



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**GABRIEL HENRIQUE RODRIGUES FARIA**

**EDIÇÃO GÊNICA PARA DELEÇÃO SELETIVA DE SUBUNIDADES DE  
RECEPTORES DE OPSONINA EM MACRÓFAGOS MURINOS**

**BRASÍLIA – DF**

**2026**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**GABRIEL HENRIQUE RODRIGUES FARIA**

**EDIÇÃO GÊNICA PARA DELEÇÃO SELETIVA DE SUBUNIDADES DE  
RECEPTORES DE OPSONINA EM MACRÓFAGOS MURINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Hugo Costa Paes

**BRASÍLIA – DF  
2026**

**GABRIEL HENRIQUE RODRIGUES FARIA**

**EDIÇÃO GÊNICA PARA DELEÇÃO SELETIVA DE SUBUNIDADES DE  
RECEPTORES DE OPSONINA EM MACRÓFAGOS MURINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em: / / .

**Banca Examinadora**

Dr. Hugo Costa Paes  
Orientador

Dra. Andrea Barretto Motoyama  
Membro Titular  
Universidade de Brasília

Dr. Getúlio Pereira de Oliveira Júnior  
Membro Titular  
Universidade Católica de Brasília

Dra. Patricia Albuquerque de Andrade Nicola  
Membro Suplente  
Universidade de Brasília

**BRASÍLIA – DF**

**2026**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar sempre os meus caminhos e a Nossa Senhora por me proteger e cuidar.

A minha família, em especial meu pai José Maria e minha mãe Míria Evangel, por serem minha inspiração, força, apoio. Vocês são os pilares que me moldaram, sem vocês nada disso seria possível, essa conquista também é suas.

Aos meus irmãos, Abner e José Maria, por serem esses pestinhas que cuidam de mim, mesmo de longe.

Aos meus tios e tias por me abrigarem e serem minha casa longe de casa, aos meus primos e primas por todos os momentos de distração e diversão.

Aos meus amigos que aguentaram todas as minhas reclamações, e celebraram e vibraram com cada uma das vitórias, mesmo não entendendo muito do que eu estava falando.

Em especial quero agradecer a Camila, Luíza, Maria e Talita. Fomos colocados a prova enfrentando um ambiente adverso, mas no fim saímos vitoriosos e unidos. Obrigado por serem o farol em um mar tão revolto e me deram forças para não desistir.

Ao Vinícius e ao Victor, amigos da vida que me aconselharam, escutaram os desabafos, as frustrações e sempre buscaram me ajudar, seja num momento de distração saindo pra comer, seja num sprint as três da tarde para ler e escrever essa dissertação.

Aos colegas do LabMIB, parceiros de pesquisa, de conversa e um bom café, ou como costumamos dizer, Oficina de Integração.

Ao Luiz, meu braço direito nesse projeto cujo apoio foi fundamental, a Doutoranda Thaís por sempre estar disposta a tirar dúvidas e dar sugestões, a Amanda e a Clara por acompanharem durante todos os experimentos de citometria e ensinarem a analisar os resultados, a Jéssika e ao Marcelo por serem os melhores técnicos de laboratório sempre dispostos a ajudar em qualquer coisa, e ao Bernardo pelo seu olhar crítico e feedback atencioso durante a escrita dessa dissertação.

Agradeço também ao meu orientador Hugo Costa, por alimentar a chama da pesquisa em mim, se hoje eu continuo empolgado com a ciência é graças a sua orientação e ao seu acolhimento.

Por fim, agradeço ao meu amor, que reencontrei durante esse processo de mestrado e acompanhou o crescimento desse projeto, assim como nosso amor.

*“Tá tudo bem, e quando não tá é porque  
ainda vai ficar”*

*Luiza de Souza (Ilustralu)*

## RESUMO

A criptococose, causada principalmente pelas leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, permanece como um grave problema de saúde pública global, com altas taxas de mortalidade em indivíduos imunocomprometidos. A interação inicial entre o fungo e os macrófagos alveolares é crítica para o desfecho da infecção, sendo mediada por diversos receptores de superfície, incluindo as integrinas. No entanto, o papel funcional específico das integrinas ITGAM (CD11b), ITGAX (CD11c), ITGB1 (CD29) e ITGB2 (CD18) na fagocitose e controle do *Cryptococcus* ainda não está totalmente elucidado.

Este estudo teve como objetivo principal gerar linhagens de macrófagos murinos (J774) com deleções gênicas (knockout) para estas integrinas, utilizando o sistema de edição gênica CRISPR-Cas9 mediado por vetores lentivirais. Adicionalmente, realizou-se um levantamento epidemiológico descritivo da mortalidade por criptococose no Distrito Federal entre 2013 e 2024, utilizando dados do SIM/DATASUS. A metodologia experimental envolveu a construção de um vetor lentiviral customizado contendo a nuclease Cas9 sob um sistema de expressão induzível por doxiciclina (Tet-On) e o gene repórter EGFP, controlados pelo promotor mínimo CMV. Após a validação dos plasmídeos e produção viral em células HEK293T, os macrófagos J774 foram transduzidos e submetidos a um protocolo otimizado de seleção com os antibióticos G418 e Puromicina.

Os resultados epidemiológicos revelaram a permanência de óbitos por criptococose no Distrito Federal, com predominância em indivíduos do sexo masculino, acima de 50 anos e com baixa escolaridade. Na vertente experimental, obteve-se êxito no estabelecimento de populações celulares J774 duplamente resistentes aos antibióticos de seleção. Contudo, a indução com doxiciclina falhou em promover a expressão detectável da proteína de fusão Cas9-EGFP. Consequentemente, a análise por citometria de fluxo demonstrou a ausência de redução significativa na expressão das integrinas de superfície, indicando que a edição gênica não ocorreu.

A discussão aponta que, apesar da integração bem-sucedida dos cassetes de resistência, o sistema de expressão induzível falhou provavelmente devido ao silenciamento epigenético do promotor viral CMV na linhagem de macrófagos J774. Conclui-se que, embora o trabalho tenha estabelecido uma plataforma validada para seleção e cultura de células transduzidas, o sistema de promotor escolhido é inadequado para esta linhagem celular específica. Como perspectiva futura, sugere-

se a substituição do promotor CMV por promotores constitutivos robustos, como o EF1 $\alpha$ , para superar o silenciamento gênico e viabilizar o estudo funcional dessas integrinas na interação patógeno-hospedeiro.

**Palavras-chave:** Criptococose; Macrófagos J774; CRISPR-Cas9; Integrinas; Silenciamento Epigenético.

## ABSTRACT

Cryptococcosis, mainly caused by yeasts of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* complex, remains a serious global public health problem, with high mortality rates in immunocompromised individuals. The initial interaction between the fungus and alveolar macrophages is critical for the outcome of the infection, being mediated by several surface receptors, including integrins. However, the specific functional role of the integrins ITGAM (CD11b), ITGAX (CD11c), ITGB1 (CD29) and ITGB2 (CD18) in the phagocytosis and control of *Cryptococcus* is not yet fully elucidated.

This study aimed to generate murine macrophage lines (J774) with gene deletions (knockout) for these integrins, using the CRISPR-Cas9 gene editing system mediated by lentiviral vectors. Additionally, a descriptive epidemiological survey of cryptococcosis mortality in the Federal District between 2013 and 2024 was conducted using data from SIM/DATASUS. The experimental methodology involved the construction of a customized lentiviral vector containing the Cas9 nuclease under a doxycycline-inducible expression system (Tet-On) and the EGFP reporter gene, controlled by the CMV minimal promoter. After validation of the plasmids and viral production in HEK293T cells, J774 macrophages were transduced and subjected to an optimized selection protocol with the antibiotics G418 and Puromycin.

The epidemiological results revealed the persistence of deaths from cryptococcosis in the Federal District, predominantly in male individuals, over 50 years of age and with low education. In the experimental aspect, success was achieved in establishing J774 cell populations that were doubly resistant to the selection antibiotics. However, induction with doxycycline failed to promote detectable expression of the Cas9-EGFP fusion protein. Consequently, flow cytometry analysis demonstrated the absence of a significant reduction in the expression of surface integrins, indicating that gene editing did not occur.

The discussion points out that, despite the successful integration of resistance cassettes, the inducible expression system likely failed due to epigenetic silencing of the CMV viral promoter in the J774 macrophage cell line. It is concluded that, although the work has established a validated platform for selection and culture of transduced cells, the chosen promoter system is inadequate for this specific cell line. As a future perspective, it is suggested to replace the CMV promoter with robust constitutive

promoters, such as EF1 $\alpha$ , to overcome gene silencing and enable the functional study of these integrins in pathogen-host interaction.

