

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Roberta Pereira Soares Emrich

Efeito da suplementação de glicose em células epiteliais brônquicas humanas infectadas
com *Cryptococcus neoformans*

Uberaba

2024

Roberta Pereira Soares Emrich

Efeito da suplementação de glicose em células epiteliais brônquicas humanas infectadas
com *Cryptococcus neoformans*

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração I Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de doutorado.

Orientador: Prof^o. Dr. Alexandre de Paula Rogério

Uberaba

2024

Catálogo na fonte:
Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

E46e Emrich, Roberta Pereira Soares
Efeito da suplementação de glicose em células epiteliais brônquicas humanas infectadas com *Cryptococcus neoformans* / Roberta Pereira Soares Emrich. -- 2025.
21 p. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024
Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogério

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Sistema respiratório. 3. Glucose. 4. Células epiteliais. I. Rogério, Alexandre de Paula. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 582.28

Roberta Pereira Soares Emrich

Efeito da suplementação de glicose em células epiteliais brônquicas humanas infectadas
com *Cryptococcus neoformans*

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração I Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de doutorado.

Orientador: Prof^o. Dr. Alexandre de Paula Rogerio

Uberaba, 29 de novembro de 2024

Banca Examinadora

Dr. ALEXANDRE DE PAULA ROGERIO – Orientador
UFTM

Dr. DAVID NASCIMENTO SILVA TEIXEIRA
UFTM

Dr. REGINALDO DOS SANTOS PEDROSO
UFU

Dra. MARIA EMÍLIA SOARES MARTINS DOS SANTOS
UFTM

Dr. DÉLIO JOSÉ MORA
UFSB

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a toda minha família pela base sólida a mim concedida, a qual foi essencial para a finalização de todas as etapas dos meus estudos, sem eles nada disso seria possível, ao meu orientador Prof. Drº Alexandre de Paula Rogerio sou extremamente grata pela oportunidade de desenvolver uma pesquisa científica, terminando mais uma etapa acadêmica, levando comigo para a vida, uma “bagagem” muito importante. À querida Elisabete Perez, ex-secretária do programa, que nunca mediu esforços para ajudar no que fosse preciso em toda minha trajetória, à técnica do laboratório de imunofarmacologia experimental, Renata e ao professor David, que foram presentes no meu dia a dia, sempre esclarecendo dúvidas que surgiam de forma muito atenciosa e solícita. À colega de pós-graduação Wanessa, que ajudou em todas as etapas no desenvolvimento do projeto e também ao técnico administrativo, Leonardo, por todo suporte e apoio nos experimentos, que envolveram a micologia. Às agências de fomento brasileira CAPES e FAPEMIG pelo auxílio recebido para desenvolver o projeto.

RESUMO

O diabetes pode ser um fator de risco para meningite criptocócica em indivíduos imunocompetentes. Um modelo frequentemente usado para entender as alterações celulares no diabetes consiste na exposição a altas concentrações de glicose *in vitro*. Nas vias aéreas, as células epiteliais são cruciais para o estabelecimento da criptococose. Foram avaliados os efeitos da combinação de *Cryptococcus neoformans* e concentrações de glicose (5mM ou 15mM) em células epiteliais brônquicas humanas (BEAS-2B) por 24h. Em ensaios de azul de tripan, nenhum efeito citotóxico foi observado em células estimuladas por *C. neoformans* e/ou tratadas com suplementação de glicose. *C. neoformans* aumentou a produção de IL-6 e IL-8, mas não de IL-10, quando comparado ao grupo controle. Em contraste com o aumento da produção de IL-6 e a ativação de STAT3 diretamente proporcional ao aumento da dose de glicose, a produção de IL-8 e a ativação de ERK1/2 diminuíram nos tratamentos com *C. neoformans* suplementados com glicose, 5mM ou 15mM, quando comparados com o tratamento que continha apenas *C. neoformans*. Além disso, a suplementação de glicose aumentou a internalização de *C. neoformans* nas células BEAS-2B, e reduziu a porcentagem de *C. neoformans* na superfície e seu crescimento. A suplementação de glicose promoveu respostas pró-inflamatórias em células epiteliais brônquicas infectadas com *C. neoformans* pelo aumento da produção de IL-6 e da ativação de phospho-STAT3, e diminuição da produção de IL-8 e da fosforilação de ERK1/2. A IL-6 é crucial para controlar a resposta proteica de fase aguda das inflamações e aumenta, notavelmente, o nível de p-STAT3, que pode estar envolvido na regulação da inflamação celular.

