–7, 2003.

MARTINEZ, L.R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. **J Clin Microbiol**, v.39, n.9, p. 3365-7, Sep 2001.

MARTINS L.M. et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brasil). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 725-730, 2011.

- MARTINS, L.M. et al. Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii*: novel candidate antigens for diagnosis. **Future Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 549-563, 2013.
- MATOS, C. S. et al. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus spp.* in Bahia, Brasil: molecular types and antifungal susceptibilities. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. Jan 26 2012.
- MCCLELLAND, C. et al. Uniqueness of the mating system in *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol**, v.12, n. 5, p. 208-12, 2004.
- MERSHON, K. L., et al. Role of complement in protection against *Cryptococcus gattii* infection. **Infect Immun.**, v.77, n.3, p.1061-70, Mar 2009.
- MEYER, W. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med Mycol**, v. 47, n. 6, p. 561-70, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DST/AIDS. Brasília, 2010.
- MONARI, C. et al. Capsular polysaccharide induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 2129-37, 2008.
- MORA, D.J. et al. Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brasil. **Mycopathologia**. 173 (5-6); 321-7, Jun 2012.
- MORA, D.J. et al. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brasil. **Med Mycol**, v. 48, n. 4, p. 561-9, Jun 2010.
- MORETTI, M. L. et al. Guidelines in cryptococcosis--2008. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 5, p. 524-44, Sep-Oct 2008.
- MORGAN, J. et al. *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004. **Clin Infect Dis**, v.43, n.8, p. 1077-1080, Out 2006.
- MORRIS, P. et al. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. **Nature**, v. 368, n. 6471, p. 551, 1994.
- MOTTA, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation *in vitro*. **Immunology**, v. 121, p. 462-472, 2007.
- NAKAHARAT, MOROI Y, UCHI H, FURUE M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and th1/th2 engagement **J. Dermatol. Sci**. v.42, p. 1-11, 2006.

NEWTON, P.N. et al. A randomized, double-blind, placebo controlled trial of acetazolamide for the treatment of elevated intracranial pressure in cryptococcal meningitis. **Clin. Infect. Dis**, v. 35, p. 769–772, 2002.

NGAMSKULRUNGROJ P., et al. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **mBio**, v. 3, p. e00103-12, 2012.

NIELSEN, K. et al. *Cryptococcus neoformans* (alpha) strains preferentially disseminate to the central nervous systems during coinfection. **Infect Immun**, v.73, n. 8, p. 4922-33, 2005.

NOVERR, M.C. et al. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1538-47, Mar 2003.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J**, n.16, p.2576-2589, 1997.

OKAMOTO, K. et al. *Cryptococcus gattii* genotype VGIIa infection in man, Japan, 2007. **Emerg. Infect Dis**, v.16, n.7, p. 11557-7, 2010.

OKAMOTO, K. et al. *Cryptococcus gattii* genotype VGIIa infection in man, Japan, 2007. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 7, p. 1155-7, 2010.

OLSZEWSKI, M.A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am L Phatol**, v.164, n. 5, p. 1761-71, Mai 2004.

OSTERHOLZER J.J. et al. Accumulation of CD11b+ lung dendritic cells in response to fungal infection results from the CCR2-mediated recruitment and differentiation of ly-6chigh monocytes. **J. Immunol**. v. 183, n. 12, p. 8044-8053, 2009.

O'NEILL, L. A. J. After the Toll rush. **Science** (Washington), v. 303, n. 5663, p. 1481, 2004.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. **J Clin Immunol**, v. 19 n. 1, p.12-25, 1999.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Human dendritic cell subsets in vaccination. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, p. 396-402, 2013.

PAPPALARDO, M.C.; MELHEM, M.S. Cryptococcus: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev Inst med Trop Sao Paulo**, v.45, n. 6, p. 299-305, 2003.

PAPPU, B.P.; ANGKASEKWINAI, P.; DONG, C. Regulatory mechanisms of helper T cell differentiation: new lessons learned from interleukin 17 family cytokines. **Pharmacol Ther**, v. 117, p. 374–384, 2008.

PARK B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/aids. **AIDS**. v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.



PRATES, R. A. et al. Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. *PloS One*, v. 8, n. 1, p. e54387, 2013.

PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 395-404, 2005.

PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res**, v.6, n. 4, p.463-8, Jun 2006.

PERFECT, J.R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clin. Infect. Dis**, v. 50, p. 291–322, 2010.

PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin N Am.**, v.16, n.4, p. 837-874, Dec 2002.

PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. The history of *Cryptococcus* and Cryptococcosis. In: Heitman, J. et al. (eds.) *Cryptococcus*: From Human pathogen to model yeast. Washington: **ASM Press**, p. 17-26, 2010.

PFALLER, M.A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **J Clin Microbiol**. v. 47, n. 1, p. 117-23. Jan 2009.

PFEIFER, J.D. et al. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. **Nature** 1993; v. 361, n. 6410, p. 359, 1993.

PONGSAI, P.; ATAMASIRIKUL, K.; SUNGKANUPARPH, S. The role of serum cryptococcal antigen screening for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV-infected patients with different ranges of CD4 cell counts. **J Infect**, v.60, n.6, p.474-7, Jun 2010.

RAZ, I. et al. -cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. **The Lancet**, 358(9295), p. 1749, 2001.

RIPPON, J.W. Medical Mycology: The pathogenic Fungi and pathogenic Actinomycetes. Philadelphia: **W. B. Saunders**, 3 ed. 1988.

RISTICH, V. et al. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. **Eur J Immunol**, v. 35, n.4, p. 1133, 2005.

RODIG, N. et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8 T cell activation and cytolysis. **Eur. J. Immunol**, v. 33, p. 3117, 2003.

RODRIGUES, M. L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules? **Lipid Insights**, v. 2, p. 27-40, 2008.

RODRIGUES, M.L.; CASADEVALL, A.; ZARAGOZA, O. The architecture and antigenic composition of the polysaccharide capsule. In: Heitman, J. et al. (eds.) *Cryptococcus*: From human pathogen to model yeast. Washington: **ASM Press**, p. 43-54, 2011.

RONQUIST, K.G. et al. Prostate-derived proteins capable of eliciting an immune response in prostate cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 119, n.4, p. 847-53, 2006.

ROSA E SILVA, L.K. et al. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Res Microbiol**. v.159, n. 3, p. 221-9, 2008.

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

RUTELLA, S.; LEMOLI, R. M. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. **Immunol lett**. v. 94, p. 11-26, 2004.

SABIITI, W.; MAY, R.C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology**. v.7, n. 11, p. 1297-1313. 2012.

SAIJO T. et al. Antigranulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **mBio** v.5, n.2, p.e00912–00914, 2014.

SALLUSTO F.; LANZAVECCHIA A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J Exp Med**. v. 179, n. 4, p. 1109-18, 1994.

SANTANGELO, R. et al. Role of extracellular Phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2229-39, 2004.

SANTOS W.R.; MEYER W.; WANKE B. et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Para, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n.8, p. 813-818, 2008.

SANTOS, W. R. et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Para, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.103, n. 8, p. 813-818, 2008.

SAUTER, B. et al. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 3, p. 423, 2000.

SCHOP, J. Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection. **Mcgill. J Med.**, v.10, n.1, p. 35-43, Jan 2007.

SHORTMAN, K.; HEATH, W. R. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. **Nature immunology**, v. 2, n. 11, p. 988, 2001.

SIAFAKAS, A. R. et al. Lipid rafts in *Cryptococcus neoformans* concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 3, p. 488-98, Mar 2006.

SILVEIRA, C.P. et al. The heat shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 53-63, 2013.

SPEED B.; DUNT D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Infect Dis.** 21, 28– 34, 35–26. 1995.

SPRINGER D.J.; CHATURVEDI V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerg Infect Dis.** V. 16, n. 1, p. 14-20, 2010.

STEENBERGEN, J.N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbs Infection**, v. 5, n. 7, p. 666-75, 2003.

STEINMAN, R.M.; SWANSON, J. The endocytic activity of dendritic cells. **J Exp Med**, v. 182, n.2, p. 283, 1995.

STEINMAN, R.M. Dendritic cells: understanding Immunogenicity. **Eur J Immunol.** (Suppl 1), P. s63-60, Nov, 2007.

SUH, W. K. et al. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. **Nature Immunology**, v. 4, n. 9, p. 899, 2003.