**Keywords:** Cryptococcosis; J774 Macrophages; CRISPR-Cas9; Integrins; Epigenetic silencing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Linha do Tempo.....	1
<b>Figura 2</b> – Arvore Filogenética das espécies de Cryptococcus.....	2
<b>Figura 3</b> – Esquema de funcionamento dos receptores Fcγ. (autoria própria).....	8
<b>Figura 4</b> – Esquema de funcionamento dos receptores CR3 e CR4 (autoria própria).....	10
<b>Figura 5</b> – Mapa do plasmídeo customizado de eSPCas9.....	16
<b>Figura 6</b> – Gel de agarose, em A temos o Plasmídeo de Cas9 integro em 1,2 e 3 e ele digerido em 4,5 e 6. Já em B temos 1,4 = pRSV; 2,5 = pMD2G; 3,6 = pMDLG; 7 = pRSV Digerido; 8 = pMD2G Digerido 9 = pMDLG Digerido.....	27
<b>Figura 7</b> – J774 WT com G418 velho por 10 dias. Ocular de 4X com escala aproximada de 1 mm.....	28
<b>Figura 8</b> – J774 WT com G418 Novo A) Dia 1 com ampliação de 4X B) Dia 4 com ampliação de 10X. Escala aproximada de 1 mm.....	29
<b>Figura 9</b> – Ilhas de Células sobreviventes a seleção. Aumento em 4X e escala aproximada de 1 mm.....	29
<b>Figura 10</b> – Análise de Citometria com alta mortalidade celular conforme mostrado pelo agrupamento de eventos próximo ao eixo 0,0. Ao lado vemos o histograma mostrando a fluorescência da EGFP pelo canal Alexa Fluor 488-A....	31
<b>Figura 11</b> – Análise de Citometria com células viáveis, ao lado vemos o histograma mostrando a fluorescência da EGFP pelo canal FITC-A.....	32
<b>Figura 12</b> – Seleção de Células. A) ITGAM B)ITGAX C)ITGB1 D)ITGB2. Aumento em 4X e escala aproximada de 1 mm.....	33
<b>Figura 13</b> – Análise de Titulação dos anticorpos nas concentrações de 3 µg/mL. Em A temos CD18 e em B temos CD11c.....	34
<b>Figura 14</b> – Análise de deleção dos genes via citometria de fluxo. os gráficos de dispersão de eventos com o gate marcado para as células analisadas, na esquerda temos um histograma para a Estreptomicina-Alexa Fluor 647 no canal do APC-A. A) Controle Celular; B) Controle Estreptomicina-Alexa Fluor 647; C) Análise do ITGAM na J774 WT; D) Análise do ITGAM na J774 Del; E) Análise do ITGAX na J774 WT; F) Análise do ITGAX na J774 Del; G) Análise do ITGB1 na J774 WT; H) Análise do ITGB1 na J774 Del; I) Análise do ITGB2 na J774 WT e J) Análise do ITGB2 na J774 Del.....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Visão geral dos genes-alvo, suas nomenclaturas, e função receptora....	11
<b>Tabela 2</b> – Sequências de gRNAs para os genes selecionados. As sequências em negrito e marcadas com asterisco indicam os gRNAs selecionados para a primeira rodada de clonagem e edição genômica.....	17
<b>Tabela 3</b> – Mortalidade por faixa etária entre 2013-2024.....	25
<b>Tabela 4</b> – Mortalidade por escolaridade entre 2013-2024.....	26
<b>Tabela 5</b> – Mortalidade por escolaridade entre 2000-2024.....	26

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 O Agente Etiológico: Do Isolamento à Complexidade Taxonômica.....	1
1.2 Impacto Global e Epidemiologia da Criptococose.....	3
1.2.1 O Cenário no Brasil.....	3
1.3 Patogênese da Criptococose: A Batalha entre Hospedeiro e Patógeno.....	4
1.3.1 Início da Infecção e Resposta Imune Primária.....	4
1.3.2 Fatores de Virulência: O Arsenal do Patógeno.....	5
1.3.3 Sobrevivência Intracelular e Disseminação.....	6
1.3.4 Resposta Imune Adaptativa e a Modulação do Desfecho.....	6
1.3.5 Receptores Fc $\gamma$ e Imunidade.....	8
1.3.6 Receptores de Complemento e as Integrinas $\beta$ 2.....	9
1.3.7 O papel da Integrina $\beta$ 1.....	10
1.4 Abordagem Clínica: Desafios no Diagnóstico e Tratamento.....	12
1.4.1 Diagnóstico.....	12
1.4.2 Tratamento.....	13
1.5 Justificativa e Objetivos.....	14
<b>2. METODOLOGIA</b> .....	15
2.1 Desenho Experimental.....	15
2.1.1 Vetores Lentivírais e Estratégia de Edição Gênica.....	15
2.2 Linhagens Celulares e Condições de Cultivo.....	18
2.3 Produção de Partículas Lentivirais.....	18
2.3.1 Preparo e Amplificação dos Plasmídeos.....	18
2.3.2 Produção de Lentivírus para Expressão de SpCas9.....	19
2.3.3 Produção de Lentivírus para Expressão dos RNAs Guias (gRNAs).....	20

2.4 Geração e Validação da Linhagem J774.1 com Expressão de SpCas9.....	21
2.4.1 Transdução da Linhagem J774.1.....	21
2.4.2 Otimização do Protocolo de Seleção com G418.....	21
2.4.3 Tentativa de Validação da Expressão de SpCas9-EGFP.....	22
2.5 Deleção dos Genes Alvo e Análise Fenotípica.....	22
2.5.1 Geração de Linhagens Duplamente Transduzidas.....	22
2.5.2 Indução da Deleção Gênica.....	23
2.5.3 Titulação de Anticorpos para Análise por Citometria de Fluxo.....	23
2.5.4 Análise da Deleção das Proteínas de Superfície.....	24
2.6 Levantamento de Dados de Mortalidade no DATASUS.....	24
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Perfil Epidemiológico da Mortalidade por Criptococose no Distrito Federal (2013–2024).....	25
3.2 Validação dos Plasmídeos para Produção Lentiviral .....	26
3.3 Otimização do Protocolo de Seleção de Células Transduzidas.....	28
3.4 Obtenção de Células J774 Resistentes após Seleção Otimizada.....	29
3.5 Falha na Detecção da Expressão Induzível de Cas9-EGFP.....	30
3.6 Obtenção de Células Duplamente Resistentes após Seleção com Puromicina.....	33
3.7 Titulação de Anticorpos Sugere Baixa Expressão Basal de ITGB2 e ITGAX.....	33
3.8 Análise da Deleção Gênica Demonstra Ausência de Knockout Efetivo.....	35
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O Agente Etiológico: Do Isolamento à Complexidade Taxonômica

A descoberta do *Cryptococcus neoformans* remonta a 1894, quando foi isolado de forma independente por Otto Busse de uma lesão óssea humana e por Francesco Sanfelice de um suco de pêssigo fermentado. A designação taxonômica atual, *C. neoformans*, foi proposta por Jean-Paul Vuillemin em 1901, devido à ausência de produção de ascósporos, distinguindo-o do gênero *Saccharomyces* (Srikanta; Santiago-Tirado; Doering, 2014). Posteriormente, o fungo hoje conhecido como *C. gattii* foi identificado em 1970 por F. Gatti e R. Eeckels, sendo inicialmente descrito como uma variedade do *C. neoformans* e, em 2002, elevado à categoria de espécie após estudos moleculares.

A jornada para a compreensão do gênero é marcada por descobertas cruciais, conforme ilustrado na linha do tempo da Figura 1. Além dos marcos taxonômicos, foram fundamentais o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas, como o teste de urease (Canteros et al., 1996), a detecção da produção de melanina, (Staib, 1963) o meio diferencial CGB (Klein et al., 2009), e a elucidação de sofisticados mecanismos de virulência, como a invasão transcelular da barreira hematoencefálica (Shi et al., 2010) e a secreção de fatores de virulência via vesículas extracelulares (Rodrigues et al., 2008).