Palavras-chave: células epiteliais brônquicas; *C.neoformans*; glicose, BEAS-2B

ABSTRACT

Hyperglycemia may be a risk factor for cryptococcal meningitis in immunocompetent individuals. A model frequently used to understand cellular changes in diabetes consists of exposure to high glucose concentrations in vitro. In the airways, epithelial cells are crucial for the establishment of cryptococcosis. The effects of the combination of *Cryptococcus neoformans* and glucose concentrations (5 mM or 15 mM) on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) for 24 h were evaluated. In trypan blue assays, no cytotoxic effects were observed in cells stimulated by *C. neoformans* and/or treated with glucose supplementation. *C. neoformans* increased the production of IL-6 and IL-8, but not IL-10, when compared to the control group. In contrast to the increased IL-6 production and STAT3 activation directly proportional to the increase in glucose dose, IL-8 production and ERK1/2 activation were decreased in *C. neoformans* treatments supplemented with 5 mM or 15 mM glucose when compared with the treatment containing only *C. neoformans*. Furthermore, glucose supplementation increased the internalization of *C. neoformans* into BEAS-2B cells, and reduced the percentage of *C. neoformans* on the surface and its growth. Glucose supplementation promoted pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells infected with *C. neoformans* by increasing IL-6 production and phospho-STAT3 activation, and decreasing IL-8 production and ERK1/2 phosphorylation. IL-6 is crucial for controlling the acute phase protein response of inflammation and notably increases the level of p-STAT3, which may be involved in the regulation of cellular inflammation.

Keywords: bronchial epithelial cells; *C. neoformans*; glucose; BEAS-2B

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: American Type Culture Collection

ANOVA: Análise de Variância

CO₂: Dióxido de Carbono

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium F12

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

ERK1/2: Sinalização extracelular regulada por quinase 1/2

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FPR: Receptores de peptídeos formilados

Ig1: Imunoglobulina G

IL: Interleucina

MOI: Multiplicidade de infecção

MTT: brometo de 3-[4,5- dimetil-tiazol- 2-il]- 2,5-difeniltetrazólio

NF-κB: Fator de transcrição NF-kappa B

OMS: Organização Mundial da Saúde

STAT: proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	JUSTIFICATIVA	12
3	OBJETIVOS	13
3.1	OBJETIVOS GERAIS	13
4	METODOLOGIA	13
4.1	CÉLULAS EPITELIAIS BRÔNQUICAS	13
4.2	<i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	13
4.3	ESTIMULAÇÃO	14
4.4	ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO CELULAR (UFC)	14
4.5	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR MTT	14
4.6	ENSAIO DE EXCLUSÃO DE AZUL DE TRIPAN	15
4.7	PRODUÇÃO DE IL-6, IL-8 E IL-10	15
4.8	EXPRESSÃO DE NF-κB, ERK1/2 E STAT3	16
4.9	FAGOCITOSE <i>IN VITRO</i>	16
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
5	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	17
	APÊNDICE A - COMPROVANTE SUBMISSÃO ARTIGO	20
	APÊNDICE B - PARTICIPAÇÃO DOS CO-AUTORES NO ARTIGO	21

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, *Cryptococcus neoformans* foi classificado como um patógeno prioritário no final do século XIX. Ele tem a capacidade de causar criptococose em humanos e animais, que tem como principais manifestações a pneumonia e a meningite, sendo estas as mais graves (NYAZIKA et al., 2016; RAJASINGHAM et al., 2017).