SYME, R.M. et al. Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fcγ receptor II for presentation to T lymphocytes. **Infect Immun.**, v. 70, n. 11, p. 5972-81, Nov 2002.

TANAKA, E. et al. Comparisons of the lacase gene among serotypes and melanin-deficient variants of *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol Immunol**, v. 49, n. 3, p. 209-17, 2005.

TANAKA, S. et al. Activation of T cells recognizing an epitope of heat-shock protein 70 can protect against rat adjuvant arthritis. **J Immunol**, v. 163, n. 10, p. 5560-5, Nov 1999.

TOBIAN, A.A.R.; CANADAY, D.H.; HARDING, C.V. Bacterial Heat Shock Proteins Enhance Class II MHC Antigen Processing and Presentation of Chaperoned Peptides to CD4 T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 5130-5137, 2004.

TRILLES, L., et al. Multilocus sequence typing reveals a high genetic diversity among the Brazilian VGII population. In: **8th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis Poster Session** p. 88, 2011.

TRILLES, L., et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.103, n.5, p.455-462, Aug 2008.

TSENG, H.K. et al. How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier. **Future Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 1669-82, 2015.

TUCKER, S.C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, n. 5, p. 3165-70, Mar 2002.

VAN DEN BOSCH, J.S. et al. Lack of difference in growth stimulating effect between weekly single and multiple human chorionic gonadotrophin administration in boys with delayed puberty. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 1982.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 11, p. 3394-400, Nov 2002.

VAN EDEN, W. et al. Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? **Immunology Today**, v. 19, n.7, p. 303, 1998.

VAN EDEN, W. et al. The mycobacterial 65 kD heat-shock protein and autoimmune arthritis. **Rheumatol Int**, v. 9, n. (3-5), p. 187, 1989.

VECCHIARELLI A. et al. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. **J Leukoc Biol**, v. 74, n. 3, p. 370-8, 2003.

VECCHIARELLI, A. et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1107-16, 2013.

VELAGAPUDI, R. et al. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v.77, n. 10, p. 4345-55, Oct 2009.

VIEIRA P. L. et al. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. **J Immunol**. v. 164, n. 9, p. 4507-12, 2000.

VINEY J.L. Immune fate decided by dendritic cell provocateurs. **Trends Immunol**. v. 22, n.1, p. 8-10, 2001.

VREMEC, D.; SHORTMAN, K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 2, p. 565, 1997.

WALLET M.A.; SEN P.; TISCH R. Immunoregulation of dendritic cells. **Clin Med Res.** V. 3, n. 3, p. 166-75, 2005.

WILLIAMSON, P.K.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol.** v. 180, n. 6, p. 1570-2, Mar 1998.

WOZNIAK, K. L.; OLSZEWSKI, M. A.; WORMLEY Jr., F. L. Molecules at the interface of *Cryptococcus* and the host that determine disease susceptibility. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 87–92, 2015.

WOZNIAK, K.L., et al. Role of IL-17A on resolution of pulmonary *C. neoformans* infection. **PLoS ONE**, v. 6,p.e17204, 2011.

YANG K., L. I. D.; LUO, M.; HU, Y. Generation of HSP60-specific regulatory T cell and effect on atherosclerosis. **Cellular immunology**, v. 243, n. 2, p. 90, 2006.

**YKEDA-DANTSUJI Y., et al. Interferon- $\gamma$  promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. Infect Chemother. V. 21, n. 2, p. 831-6, 2015.**

YVES LÉVY et al. Dendritic cell-based therapeutic vaccine elicits polyfunctional HIV-specific T-cell immunity associated with control of viral load. **Eur. J. Immunol.**, v. 44, p. 2802-2810, 2014.

ZARAGOZA, O et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cell Microbiol**, v.10, n. 10, p. 2043-57, Out 2008.

ZARAGOZA, O. et al. Effect of amphotericin B on capsule and size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 10, p. 4358-61, 2005.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*, **Biol Proced Online**, v. 6, p. 6-10, Mar 2004.

## ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PIAÚÍ - UFPI



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Papel das células dendríticas no direcionamento funcional da resposta celular a peptídeos sintéticos derivados das proteínas "housekeeping" Sks2 e CGNB de *Cryptococcus gattii*.