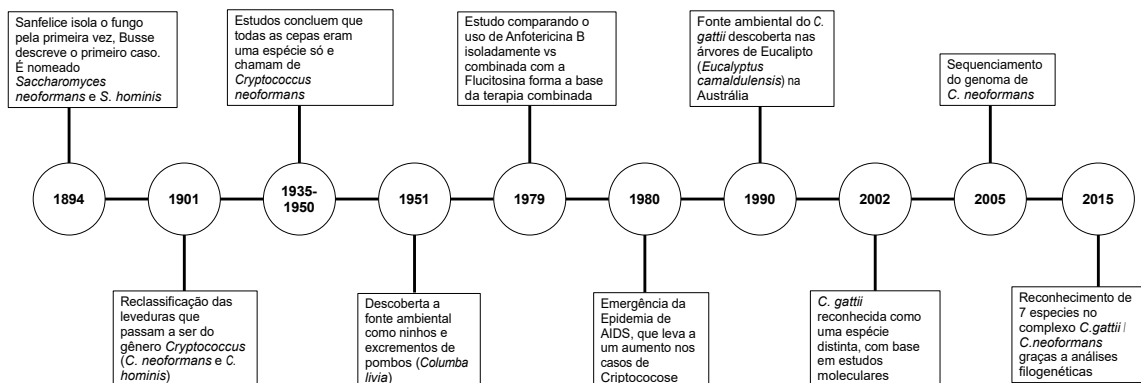


Figura 1: Linha do Tempo (autoria própria)

Recentemente, a taxonomia do gênero foi refinada com base em análises moleculares. Hagen et al., (2015) propuseram a elevação de variedades e sorotipos ao status de espécies distintas (Figura 2). Essa nova classificação resultou em sete espécies principais, cuja distribuição global é heterogênea, com o *C. neoformans*, *C. gattii* e o *C. deuterogattii* possuindo uma ocorrência mundial, o *C. deneoformans* com ocorrência na Europa, o *C. bacillisporus* e o *C. decagattii* nas Américas e o *C. tetragattii* ocorrendo na África subsaariana e no subcontinente Indiano.

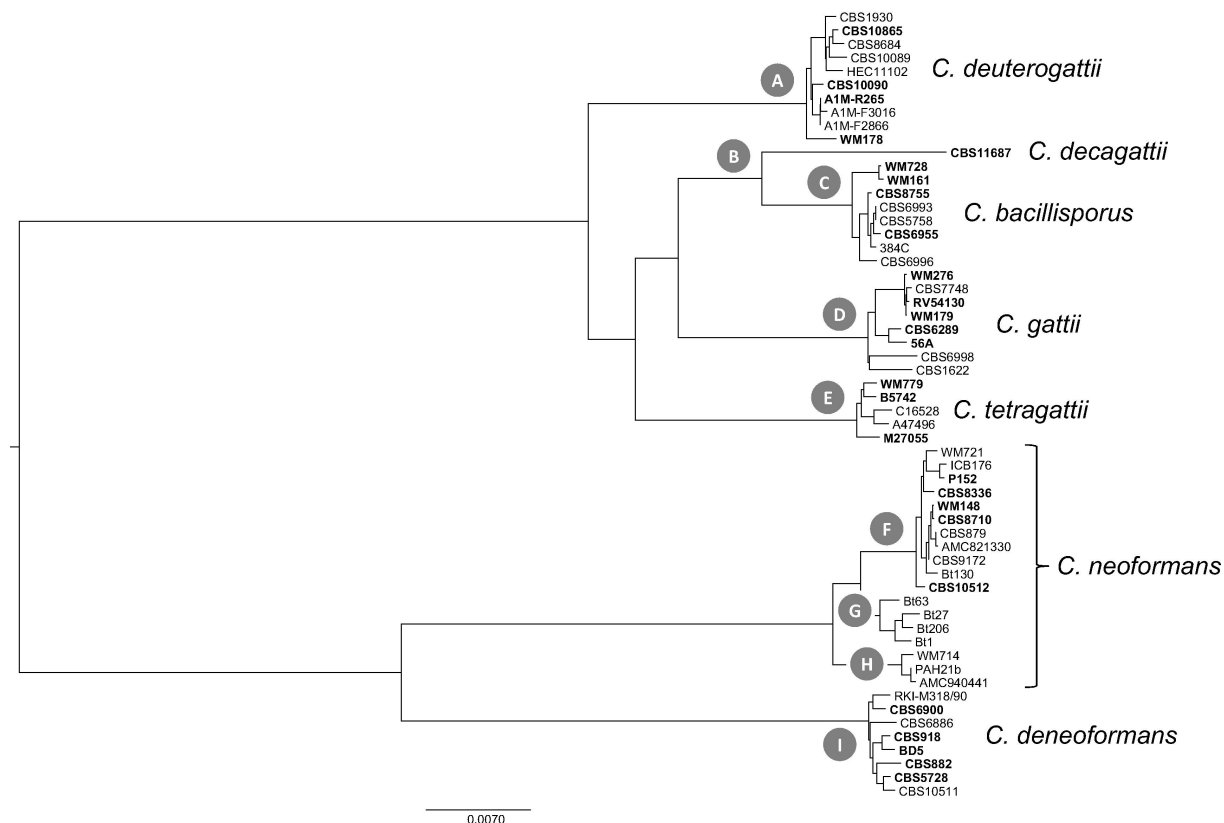


Figura 2: Árvore Filogenética das espécies de *Cryptococcus* (Hagen et al., 2015)

Para simplificar a aplicação clínica e a pesquisa, Kwon-Chung et al., (2017) sugeriram a organização nos complexos de espécies *Cryptococcus neoformans* (CECN) e *Cryptococcus gattii* (CECG), sendo o primeiro composto por *C. neoformans* e *C. deneoformans*, e o segundo pelas cinco espécies restantes. Essa classificação se justifica pela sobreposição de sintomas clínicos, embora diferenças epidemiológicas e de virulência já sejam reconhecidas (Diaz, 2020).

## 1.2 Impacto Global e Epidemiologia da Criptococose

A relevância da criptococose como um grave problema de saúde global foi formalmente consolidada em 2022, quando a Organização Mundial da Saúde (OMS) cria sua primeira lista de patógenos fungos prioritários e coloca o *C. neoformans* como patógeno crítico e o *C. gattii* como de prioridade média.

A criptococose causada pelo CECN é uma micose primariamente oportunista, afetando principalmente pessoas com o sistema imune comprometido, como portadores de HIV, receptores de transplantes de órgãos sólidos e pacientes com doenças hematológicas. Contudo, no caso do CECG, o perfil se altera, com um número significativo de casos ocorrendo em indivíduos aparentemente imunocompetentes.

Adicionalmente, certos fatores podem contribuir para o surgimento da doença em imunocompetentes, como a presença de autoanticorpos anti-GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos), uso preexistente de esteroides orais, histórico de câncer ou doença pulmonar crônica (Cao, 2025).

De acordo com estimativas de Rajasingham et al., (2022), em 2020, a incidência global de meningite criptocócica foi de 152.000 casos, resultando em 112.000 mortes, majoritariamente em pessoas vivendo com HIV avançado.

Para a América Latina, a estimativa foi de 12.000 casos de meningite criptocócica e 7.000 mortes. Os autores alertam para uma provável subestimação desses números devido a inconsistências e lacunas nos dados de vigilância, além da exclusão de populações pediátricas e não-HIV.

### 1.2.1 O Cenário no Brasil

No Brasil, a criptococose não é uma doença de notificação compulsória, o que representa um desafio para a vigilância epidemiológica e para a real mensuração de sua carga. Visando superar essa lacuna, em 2024, o Ministério da Saúde iniciou a implementação de uma ferramenta piloto, o sistema Micosis, com previsão de estabelecimento nacional até 2027.

Um estudo baseado em dados do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM/DATASUS) revelou que, entre 2000 e 2012, ocorreram 5.755 óbitos com menção à criptococose no país (Alves Soares et al., 2019). Deste total, 4.634 óbitos tiveram a criptococose como causa associada, sendo 75% destes casos eram associados com AIDS. Nos dois grupos a morte prevaleceu no gênero masculino correspondendo a mais de 65% do total de óbitos.

O estudo também detalha os dados por região, e para o Centro-Oeste, a taxa de mortalidade foi de 7,77 por milhão de habitantes (causa básica) e 32,69 por milhão (causa associada). Especificamente no Distrito Federal, foram registrados 69 óbitos no período.

Uma análise mais recente realizada para este trabalho, utilizando dados do DATASUS de 2013 a 2023, indica a persistência do problema no Distrito Federal, com 16 óbitos de residentes registrados no período. A mortalidade atingiu uma ampla faixa etária e indivíduos com menor escolaridade, sugerindo vulnerabilidades socioeconômicas associadas à doença.

### **1.3 Patogênese da Criptococose: A Batalha entre Hospedeiro e Patógeno**

#### **1.3.1 Início da Infecção e Resposta Imune Primária**

A infecção criptocócica inicia-se tipicamente pela inalação de propágulos fúngicos (esporos ou leveduras desidratadas) presentes no ambiente (Do Carmo et al., 2022; Li et al., 2024). Ao alcançarem os alvéolos pulmonares, os fungos são prontamente confrontados pela primeira linha de defesa do sistema imune do hospedeiro. O reconhecimento inicial ocorre por meio de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) expressos em células imunes, como os receptores de lectina tipo C (CLRs) — incluindo os receptores de manose, dectina-1 e dectina-2 — e os receptores tipo toll (TLRs), que se ligam a diversos componentes fúngicos (Elsegeiny; Marr; Williamson, 2018).