Globalmente, há, aproximadamente, 250.000 casos relatados de meningite criptocócica a cada ano, levando a uma estimativa de 181.000 mortes. Sem tratamento, a taxa de mortalidade para esta infecção chega a 100% (IYER et al., 2021). *C. neoformans* é um patógeno que afeta significativamente o sistema nervoso central humano, causando morbidade e mortalidade substanciais (FRANCIS et al., 2024) (GIBSON et al., 2022; KIM et al., 2021; WOO; MARTINEZ, 2021). A meningite criptocócica é responsável por 15% das mortes relacionadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e é mais prevalente entre indivíduos que vivem com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LI; BRUNO; KIM, 2021; RATEMO; DENNING, 2023).

Após a inalação do fungo, os esporos e partículas infecciosas enfrentam uma camada de macrófagos alveolares do pulmão, que constitui a primeira linha de defesa deste órgão. *C. neoformans* pode sobreviver no pulmão e escapar da resposta imunológica neste órgão, que possui uma função imunológica especializada. Os alvéolos são cobertos por uma camada de macrófagos alveolares, que são responsáveis pela fagocitose e eliminação de patógenos. O pulmão também contém o surfactante, cuja principal função é manter a tensão superficial da pleura durante o processo respiratório (DIAMOND; BENNETT, 1973; TUCKER; CASADEVALL, 2002). Os pulmões possuem tecido parenquimatoso, com células alveolares e sem lúmen interno. As células epiteliais brônquicas formam uma camada de revestimento nos brônquios, desempenhando um papel crucial na proteção das vias respiratórias.

Uma infecção pulmonar robusta, geralmente, leva à infecção do sistema nervoso central (SNC) após a transmissão das células infectantes do pulmão para o sangue ou sistema linfático. *C. neoformans* desenvolve-se tanto extracelularmente quanto dentro dos fagócitos do hospedeiro do tecido pulmonar e do sangue, com este último facilitando a disseminação para o cérebro (CHARLIER et al., 2009; KAUFMAN-FRANCIS et al., 2018).

O estado hiperglicêmico é resultante de alterações na ação da insulina, com sintomas como polidipsia, perda de peso, poliúria, polifagia devido a complicações agudas, e pode ser mortal (FADINI; DIPERSIO, 2018). Os danos pulmonares decorrentes da diabetes, causando danos fisiológicos e estruturais (MARK R. SCHUYLER et al., 1976), que podem aumentar o risco ou agravar várias doenças pulmonares, como asma, DPOC, fibrose pulmonar e pneumonia (EHRlich et al., 2010; ENOMOTO et al., 2003). A hiperglicemia persistente pode causar deficiências na imunidade inata e adaptativa e pode aumentar a suscetibilidade a infecções fúngicas invasivas, como mucormicose, candidíase, coccidioidomicose e criptococose (PELEG et al., 2007).

Pacientes, com diabetes descontrolada, apresentam hiperglicemia, condição que pode causar direta ou indiretamente muitas complicações no coração, rins e pulmões (GUILLOT et al., 2008). A relação entre inflamação e hiperglicemia é amplamente estudada. A hiperglicemia pode levar a processos inflamatórios (BEARHAM et al., 2019; KAMONKHANTIKUL; ARKSORNNUKIT; TAKAHASHI, 2017), além de alterações nas propriedades funcionais das células do sistema imunológico, reprogramando-as com a expressão de genes de diferentes perfis, por meio de alteração epigenética (YU et al., 2012).

Nesse estudo, foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações de glicose na associação entre *C. neoformans* e células epiteliais brônquicas humanas na modulação da resposta. Para esta avaliação foram utilizados indicadores como produção de IL-6, IL-8, IL-10 e expressão de NF- κ B, ERK1/2, STAT3. A interleucina-6 (IL-6) é uma potente citocina inflamatória, com atividade redundante e pleiotrópica que medeia uma série de funções fisiológicas, incluindo diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de aumentar os sinais apoptóticos (KAMIMURA; ISHIHARA; HIRANO, 2003).

A interleucina 8 (IL-8) foi uma das primeiras quimiocinas descobertas e foi inicialmente identificada como um fator quimiotático secretado por monócitos e macrófagos ativos que promovem a migração coordenada e direcional de células do sistema imunológico como neutrófilos, basófilos e linfócitos T (BAGGIOLINI; WALZ; KUNKEL, 1989).