**Pesquisador:** ADALBERTO SOCORRO DA SILVA

**Área Temática:**

**Versão:**

**CAAE:** 31224813.5.0000.5214

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Piauí - UFPI

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
Universidade Federal do Piauí - UFPI

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 826.733

**Data da Relatoria:** 25/09/2014

#### Apresentação do Projeto:

O presente trabalho consistirá na análise do direcionamento funcional da resposta de células T a peptídeos sintéticos derivados das proteínas housekeeping Sks2 e CGNB de *Cryptococcus gattii*, no contexto da apresentação por células dendríticas humanas, in vitro. Serão isoladas células mononucleares a partir do sangue de indivíduos adultos saudáveis, obtidas do descarte de 30 bolsas de sangue usadas como controle de qualidade no Hemocentro de Teresina, após prévio consentimento do diretor da instituição.

#### Objetivo da Pesquisa:

Analisar o direcionamento funcional da resposta de células T a peptídeos sintéticos derivados das proteínas "housekeeping" Sks2 e CGNB de *Cryptococcus gattii*, no contexto da apresentação por células dendríticas humanas, in vitro.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A execução da pesquisa envolve risco médio por envolver bolsas de sangue do controle de qualidade do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Teresina-PI.

Acreditamos que a realização desse estudo venha proporcionar novos mecanismos para o entendimento da resposta imunológica patógeno primário, infectando hospedeiros HIV-negativos

**Endereço:** Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa

**Bairro:** Ininga

**CEP:** 64.049-550

**UF:** PI

**Município:** TERESINA

**Telefone:** (86)3237-2332

**Fax:** (86)3237-2332

**E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br





UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PIAUÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 826.733

e sem qualquer evidência de imunodepressão, de ambos os gêneros masculino e feminino. será de fundamental importância para o desenvolvimento de uma vacina protetora contra a criptococose potencializando a nossa biotecnologia e revelando novos alvos para o desenvolvimento de fármacos. Dessa forma, além da contribuição ao conhecimento científico, estamos confiantes na formação de uma nova geração de pesquisadores e profissionais de saúde que vão a busca de tratamentos resolutivos

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa tem como desfecho: uma vacina protetora contra a criptococose potencializando a nossa biotecnologia e revelando novos alvos para o desenvolvimento de fármacos. Dessa forma, além da contribuição ao conhecimento científico, estamos confiantes na formação de uma nova geração de pesquisadores e profissionais de saúde que vão a busca de tratamentos resolutivos. Em matéria de risco, considerando que serão utilizadas bolsas de sangue descartadas, não há que se falar em risco para o participante. Eventual risco da pesquisa será assumido pelo próprio pesquisador, no ato do manuseio das mencionadas bolsas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados os termos de autorização da Direção do Hospital para utilização do Material Banco de Sangue. O presente trabalho utilizará bolsas de sangue do controle de qualidade do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Teresina-PI, após autorização da direção da referida instituição e assinatura do Termo de Fiel Depositário. Não haverá retenção de amostras.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Protocolo apto para aprovação.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Sr.(a) Pesquisador(a),

**Endereço:** Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa

**Bairro:** Ininga **CEP:** 64.049-550

**UF:** PI **Município:** TERESINA

**Telefone:** (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PIAÚÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 826.733

em cumprimento ao previsto na Resolução 466/12, o CEP-UFPI SEDE aguarda o envio dos relatórios parciais e final da pesquisa, elaborados pelo pesquisador, bem como informações sobre sua eventual interrupção e sobre ocorrência de eventos adversos.

Ainda, para assegurar o direito do participante e preservar o pesquisador, revela-se importante alertar que o TCLE e o Termo de Assentimento deverão ser rubricados em todas as suas folhas, tanto pelo participante quanto pelo(s) pesquisador(es), devendo ser assinados na última folha.

TERESINA, 09 de Outubro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Adrianna de Alencar Setubal Santos**  
**(Coordenador)**

*Profª Adrianna de Alencar Setubal Santos*  
Coordenadora CEP-UFPI  
Portaria Propeq N° 16/2014

**Endereço:** Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa  
**Bairro:** Ininga **CEP:** 64.049-550  
**UF:** PI **Município:** TERESINA  
**Telefone:** (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br