Após o reconhecimento, os macrófagos alveolares tentam conter o patógeno através da fagocitose (Esher; Zaragoza; Alspaugh, 2018). O desfecho dessa

interação inicial é dependente tanto do estado imunológico do hospedeiro quanto da espécie de criptococo envolvida. Em infecções por espécies do CECN em indivíduos imunocompetentes, a resposta imune é geralmente eficaz, resultando em uma infecção pulmonar assintomática que pode ser eliminada ou evoluir para um estado de latência (Li et al., 2024). Contudo, em hospedeiros com imunidade celular comprometida o fungo se replica de forma descontrolada, culminando na meningoencefalite criptocócica.

Por outro lado, as infecções causadas por espécies do CECG exibem um perfil epidemiológico distinto. A maior virulência do *C. gattii* nesse contexto tem sido associada à sua capacidade de aumentar drasticamente o tamanho capsular e de modular a resposta imune através do glucuronoxilomanana (GXM), que pode bloquear a maturação de células dendríticas (Cao, 2025). A maior suscetibilidade de alguns indivíduos aparentemente imunocompetentes tem sido ligada à presença de autoanticorpos neutralizantes contra o GM-CSF, uma citocina crítica para a ativação de macrófagos (Cao, 2025), sugerindo que imunodeficiências sutis podem predispor à doença.

### **1.3.2 Fatores de Virulência: O Arsenal do Patógeno**

O sucesso do *Cryptococcus spp.* como patógeno reside em sua notável capacidade de subverter e manipular a resposta imune do hospedeiro, para a qual dispõe de um sofisticado arsenal de fatores de virulência. O principal deles é a sua proeminente cápsula polissacarídica, composta majoritariamente por GXM, que se espessa durante a infecção para conferir proteção contra a fagocitose, neutralizar o estresse oxidativo e impedir o acesso de componentes imunes à parede celular (Do Carmo et al., 2022).

Aliada a essa barreira física, a produção de melanina na parede celular atua como um escudo químico, protegendo o fungo contra radicais livres gerados pelos fagócitos e modulando a produção de citocinas pelo hospedeiro (Esher; Zaragoza; Alspaugh, 2018) e a secreção de enzimas que manipulam a célula hospedeira, como a urease e a fosfolipase B1 (Plb1), crucial para a sobrevivência intracelular e invasão de tecidos (Noverr et al., 2003).

Além dessas defesas, o fungo exibe uma plasticidade morfológica notável, podendo diferenciar-se em "células-titãs" de diâmetro avantajado, uma característica mais proeminente em *C. gattii* e induzida por fatores fisiológicos do hospedeiro como alta concentração de CO<sub>2</sub> e hipóxia (Li et al., 2024; Trevijano-Contador et al., 2025). São células, que não apenas resistem à fagocitose, mas também desviam a resposta imune para um perfil Th2, menos fungicida (Li et al., 2024).

Finalmente, a base para a eficácia de todos esses mecanismos em um hospedeiro mamífero é a termotolerância, a capacidade de crescer a 37 °C, uma adaptação fisiológica crítica que o distingue de muitos outros fungos ambientais (Maziarz; Perfect, 2016).

### **1.3.3 Sobrevivência Intracelular e Disseminação**

Por ser um patógeno intracelular facultativo, *Cryptococcus spp.* desenvolveu estratégias para sobreviver e se replicar no ambiente hostil do interior dos macrófagos.

Uma vez fagocitado, ele remodela ativamente o fagossomo, inibindo sua maturação e acidificação para criar um nicho replicativo favorável (Casadevall; Coelho; Alanio, 2018). A partir daí, o patógeno pode escapar da célula hospedeira mediante um processo de exocitose não lítica (ejeção), que mantém o macrófago intacto, ou utilizar o próprio fagócito como um "Cavalo de Troia" para atravessar barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica, facilitando a disseminação para o sistema nervoso central (SNC) (Rathore et al., 2022).

Quando a resposta imune do hospedeiro consegue conter, mas não eliminar, a infecção, formam-se granulomas, onde o fungo pode permanecer em estado de latência por anos, com potencial de reativação em caso de imunossupressão futura (Gibson; Johnston, 2015)

### **1.3.4 Resposta Imune Adaptativa e a Modulação do Desfecho**

Uma resposta imune adaptativa eficaz, mediada por células T e anticorpos, é essencial para a erradicação do fungo, e deficiências nesta resposta estão

associadas aos casos mais graves de criptococose.

A resposta celular é iniciada quando células dendríticas (DCs), atuando como as principais células apresentadoras de antígenos (APCs), fagocitam o fungo e apresentam seus componentes via moléculas de MHC-II para estimular a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens (Elsegeiny; Marr; Williamson, 2018). Subsequentemente, esses linfócitos se diferenciam em distintos perfis de células T auxiliares (Th), cujo balanço de citocinas torna-se o ponto crucial que determina o desfecho da infecção.

Uma resposta protetora é orquestrada pelo perfil Th1, que através da produção de citocinas como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), a interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF), promove a ativação de macrófagos classicamente ativados (M1), aumentando sua capacidade fungicida e controlando a infecção. Essa resposta é frequentemente apoiada pelo perfil Th17, que, via secreção de IL-17 e IL-22, contribui para o recrutamento de neutrófilos e para a diferenciação de macrófagos M1 (Normile; Bryan; Del Poeta, 2020).

Em contraste, a polarização da resposta para um perfil Th2 leva a um desfecho desfavorável. A produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 induz a ativação de macrófagos alternativamente ativados (M2), que possuem uma atividade antifúngica insuficiente e acabam por permitir a sobrevivência e a replicação do patógeno no interior do fagócito (Elsegeiny; Marr; Williamson, 2018).

A resposta imune humoral desempenha um papel complexo e ambivalente, cuja eficácia protetora é estritamente dependente da especificidade e do isotipo do anticorpo. Enquanto IgM e IgA demonstraram inibir a formação de células-titã, e alguns isotipos de IgG (como IgG1 e IgG2a em modelos murinos) facilitam a opsonização e reduzem a carga fúngica (Gibson; Johnston, 2015; Yang et al., 2022). Dois anticorpos monoclonais murinos, do tipo IgM possuem exemplificam essa dualidade de forma bem didática. São os anticorpos 13F1 e o 12A1, eles derivam do mesmo clone de células B, mas possuem diferenças suas em suas regiões variáveis, o que resulta em desfechos biológicos opostos. Enquanto o 13F1 vai ter um papel não protetor, o 12A1 consegue proteger o hospedeiro contra infecção. O que

demonstra que a eficácia não depende apenas do isotipo, mas também da especificidade e da forma como ele interage com a capsula (Yang et al., 2022).

Tais desfechos divergentes não são aleatórios, mas sim consequência direta da interação, ou da falta dela, entre a porção Fc dos anticorpos e seus receptores cognatos (FcRs) na superfície dos fagócitos, o que dita a qualidade da resposta efetora subsequente.

A fagocitose mediada por opsoninas é fundamental, especialmente para um patógeno encapsulado. O sistema complemento, via deposição de C3b na cápsula, marca o fungo para reconhecimento por receptores de complemento (CRs) nos fagócitos.

No entanto, a interação de criptococos opsonizados com fagócitos não se restringe a uma única via e envolve duas classes principais de receptores: os receptores para a fração Fc das imunoglobulinas (FcR) e os receptores de complemento (CRs).

### 1.3.5 Receptores Fcγ e Imunidade

Os receptores Fcγ (FcγR) atuam como adaptadores da resposta imune, responsáveis por ligar a porção Fc de anticorpos IgG, conforme visto na figura 3. Em fagócitos como macrófagos e células dendríticas, o agrupamento destes receptores, ao se ligarem à IgG que opsoniza um patógeno, desencadeia um processo mediado por actina que resulta na internalização (fagocitose) e na modulação do estado de ativação celular (Gibson; Johnston, 2015).