A interleucina (IL)-10 é a citocina mais importante com propriedades anti inflamatórias. É produzida por células imunes ativadas e atua por meio de um complexo receptor transmembrana, que é composto por IL-10R1 e IL-10R2, e regula as funções de muitas células imunológicas diferentes. Nos monócitos/macrófagos, a IL-10 diminui a

produção de mediadores inflamatórios e inibe a apresentação de antígenos, embora aumente a captação destes (SABAT et al., 2010).

O NF- κ B é crucial para o funcionamento adequado do sistema imunológico em todos os estágios, desde o desenvolvimento de tecidos linfoides primários e secundários, passando pela hematopoiese, até o reconhecimento de Padrões Moleculares Associados ao Perigo (DAMPs) ou Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e regulação de mecanismos efetores de células imunológicas (HAYDEN; GHOSH, 2011). ERK1/2, um membro da família da proteína quinase ativada por mitógeno, desempenha um papel importante na regulação da proliferação celular, no processo de autofagia e na síntese de proteínas (KHEZRI et al., 2023).

STAT3 regula uma diversidade de processos celulares, pois promove a transcrição de genes relacionados à sobrevivência e crescimento celular, angiogênese, bem como pró-apoptótica. Também induz a expressão do Supressor de Sinalização de Citocinas, reguladores negativos que impedem a ativação prolongada de STAT3 em organismos saudáveis. Além disso, o STAT3 é necessário para manter a propagação e a pluripotência de células-tronco embrionárias e neurais normais, demonstrando sua relação com a manutenção de células-tronco (CARPENTER; LO, 2014).

Portanto, a epigenética é fator preponderante tanto na ativação de indicadores celulares pró-inflamatórios quanto na atuação na resolução dessas inflamações pelo organismo. Desta maneira, os estímulos ambientais e alimentares influenciam diretamente no bom funcionamento do organismo.

2 JUSTIFICATIVA

O fungo *C. neoformans* é uma das mais sérias preocupações na área da saúde podendo causar doenças com significativas taxas de morbidade e mortalidade. Os pacientes hiperglicêmicos são vulneráveis a diversas infecções (CUNHA et al., 2023; MOSMANN, 1983), uma vez que a hiperglicemia causa quimiotaxia granulocitária, fagocitose e deficiência mediada por células da imunidade, o que pode aumentar a suscetibilidade às infecções fúngicas invasivas, como mucormicose, candidíase, coccidioidomicose e criptococose (PELEG et al., 2007). O papel da hiperglicemia, ou diabetes, na infecção criptocócica, ainda, não foi bem caracterizado e não há estudos sobre a influência desse desequilíbrio nas células epiteliais das vias aéreas, estimuladas por *C. neoformans*.

Desta maneira, neste estudo, busca-se uma melhor compreensão do comportamento *in vitro* de *C.neoformans* frente a suplementação de glicose em células do epitélio brônquico BEAS-2B, analisando mediadores químicos, vias de sinalização pró e anti-inflamatórias e a internalização deste patógeno.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Investigar o efeito da suplementação de glicose em células epiteliais brônquicas humanas (BEAS-2B) infectadas com *C.neoformans*.

3.2 Objetivos específicos

Após a suplementação com glicose em células previamente infectadas com *C.neoformans* ou não, avaliaram-se os seguintes parâmetros:

- a) A produção de IL-6, IL-8 e IL-10;
- b) A expressão de NF- κ B, ERK1/2 e STAT3;
- c) A porcentagem de viabilidade e a porcentagem de ativação das células BEAS-2B estimuladas ou não com *C. neoformans* e/ou glicose nas concentrações 5 e 15 mM;
- d) Determinação dos níveis de internalização de *C. neoformans* durante a interação com células BEAS-2B.