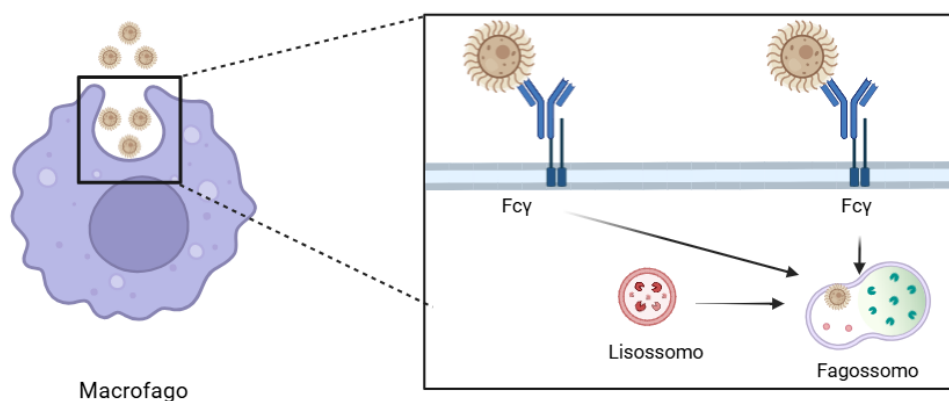


Figura 3: Esquema de funcionamento dos receptores Fcγ. (autoria própria)

A sinalização dos FcγRs é dicotômica, dividida entre vias ativadoras e inibitórias. Os receptores ativadores, FcγRI, FcγRIII e FcγRIV, dependem da cadeia gama comum para a transdução de sinal, a qual contém um motivo de ativação baseado em tirosina (ITAM). A fosforilação do ITAM é essencial para mediar funções efetoras críticas. Isso inclui não apenas a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), mas também é fundamental para a resposta adaptativa, sendo crucial em células dendríticas para a maturação, processamento e apresentação cruzada de antígenos, funções que são anuladas em modelos de camundongos com sinalização ITAM disfuncional (Junker; Gordon; Qureshi, 2020).

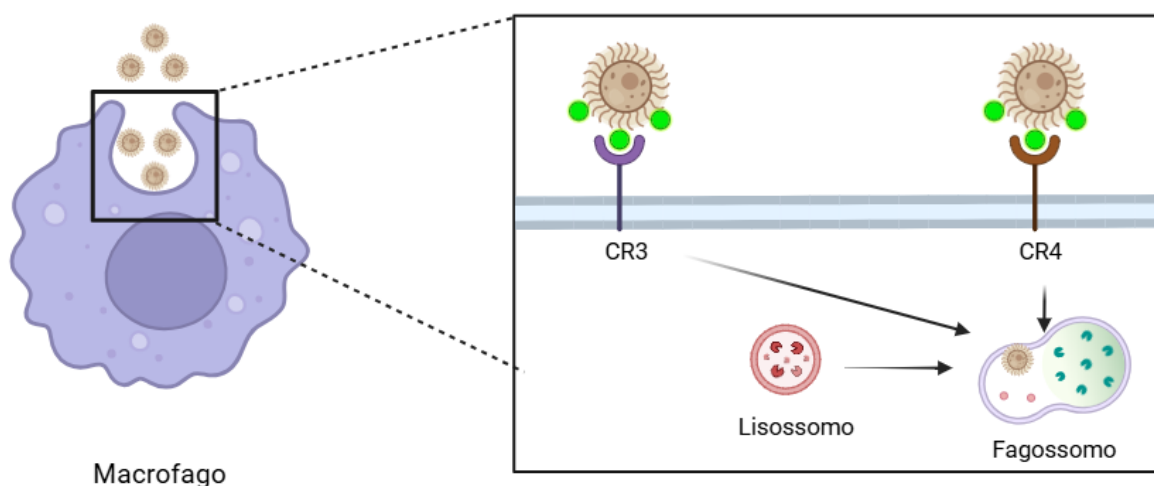
Em contraste, o receptor inibitório FcγRIIB, opera por um mecanismo oposto. Este receptor não utiliza ITAM, mas sim um motivo inibitório baseado em tirosina (ITIM). O agrupamento do FcγRIIB leva à fosforilação do ITIM, que por sua vez recruta fosfatases, como SHP-I ou SHP-II, que suprimem ativamente as cascatas de sinalização ativadoras (Junker; Gordon; Qureshi, 2020).

A relevância desta arquitetura de receptores torna-se particularmente complexa no contexto da imunidade ao *C. neoformans*. Estudos em modelos murinos demonstraram que a proteção é dependente do isotipo de IgG. Notoriamente, a IgG3 murina, associada a um desfecho desfavorável, não se liga eficientemente aos receptores FcγR clássicos (FcγRI-IV), observação que levou à hipótese da existência de um receptor alternativo para IgG3 (Hawk et al., 2019).

### **1.3.6 Receptores de Complemento e as Integrinas β2**

Os Receptores de Complemento (CRs), são heterodímeros de integrina β2 formados pela subunidade comum ITGB2 (CD18). Esta subunidade se associa com ITGAM (CD11b) para formar o Receptor de Complemento 3 (CR3), e com ITGAX (CD11c) para formar o Receptor de Complemento 4 (CR4). A função primária destes receptores na criptococose é a fagocitose de partículas opsonizadas com C3b/iC3b, conforme visto na figura 4, um processo fundamental para o controle da infecção, como evidenciado pela maior suscetibilidade à doença em camundongos deficientes em C5 (Rhodes, 1985).

Foi demonstrado que CR3 e CR4 também podem mediar a fagocitose por vias independentes de complemento, nas quais a ligação de certos anticorpos (como o 18B7) à cápsula induz um rearranjo estrutural, expondo epítomos reconhecidos pelo domínio de lectina presente em CR3 e CR4 (Taborda; Casadevall, 2002). Em contrapartida, o patógeno desenvolveu mecanismos de evasão, como a proteína antifagocítica App1, que se liga diretamente a CR3 e CR2 para inibir a fagocitose (Esher; Zaragoza; Alspaugh, 2018).



**Figura 4: Esquema de funcionamento dos receptores CR3 e CR4 (autoria própria)**

Observa-se, ainda, um papel funcionalmente distinto entre as famílias de integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 2$  em diferentes contextos celulares. Em células Natural Killer (NK), por exemplo, as integrinas  $\beta 2$  (como LFA-1, CD11a/CD18) não parecem ser cruciais para a citotoxicidade anticriptocócica. Em contrapartida, a integrina  $\beta 1$  (CD29) foi identificada como um receptor essencial para a morte de *C. neoformans* mediada por células NK, ativando vias de sinalização distintas (Xiang et al., 2018).

### 1.3.7 O papel da Integrina $\beta 1$

A integrina  $\beta 1$  (ITGB1), desempenha um papel duplo e complexo na imunidade ao *Cryptococcus spp.*. Sua função mais notável é a recente identificação como o receptor de superfície, ou componente de um complexo, para o isotipo IgG3 murino, uma identidade que era procurada há cerca de três décadas. Esta descoberta é crucial, pois a IgG3 murina está associada a um desfecho não-protetor

na criptococose, e sua ligação não ocorre através dos receptores FcγR clássicos (Hawk et al., 2019).

A evidência para esta função é robusta. Estudos de interferência genética ou bloqueio por anticorpos em macrófagos, incluindo a linhagem J774, demonstraram uma diminuição específica da ligação de IgG3 e da fagocitose de *C. neoformans* mediada por este isotipo, sem afetar a função da IgG1. Além disso, o mecanismo de ligação é consistente com o de uma integrina, sendo dependente de cátions divalentes como  $Mn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , que modulam a afinidade da interação.

Adicionalmente, a ITGB1 desempenha um segundo papel vital na citotoxicidade mediada por células Natural Killer (NK) humanas, atuando como um receptor de padrão molecular associado a patógenos (PAMP), fornecendo um sinal de ativação essencial para a morte do fungo. Esta sinalização dispara a via ILK→Rac1, que é indispensável para a atividade citotóxica (Xiang et al., 2018). Curiosamente, esta função parece ser puramente de sinalização, e não de adesão; estudos de knockdown da Itgb1 em células NK não afetaram a formação do conjugado físico entre a célula NK e o fungo, mas anularam a capacidade da célula de matar o patógeno.

Em resumo temos na tabela 1 os genes alvo do projeto.

**Tabela 1-Visão geral dos genes-alvo, suas nomenclaturas, e função receptora.**

Nome do Gene	Sigla	Nomenclatura CD	Subunidade de	Receptor Formado	Ligantes Principais
Integrin Subunit Alpha M	ITGAM	CD11b	Integrina αM	CR3 (com ITGB2)	iC3b, Fibrinogênio, Fator X
Integrin Subunit Alpha X	ITGAX	CD11c	Integrina αX	CR4 (com ITGB2)	iC3b, Proteínas de superfície
Integrin	ITGB1	CD29	Integrina β1		Colágeno,

Subunit Beta 1					Laminina, (IgG3?)
Integrin Subunit Beta 2	ITGB2	CD18	Integrina $\beta 2$	CR3, CR4 (com ITGAM/X)	ICAMs, iC3b

Fonte: Do Autor (2025)

#### 1.4 Abordagem Clínica: Desafios no Diagnóstico e Tratamento

A abordagem clínica da meningite criptocócica, seguindo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2022), é dividida em duas frentes principais: um diagnóstico preciso e um tratamento farmacológico multifásico. O desafio diagnóstico reside na escolha e disponibilidade de métodos com diferentes sensibilidades, como o teste rápido de antígeno (LF-CrAg), o exame direto com Tinta Nanquim e a cultura fúngica (Boulware et al., 2014). O tratamento, por sua vez, exige uma terapia de indução, consolidação e manutenção rigorosa para prevenir recaídas. A implementação de novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas no Brasil, como o LF-CrAg e a Flucitosina no SUS, tem sido fundamental para enfrentar esses desafios.

##### 1.4.1 Diagnóstico

O processo diagnóstico se inicia com a coleta do Líquido Cefalorraquidiano (LCR), através de uma punção lombar com aferição da pressão de abertura. Se não for possível realizar a punção lombar, os testes podem ser feitos usando amostras de sangue total, plasma ou soro. O primeiro método indicado é o teste rápido de antígeno criptocócico de fluxo lateral (LF-CrAg) que traz um resultado rápido, com alta sensibilidade e especificidade.

Caso o teste LF-CrAg não esteja disponível, a próxima metodologia recomendada é a microscopia de tinta Nanquim, em que é feita uma lâmina microscópica usando o LCR e a tinta Nanquim como corante. Ao levar no microscópio óptico é possível ver as leveduras com a capsula formando um halo

claro ao redor. Apesar de ser o método mais barato, ele tem a desvantagem de ter uma baixa sensibilidade, apenas 86% considerando o estudo de Boulware et al., (2014).

Por fim, outra possibilidade é fazer a cultura fúngica, utilizando uma placa de ágar Sabouraud dextrose, usando 100µl do volume de amostra não diluída e 5 diluições seriadas 1:10, contudo a desvantagem é a demora para um resultado, pois as colônias demoram de 48-72 horas para surgirem e demandar um laboratório bem equipado e técnicos treinados. Nos casos de primeiro diagnóstico também é recomendado fazer a cultura associado aos testes rápidos.

Pessoas que vivem com o HIV e possuam a contagem de CD4+ inferior a 200 células/µL tem a recomendação de fazer o rastreio da doença, usando o teste rápido LF-CrAg. Trata-se de uma intervenção para reduzir a mortalidade dessa micose.

Existem outros testes que podem ser feitos para o diagnóstico, como o teste de PCR, que serve também para identificar a espécie causadora da doença, o teste de ELISA e o teste de aglutinação por látex.

No Brasil, o teste rápido LF-CrAg foi incorporado ao SUS por volta de junho de 2021, após a CONITEC recomendar sua inclusão em março do mesmo ano. Segundo a Nota Informativa N° 10/2024 que orienta o uso desse teste no SUS, ele é recomendado no rastreio de pessoas com HIV/AIDS que apresentam contagem de linfócitos T CD4+  $\leq 200$  cél/mm<sup>3</sup> e pessoas com HIV/AIDS que estejam no estágio clínico III e IV sem histórico prévio de criptococose e no diagnóstico de pessoas com o HIV e apresentem sinais e sintomas de meningite criptocócica independente da contagem de CD4+, sem histórico prévio de criptococose.

#### **1.4.2 Tratamento**

O tratamento para criptococose conforme as recomendações da OMS é dividido em três etapas.

Começando com a etapa de indução a medicação inclui uma dose única de anfotericina B Lipossomal (10 mg/kg) e um regime de 14 dias com flucitosina (25 mg/kg administrada quatro vezes ao dia) e fluconazol (300 mg/kg dividida em quatro

administrações para adultos, e de 12 mg/kg para crianças e adolescentes, com um limite máximo de 800 mg por dia).

Em seguida na etapa de consolidação, usa-se o fluconazol (400 mg a 800mg/dia) por oito semanas

Por fim, na etapa de manutenção mantém-se o fluconazol numa dose menor (200mg/dia) por pelo menos 12 meses. Essa etapa é feita até que haja uma recuperação imunológica (contagem de CD4+ maior que 200 células/ $\mu$ L) e outros sinais de resolução da infecção, como pelo menos seis meses de remissão dos sintomas, cultura do líquor negativa para o fungo ou glicorraquia normal.

No Brasil, o Ministério da Saúde atualizou as recomendações de tratamento em 2022 incorporando a flucitosina no SUS. O tratamento é semelhante às recomendações da OMS, com a etapa de indução feita com anfotericina B Lipossomal (3mg/kg por dia via intravenosa) e flucitosina (100 mg/kg por dia, via oral em quatro doses), com a anfotericina B lipossomal podendo ser substituída caso não esteja disponível pelo complexo lipídico de anfotericina B (5mg/kg por dia via intravenosa).

As Etapas de consolidação e manutenção permanecem como a da OMS, com a única diferença de que se considera recuperação imunológica quando a contagem de CD4+ for acima de 200 células/ $\mu$ L em duas avaliações diferentes com seis meses de intervalo.

### **1.5 Justificativa e Objetivos**

Apesar dos avanços no diagnóstico e da disponibilidade de terapia antifúngica eficaz, a mortalidade por criptococose, especialmente no contexto brasileiro, permanece elevada. A compreensão dos mecanismos celulares e moleculares da interação entre o criptococo e as células do hospedeiro é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. No entanto, a função específica de receptores de superfície do macrófago, como as integrinas, na fagocitose e no controle da infecção por *C. neoformans* ainda não está elucidada.

Diante desta lacuna, este trabalho teve como objetivo geral gerar linhagens celulares de macrófagos (J774) com deleções específicas (nocautes) para os genes que codificam as integrinas ITGAM, ITGAX, ITGB1 e ITGB2, utilizando o sistema CRISPR-Cas9 mediado por lentivírus.

Para tal, tivemos como objetivos específicos:

- Obter e validar os plasmídeos necessários para a produção de partículas lentivirais contendo o sistema Sp-Cas9.
- Produzir partículas lentivirais em células de empacotamento HEK293T.
- Transduzir as células de linhagem murina de macrófagos J774 com os lentivírus produzidos.
- Estabelecer e otimizar um protocolo de seleção de células transduzidas utilizando o antibiótico G418.
- Selecionar e expandir as populações celulares J774 que integraram o sistema Sp-Cas9, visando a futura edição dos genes de interesse ITGAM(CD11b), ITGAX (CD11c), ITGB1(CD29) e ITGB2(CD18).
- Elaborar um panorama epidemiológico da criptococose no Distrito Federal na última década para avaliar a evolução da doença na região.

## **2. METODOLOGIA**

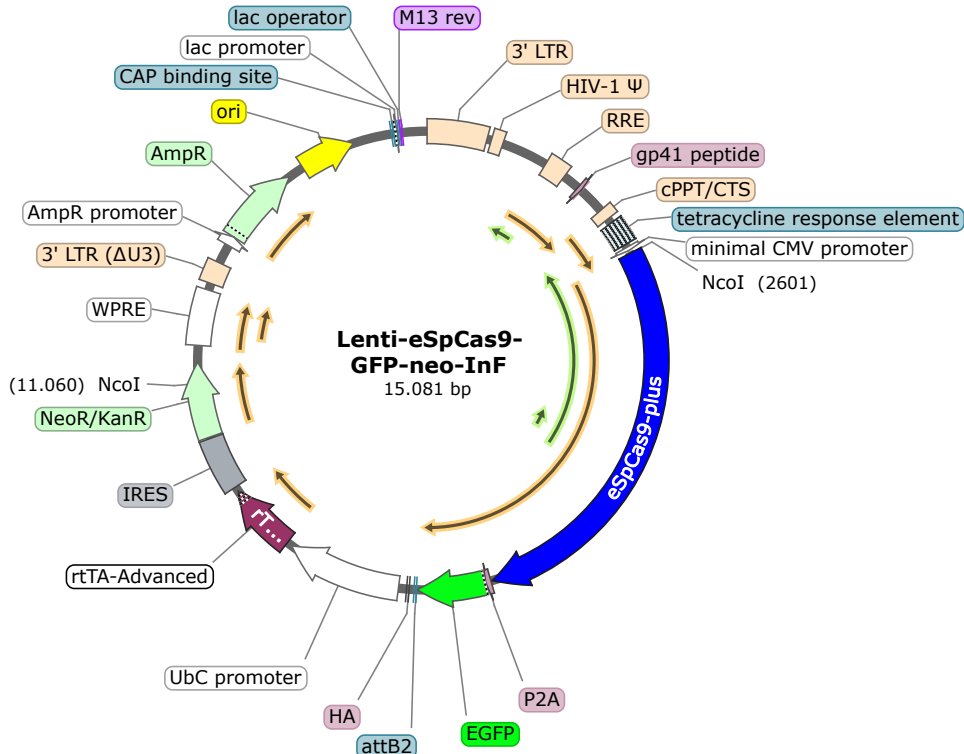
### **2.1 Desenho Experimental**

#### **2.1.1 Vetores Lentivirais e Estratégia de Edição Gênica**

Utilizou-se o sistema lentiviral de terceira geração para a produção das partículas virais, conforme descrito por (Dull et al., 1998). Este sistema de segurança aprimorada separa os componentes virais em quatro plasmídeos: dois de empacotamento, pMDLg/pRRE (Addgene #12251) e pRSV-Rev (Addgene #12253); um de envelopamento, pMD2.G (Addgene #12259), que codifica a proteína de envelope VSV-G; e o plasmídeo de transferência específico do experimento.