4 METODOLOGIA

4.1 Células Epiteliais Brônquicas

A linhagem celular epitelial brônquica humana (BEAS-2B; ATCC, Rockville, MD) foi doado pelo Dr. Bruce D. Levy da Harvard Medical School/Brigham and Women's Hospital e foi cultivada em meio Dulbecco's Eagle modificado (DMEM-F12; GibcoLife Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies) e penicilina 1% + estreptomicina (Gibco-Life Technologies) e incubado a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

4.2 *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans sorotipo A, H99 (ATCC MYA-4564) foi utilizada em todos os experimentos. Sabouraud ágar dextrose (BD Biosciences) foi o meio para crescimento e

manutenção de *C. neoformans*. Uma suspensão de colônias em caldo *Sabouraud* dextrose (BD Biosciences) foi preparada e cultivada até o início da fase estacionária (48 h) em temperatura de 37°C para estimulação celular. As células foram estimuladas com multiplicidade de infecção (MOI) (KAMIMURA; ISHIHARA; HIRANO, 2003).

4.3 Estimulação

A estimulação de células BEAS-2B com *C. neoformans* tem como objetivo investigar a resposta imunológica e a interação entre o fungo patogênico e as células do hospedeiro. Essa avaliação permite que seja observado como as células epiteliais respondem à infecção, incluindo a produção de citocinas e outras moléculas sinalizadoras que podem influenciar a resposta imunológica.

As células BEAS-2B (1×10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços e estimuladas com *C. neoformans* (MOI 100) por 24 horas (BAGGIOLINI; WALZ; KUNKEL, 1989). Foi adicionada a concentração de 5mM (considerada normoglicemia nas células), ou 15 mM (considerada hiperglicemia nas células) (SABAT et al., 2010), uma vez que o sangue/interstício apresenta 5–6 mM.

4.4 Ensaio de quantificação celular (UFC)

O ensaio de UFC foi modificado de um estudo anterior. *C. neoformans* (MOI 100) foram cultivados em placas de 96 poços e suplementados ou não com glicose, em concentrações de glicose adicionadas altas (15mM) e baixas (5mM), na presença e ausência de células BEAS-2B por 24 h a 37°C. Após esse período o sobrenadante foi triplamente diluído com solução salina 0,9% e semeado em ágar *Sabouraud* dextrose a 37°C por 48 horas. Após 48 horas, o número de colônias nas placas de ágar foi contado (KAMONKHANTIKUL; ARKSORNNUKIT; TAKAHASHI, 2017).

4.5 Ensaio de Viabilidade Celular MTT

O ensaio de viabilidade celular MTT é uma técnica amplamente utilizada para avaliar a viabilidade e a proliferação celular em culturas celulares. O método baseia-se na capacidade das células viáveis de reduzir o sal de tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) a um formazano roxo, que é insolúvel em água. O ensaio pode ser realizado por meio da redução do MTT, onde as células metabolizam o MTT, transformando-o em um cristais de formazano roxo. Esse processo ocorre principalmente nas mitocôndrias das células viáveis, e pela quantificação, onde a quantidade de

formazano gerado é proporcional ao número de células viáveis, e pode ser quantificada através de espectrofotometria.

Foi utilizado o ensaio celular baseado em tetrazólio de maneira a avaliar a viabilidade celular de células BEAS-2B estimuladas ou não com *C. neoformans* e suplementado ou não com glicose (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011).

4.6 Ensaio de Exclusão de Azul de Tripán

O ensaio de exclusão de azul de tripano é uma técnica simples e eficaz utilizada para avaliar a viabilidade celular, especialmente em culturas celulares. O método baseia-se na propriedade do azul de tripano, um corante vital, de penetrar apenas em células não viáveis, permitindo a distinção entre células vivas e mortas.

O azul de tripano é um corante que é excluído pelas células viáveis, pois suas membranas celulares intactas não permitem a passagem do corante. Em contrapartida, células mortas ou danificadas, que têm membranas comprometidas, absorvem o corante e ficam coloridas. Este ensaio foi usado para distinguir entre células vivas (não coradas) e mortas (coradas) (KHEZRI et al., 2023).

4.7 Produção de IL-6, IL-8 e IL-10

Os ensaios das concentrações de interleucinas, como IL-6, IL-8 e IL-10, são fundamentais em pesquisas e diagnósticos clínicos, especialmente em contextos relacionados a inflamação, resposta imune e doenças.