Para a expressão da nuclease Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), foi utilizado um vetor de transferência lentiviral customizado, cujo mapa detalhado é

apresentado na Figura 5. Este vetor foi construído utilizando o backbone do plasmídeo Lenti-iCas9-neo (Addgene #85400; CAO et al., 2016).



**Figura 5-Mapa do plasmídeo customizado de eSpCas9**

O vetor utiliza o sistema de expressão induzível Tet-On (Tetraciclina-On). Nele, um promotor composto pelo promotor mínimo CMV (pCMVmin) modificado por um elemento de resposta à tetraciclina (TRE) controla a transcrição de um único RNA mensageiro bicistrônico. Este transcrito codifica duas proteínas, unidas por uma sequência de peptídeo (P2A), a nuclease de CRISPR eSpCas9-Plus, de alta fidelidade (Kulcsár et al., 2020; Addgene #126767), e a proteína repórter enhanced green fluorescent protein (EGFP). Este desenho permite que a fluorescência da EGFP sirva como um indicador direto da indução e expressão concomitante da Cas9.

A adoção desta arquitetura de controle duplo é uma estratégia fundamental em estudos de edição gênica. A nuclease eSpCas9-Plus foi especificamente projetada para reduzir drasticamente a clivagem de DNA em sítios fora do alvo. O sistema Tet-On complementa essa especificidade, permitindo um controle temporal preciso da expressão, ativada pela tetraciclina ou seus análogos como a doxiciclina,

o que minimiza tanto a toxicidade celular quanto a incidência de edições ectópicas que poderiam ocorrer por expressão contínua da Cas9. O vetor (Figura 5) também contém o gene de resistência à neomicina (NeoR), controlado pelo promotor UbC, permitindo a seleção de células transduzidas com o antibiótico G418.

As sequências dos RNAs guia (gRNAs) para os genes-alvo deste estudo foram selecionadas com base na biblioteca genômica de CRISPR-Cas9 murina descrita por Shalem et al. (2013). Para cada um dos quatro genes de interesse, foram selecionadas três sequências candidatas de gRNA.

A Tabela 2 apresenta a lista completa dos gRNAs selecionados. O gRNA efetivamente utilizado para a clonagem e condução dos experimentos de edição gênica está devidamente destacado na tabela.

**Tabela 2-Sequências de gRNAs para os genes selecionados. As sequências em negrito e marcadas com asterisco indicam os gRNAs selecionados para a primeira rodada de clonagem e edição genômica**

Gene Alvo	ID do Guia	Sequência do gRNA (5' - 3')
<i>ITGAM</i>	<b>ITGAM-gRNA-A *</b>	<b>GTTTACCTGGTTCCGCCAAGC</b>
	ITGAM-gRNA-B	GACCTTCCAAGAGAATGCAAA
	ITGAM-gRNA-C	GAAGGACATATTCACAGCCTC
<i>ITGAX</i>	<b>ITGAX-gRNA-A *</b>	<b>GTGCTCCAGTATGATAGTTCC</b>
	ITGAX-gRNA-B	GTGTGATAGCCACATTTGTAG
	ITGAX-gRNA-C	GTAACCTCACCTGGAGGGAGA
<i>ITGB1</i>	<b>ITGB1-gRNA-A *</b>	<b>GAATGTCACCAATCGCAGCAA</b>
	ITGB1-gRNA-B	GTGCCATCCCTTTGCTGCGAT
	ITGB1-gRNA-C	GATTACTTCAGACTTCCGCAT
<i>ITGB2</i>	<b>ITGB2-gRNA-A *</b>	<b>GACTGTATCCAGTCGGGGCC</b>

	ITGB2-gRNA-B	GTAACCTTGAGCACGTGCCGAA
	ITGB2-gRNA-C	GCTCACCGATGCGGCCAGACT

Fonte: (Shalem et al., 2014)

## 2.2 Linhagens Celulares e Condições de Cultivo

Foram utilizadas três linhagens celulares. Para a produção das partículas lentivirais, empregou-se a linhagem de rim embrionário humano HEK293T (ATCC® CRL-3216™), linhagem de eleição para esta finalidade devido à sua alta eficiência de transfecção.

Para os experimentos de deleção gênica e ensaios subsequentes, utilizou-se a linhagem de macrófagos murinos J774.1 (ATCC® TIB-67™), modelo celular estabelecido para estudos de infecção por *Cryptococcus neoformans*.

As linhagens foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco™, Thermo Fisher Scientific), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco™) e 1% de Aminoácidos Não Essenciais (NEAA, Gibco™). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Além disso foi utilizada uma linhagem derivada de HEK293, chamada LV-MAX Viral Production Cells (VPC), adaptada a cultura em suspensão de alta densidade (Thermo Fisher Scientific), cultivadas no meio de produção LV-MAX numa estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 8% de CO<sub>2</sub> e agitação de 125 rpm conforme manual.

## 2.3 Produção de Partículas Lentivirais

### 2.3.1 Preparo e Amplificação dos Plasmídeos

Os plasmídeos, sintetizados comercialmente (Genscript), foram utilizados para a transformação de bactérias *Escherichia coli* competentes da linhagem NEB® Stable (New England Biolabs), utilizando o kit de transformação Mix & Go! (Zymo

Research). Colônias bacterianas transformadas foram selecionadas e cultivadas para a extração e purificação do DNA plasmidial em larga escala.

A purificação foi realizada com um kit de extração plasmidial livre de endotoxinas (EndoFree Plasmid Maxi Kit, QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante, visto que endotoxinas podem inibir a eficiência da produção lentiviral.

### **2.3.2 Produção de Lentivírus para Expressão de SpCas9**

As partículas lentivirais para a expressão de SpCas9 foram produzidas por transfecção mediada por lipofectamina, um método robusto e bem estabelecido para produção em pequena e média escala. Utilizou-se a linhagem HEK293T, com no máximo três passagens após o descongelamento. Para a transfecção, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma densidade que permitisse atingir 70-80% de confluência no dia seguinte.

Em uma cabine de segurança biológica nível 2, preparou-se o complexo de transfecção utilizando o reagente Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher Scientific). Em um tubo, diluiu-se 7 µL do reagente Lipofectamine™ 3000 em 250 µL de meio Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific). Em um segundo tubo, diluiu-se os plasmídeos em 250 µL de meio Opti-MEM™, adicionando 6 µL do reagente P3000™. Os plasmídeos foram misturados na proporção de 4:2:1:1 (pCas9:pMDLg/pRRE:pRSV-Rev:pMD2.G), conforme descrito por Kalidasan et al., (2021). O conteúdo do primeiro tubo foi adicionado ao segundo para formar o complexo lipídio-DNA, que foi incubado à temperatura ambiente por 15 minutos.

Metade do meio de cultura das células foi removido e o complexo de transfecção foi adicionado gota a gota. Após 6 horas de incubação (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), o meio foi substituído. O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado em 24 horas e 48 horas após a troca de meio, sendo armazenado a 4 °C entre as coletas.

Para a purificação, os sobrenadantes coletados foram centrifugados a 2.000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente para remover debris celulares. O sobrenadante foi filtrado em uma membrana de 0,45 µm PES com baixa ligação proteica (Kasvi).