A avaliação do IL-6 permite a marcação de inflamação pois a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel crucial na resposta inflamatória aguda. Níveis elevados de IL-6 podem indicar a presença de inflamação ou infecção. É frequentemente utilizada como um biomarcador em doenças autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, onde a inflamação crônica é um componente chave. Elevados níveis de IL-6 podem estar associados a piores prognósticos em várias condições, incluindo câncer e doenças cardiovasculares.

A avaliação de IL-8 é uma quimiocina que atrai neutrófilos para o local da inflamação. É um importante mediador na resposta imune inata. Níveis elevados de IL-8 podem indicar infecções bacterianas ou virais, e são usados para monitorar a gravidade de infecções e inflamações. Em doenças respiratórias, como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), a IL-8 está envolvida na recrutação de células inflamatórias.

Para se avaliar a IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. É fundamental para o equilíbrio entre a resposta imune efetiva e a prevenção da inflamação excessiva, que pode levar a danos nos tecidos. Em contextos de tratamento, como em terapias para câncer ou infecções, a IL-10 pode ser um alvo ou um biomarcador para avaliar a eficácia do tratamento.

As concentrações de IL-6, IL-8 e IL-10 foram medidas por ensaios imunoenzimáticos (Elisa) de acordo com as instruções do fabricante (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA).

4.8 Expressão de NF- κ B, ERK1/2 e STAT3

As vias NF- κ B, ERK1/2 e STAT3 foram avaliadas por citometria de fluxo de acordo com (CARPENTER; LO, 2014). Após 24h da estimulação com *C. neoformans*, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (BD Cytotfix Buffer) e, depois, lavadas e permeabilizadas em Perm/Wash Buffer gelado (BD Biosciences). As células foram incubadas com anticorpos contra fosfo-STAT3, fosfoERK1/2 e fosfo-NF- κ B (BD Biosciences) diluídos em metanol frio durante 60 min a 10°C no escuro.

Estas células foram então incubadas com IgG1 anti-camundongo conjugado com PE ou Alexa Fluor 488- conjugado anti-IgG2b de camundongo por mais 60 min a 10°C no escuro. O mesmo protocolo foi realizado com o respectivo controle de isotipo. A expressão de fosfo-STAT3, fosfo-NF- κ B e fosfo-ERK1/2 foi medida em 50.000 eventos (células) usando um citômetro de fluxo FACSCalibur. Os resultados foram expressos por porcentagens de células positivas para de fosfo-STAT3, fosfo-NF- κ B e fosfo-ERK1/2.

4.9 Fagocitose *in vitro*

Foram determinados os níveis de internalização de *C. neoformans* durante a interação com células BEAS-2B (LIEW et al., 2016). Resumidamente, as células de levedura foram marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 0,1 mg/mL, mantidas no escuro e em temperatura ambiente por 30 minutos. Após estimulação com as células fúngicas, as células BEAS-2B foram extensivamente lavadas com PBS para remover fungos não aderentes.

Os complexos fungo-célula hospedeira foram tratados durante 10 min a 25°C com azul de tripan (200 μ g/mL), que é um agente extintor de fluorescência derivada de FITC e, uma vez que não consegue atingir o compartimento intracelular de células

viáveis, este corante é útil para discriminar *C. neoformans* intracelular e associado à superfície, extinguindo a fluorescência de células não internalizadas. O azul de tripan não ligado foi removido por lavagem com PBS e depois os complexos foram analisados por citometria de fluxo.

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Uma avaliação dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey utilizando GraphPad PRISM (Versão 6.0; Graph Pad Software Inc) usando análise de variância (ANOVA). Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativo.

5 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin 8, a Novel Cytokine That Activates Neutrophils. **The American Society for Clinical Investigation**, v. 84, p. 1045–1049, out. 1989.

BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 11–22, jan. 2011.

BEARHAM, J. et al. Effective glucose metabolism maintains low intracellular glucose in airway epithelial cells after exposure to hyperglycemia. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 317, n. 5, p. C983–C992, 1 nov. 2019.

CARPENTER, R.; LO, H.-W. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. **Cancers**, v. 6, n. 2, p. 897–925, 16 abr. 2014.

CHARLIER, C. et al. Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 120–127, jan. 2009.

CUNHA, M. M. et al. Effects of combination of *Cryptococcus gattii* and IFN- γ , IL-4 or IL-27 on human bronchial epithelial cells. **Immunobiology**, v. 228, n. 1, p. 152312, jan. 2023.

DIAMOND, R. D.; BENNETT, J. E. Growth of *Cryptococcus neoformans* Within Human Macrophages *In Vitro*. **Infection and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 231–236, fev. 1973.

EHRlich, S. F. et al. Patients Diagnosed With Diabetes Are at Increased Risk for Asthma, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Pulmonary Fibrosis, and Pneumonia but Not Lung Cancer. **Diabetes Care**, v. 33, n. 1, p. 55–60, 1 jan. 2010.

ENOMOTO, T. et al. Diabetes Mellitus May Increase Risk for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Chest**, v. 123, n. 6, p. 2007–2011, jun. 2003.

FADINI, G. P.; DIPERSIO, J. F. Diabetes mellitus as a poor mobilizer condition. **Blood Reviews**, v. 32, n. 3, p. 184–191, maio 2018.

FRANCIS, V. I. et al. *Cryptococcus neoformans* rapidly invades the murine brain by sequential breaching of airway and endothelial tissues barriers, followed by engulfment by microglia. **mBio**, v. 15, n. 4, 10 abr. 2024.

GIBSON, J. F. et al. Blood vessel occlusion by *Cryptococcus neoformans* is a mechanism for haemorrhagic dissemination of infection. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 4, p. e1010389, 21 abr. 2022.

GUILLOT, L. et al. Enhanced Innate Immune Responsiveness to Pulmonary *Cryptococcus neoformans* Infection Is Associated with Resistance to Progressive Infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 10, p. 4745–4756, out. 2008.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B in immunobiology. **Cell Research**, v. 21, n. 2, p. 223–244, 18 fev. 2011.

IYER, K. R. et al. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 454–466, 8 jul. 2021.

KAMIMURA, D.; ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. Em: **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. p. 1–38.

KAMONKHANTIKUL, K.; ARKSORNNUKIT, M.; TAKAHASHI, H. Antifungal, optical, and mechanical properties of polymethylmethacrylate material incorporated with silanized zinc oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 2353–2360, mar. 2017.

KAUFMAN-FRANCIS, K. et al. The Early Innate Immune Response to, and Phagocyte-Dependent Entry of, *Cryptococcus neoformans* Map to the Perivascular Space of Cortical Post-Capillary Venules in Neurocryptococcosis. **The American Journal of Pathology**, v. 188, n. 7, p. 1653–1665, jul. 2018.

KHEZRI, M. R. et al. The Role of ERK1/2 Pathway in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease: An Overview and Update on New Developments. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 43, n. 1, p. 177–191, 17 jan. 2023.

KIM, J. et al. Fungal brain infection modelled in a human-neurovascular-unit-on-a-chip with a functional blood–brain barrier. **Nature Biomedical Engineering**, v. 5, n. 8, p. 830–846, 14 jun. 2021.

LI, Z.; BRUNO, V. M.; KIM, K. S. Central Nervous System-Infecting Pathogens *Escherichia coli* and *Cryptococcus neoformans* Exploit the Host Pdlim2 for Intracellular Traversal and Exocytosis in the Blood-Brain Barrier. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 10, 16 set. 2021.

LIEW, K. L. et al. In Vitro Analysis of Metabolites Secreted during Infection of Lung Epithelial Cells by *Cryptococcus neoformans*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153356, 7 abr. 2016.

MARK R. SCHUYLER et al. Abnormal lung elasticity in juvenile diabetes mellitus. **American Review of Respiratory Disease**, v. 113, n. 1, p. 37–41, 1976.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

NYAZIKA, T. K. et al. *Cryptococcus tetragattii* as a major cause of cryptococcal meningitis among HIV-infected individuals in Harare, Zimbabwe. **Journal of Infection**, v. 72, n. 6, p. 745–752, jun. 2016.

PELEG, A. Y. et al. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 23, n. 1, p. 3–13, 8 jan. 2007.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, ago. 2017.

RATEMO, S. N.; DENNING, D. W. Burden of fungal infections in Kenya. **Mycology**, v. 14, n. 2, p. 142–154, 3 abr. 2023.

SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 5, p. 331–344, out. 2010.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 5, p. 3165–3170, 5 mar. 2002.

WOO, Y. H.; MARTINEZ, L. R. *Cryptococcus neoformans* –astrocyte interactions: effect on fungal blood brain barrier disruption, brain invasion, and meningitis progression. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 206–223, 4 mar. 2021.

YU, M. et al. RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. **Nature**, v. 487, n. 7408, p. 510–513, 26 jul. 2012.

APÊNDICE A - Comprovante submissão artigo

Fwd: Brazilian Journal of Microbiology - Submission Confirmation Effect of glucose supplementation on human bronchial epithelial cells infected with Cryptococcus neoformans for co-author - [EMID:25150c14a9d7f3bc]

29 de outubro de 2024 às 10:24

Roberta Pereira Soares Emrich <robertasemrich@gmail.com>
Para: Eduardo Bucasán Emrich <eduardo@bucasan.com.br>

Roberta Pereira Soares Emrich
Farmacêutica - Bioquímica
Msc. Agroquímica - Agrobiotecnologia
Doutoranda Bioquímica, Farmacologia e
Fisiologia Humana
Laboratório de Química Medicinal
Praça Manoel Terra, 330
Bairro Abadia
Cep: 38015-050 - Uberaba-MG

Início da mensagem encaminhada:

De: BJMI - Editorial Office <em@editorialmanager.com>
Data: 22 de outubro de 2024 às 15:42:30 BRT
Para: "Roberta P. S. Emrich" <robertasemrich@gmail.com>
Assunto: Brazilian Journal of Microbiology - Submission Confirmation Effect of glucose supplementation on human bronchial epithelial cells infected with Cryptococcus neoformans for co-author - [EMID:25150c14a9d7f3bc]
Responder A: BJMI - Editorial Office <narmadha.purusothaman@springer.com>

Re: "Effect of glucose supplementation on human bronchial epithelial cells infected with Cryptococcus neoformans"
Full author list: Roberta P. S. Emrich; Giovanna F. Bueno; Wanessa Maria dos Santos; Aline Beatriz M. Pereira; Leonardo Euripedes de Andrade e Silva; Paulo Roberto da Silva; Mario Leon Silva-Vergara; Alexandre Paula Rogério

Dear Ms Roberta Emrich,

We have just received the submission entitled: "Effect of glucose supplementation on human bronchial epithelial cells infected with Cryptococcus neoformans" for possible publication in Brazilian Journal of Microbiology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Professor Alexandre Paula Rogério who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Brazilian Journal of Microbiology

APÊNDICE B - Participação dos co-autores no artigo

Roberta Pereira Soares Emrich

- Análise Formal, Investigação, Metodologia, Validação, Visualização e Redação
Elaboração do Rascunho Original, Aprovação final da versão a ser submetida.

Giovanna Ferreira Bueno

- Investigação, Validação, Visualização e Aprovação final da versão a ser submetida.

Wanessa Santos

- Validação, Visualização, Redação e Aprovação final da versão a ser submetida.

Aline Beatriz Mahler Pereira

- Validação, Visualização, Redação e Aprovação final da versão a ser submetida.

Leonardo Euripedes de Andrade Silva

- Investigação, Elaboração das culturas de fungo, Validação, Visualização e Aprovação final da versão a ser submetida.

Paulo Roberto da Silva

- Investigação, Validação, Visualização e Aprovação final da versão a ser submetida.

Mario León Silva Vergara

- Investigação, Validação, Visualização e Aprovação final da versão a ser submetida.

Alexandre Paula Rogerio

- Conceituação, Análise Formal, Captação de Financiamento, Investigação, Metodologia, Administração do Projeto, Recursos, Supervisão, Validação, Visualização e Redação – Preparação do Rascunho Original, Aprovação final da versão a ser submetida.