Em seguida, adicionou-se uma solução de concentração viral (Kutner; Zhang; Reiser, 2009) na proporção de 1 parte de solução para 3 partes de sobrenadante. A mistura foi incubada por 4 horas a 4 °C sob agitação (60 RPM). Finalmente, a solução foi centrifugada a 1.600 x G por 1 hora a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet viral foi cuidadosamente ressuspensão em PBS 1X estéril, aliquotado e armazenado a -80 °C

### **2.3.3 Produção de Lentivírus para Expressão dos RNAs Guias (gRNAs)**

Para uma produção de maior rendimento e eficiência, a produção de lentivírus para os gRNAs foi realizada utilizando o sistema LV-MAX™ Lentiviral Production System (Thermo Fisher Scientific) conforme o manual. Em síntese, as células VPC foram cultivadas em meio LV-MAX™ Production Medium a 37 °C, com 8% de CO<sub>2</sub> e agitação orbital. Um dia antes da transfecção, a cultura (em frasco de 125 mL) foi diluída para atingir 3,5 x 10<sup>6</sup> células/mL, garantindo que estivessem em fase logarítmica de crescimento. No dia do procedimento, foram preparados 3mL de volume total de suspensão celular para a transfecção, com a densidade ajustada para 12 x 10<sup>6</sup> células viáveis/mL, e 150 µL do LV-MAX™ Supplement foi adicionado. O complexo de transfecção foi preparado misturando-se 18 µL do reagente de transfecção, 150 µL do meio Opti-MEM™ e os plasmídeos, nas seguintes quantidades: 3,7 µg do plasmídeo pLentiGuide-Puro de cada um dos guias, 1,89 µg de pMDLg/pRRE, 0,915 µg de pRSV-Rev e 1,10 µg de pMD2.G. Após 10 minutos de incubação, o complexo foi adicionado à cultura celular. Decorridas 6 horas de incubação, adicionou-se 120 µL do LV-MAX™ Enhancer. O sobrenadante viral foi coletado 48 horas após, centrifugado a 1.300 xg por 15 minutos e filtrado em membrana de 0,45 µm PES com baixa ligação proteica (Kasvi). As alíquotas foram armazenadas a -80 °C.

## **2.4 Geração e Validação da Linhagem J774.1 com Expressão de SpCas9**

### **2.4.1 Transdução da Linhagem J774.1**

As células J774.1 foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma confluência de 60-70%. No dia seguinte, as células foram transduzidas com o lentivírus Cas9 na presença de 8 µg/mL de polibreno (Sigma-Aldrich). Após 24 horas, o meio viral foi substituído por meio fresco, e as células foram incubadas por mais 24 horas antes do início da seleção.

### **2.4.2 Otimização do Protocolo de Seleção com G418**

A seleção celular foi iniciada com a adição de G418 (Gibco™) a 500 µg/mL. No entanto, observou-se que as células do controle negativo (não transduzidas) não apresentaram mortalidade, indicando uma falha na atividade do antibiótico.

A hipótese foi a possível degradação do lote de G418, que havia sido preparado previamente. Para determinar a concentração efetiva e validar um novo lote do antibiótico, foi realizado um ensaio de dose-resposta. Células J774.1 selvagens foram expostas a 250, 500 e 1000 µg/mL de G418 recém-preparado. As concentrações de 500 µg/mL e 1000 µg/mL foram capazes de eliminar 100% da população em 7 dias.

Com base nesses dados, a concentração de 500 µg/mL foi validada e utilizada para o protocolo de seleção definitivo. Após a repetição da transdução e aplicação do protocolo otimizado, o meio com G418 foi trocado a cada 48 horas. Após aproximadamente 7 dias, a população controle foi eliminada e colônias de células resistentes foram observadas, sendo posteriormente expandidas para a criação da linhagem J774.1-Cas9.

### **2.4.3 Tentativa de Validação da Expressão de SpCas9-EGFP**

Para validar a expressão da proteína de fusão SpCas9-EGFP, as células J774 selecionadas foram plaqueadas e cultivadas por 24 horas. Em seguida, foram induzidas com doxiciclina (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 1 µg/mL e 5 µg/mL, ou mantidas sem indutor (controle negativo), por mais 24 horas.

Para a coleta, o meio de cultura foi removido e as células foram descoladas utilizando Trypsina-EDTA (0,25%) (Thermo Fisher Scientific) por 5 minutos a 37 °C. A suspensão celular foi então transferida para tubos e centrifugada a 180 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet celular foi lavado com PBS 1X. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 400 µL de PBS 1X e mantidas no gelo, protegidas da luz, até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo BD FACSAria™ III, onde foram analisados 20000 eventos, utilizando os parâmetros FSC em 203 volts e SSC em 225 volts. A fluorescência da EGFP foi monitorada no canal Alexa 488 e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo™ v10.

## **2.5 Deleção dos Genes Alvo e Análise Fenotípica**

### **2.5.1 Geração de Linhagens Duplamente Transduzidas**

Previamente à seleção das linhagens, a eficácia da puromicina (Gibco™) foi avaliada mediante um ensaio de dose-resposta em células J774.1 selvagens (parentais). As células foram expostas a concentrações crescentes do antibiótico (1, 3 e 5 µg/mL), visando determinar a concentração mínima necessária para a eliminação completa da população não resistente. A concentração de 3 µg/mL demonstrou ser a mais eficaz, promovendo mortalidade celular de aproximadamente 100% em um período de sete dias.

Em seguida, a linhagem J774.1-Cas9 foi submetida a uma nova rodada de transdução com partículas lentivirais carreadoras dos gRNAs. A seleção das células duplamente editadas foi realizada utilizando-se o marcador de resistência presente no vetor de gRNA, empregando-se a puromicina na concentração previamente

otimizada de 3 µg/mL. O uso do G418 foi mantido para que as células não expulsassem o plasmídeo de Cas9 inserido anteriormente.

### **2.5.2 Indução da Deleção Gênica**

Para induzir a atividade da nuclease Cas9 e a consequente deleção gênica, as células duplamente selecionadas foram tratadas com doxiciclina (1 µg/mL) por 48 horas. Em seguida, a cultura foi mantida por mais 48-72 horas em meio sem o indutor para permitir a degradação da proteína alvo.

### **2.5.3 Titulação de Anticorpos para Análise por Citometria de Fluxo**

A concentração ótima de cada anticorpo para a detecção das proteínas de superfície foi determinada por titulação. As células foram marcadas com os seguintes anticorpos: anti-CD11b (clone REAfinity™, Miltenyi Biotec), anti-CD11c (clone REAfinity™, Miltenyi Biotec), anti-CD18 (clone REAfinity™, Miltenyi Biotec) e anti-CD29 (clone eBioHMb1-1, eBioscience™), todos biotinizados, além do anti-CD29 já conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor® 647 (clone 102214, BioLegend). A detecção dos anticorpos biotinizados foi feita com Estreptavidina-Alexa Fluor™ 647 (Thermo Fisher Scientific).

Para a titulação, uma diluição seriada dos anticorpos foi preparada em solução de bloqueio (PBS 1X e 1% Albumina). Alíquotas de  $5 \times 10^5$  células foram incubadas com as diferentes concentrações por 1 hora em gelo, seguidas de duas lavagens com 1mL de PBS 1X gelado, em seguida o pellet celular foi ressuspenso com uma solução de Estreptavidina-Alexa Fluor™ 647 e incubado no gelo por 30 minutos. Após a incubação foi feita uma última lavagem com PBS 1X gelado, e, por fim, ressuspenso em 300 µL de PBS 1X. Os tubos foram levados ao citômetro fluxo BD LSRFortessa™ onde foram coletados 20000 eventos utilizando os parâmetros FSC em 203 volts e SSC em 225 volts.

A concentração que forneceu a melhor separação entre a população positiva e o controle não marcado foi selecionada para os experimentos subsequentes.

#### **2.5.4 Análise da Deleção das Proteínas de Superfície**

As células (linhagens modificadas induzidas e controles do tipo selvagem) foram coletadas, lavadas com PBS 1X gelado e ressuspensas em solução de bloqueio a uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  células/mL. Alíquotas de 90  $\mu$ L (aprox.  $1,35 \times 10^5$  células) foram incubadas com 10  $\mu$ L da solução de trabalho de cada anticorpo, na concentração de 3,125  $\mu$ g/mL para o Anti-CD29, 0,75  $\mu$ g/mL para o Anti-CD11b e 3  $\mu$ g/mL para o Anti-CD18 e o Anti-CD11c por uma hora no gelo protegidas da luz. Após isso foram feitas duas lavagens com PBS 1X gelado, e as células foram incubadas com 10  $\mu$ L de Estreptavidina-AF647 na concentração de 5  $\mu$ g/mL por 30 minutos no gelo protegidas da luz. Por fim, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado, ressuspensas em 400  $\mu$ L de PBS e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ no canal APC-A com os mesmos parâmetros da titulação. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo™ v10.

#### **2.6 Levantamento de Dados de Mortalidade no DATASUS**

Para dimensionar o contexto da mortalidade associada à criptococose no Distrito Federal, foi realizado um levantamento de dados secundários de domínio público. A fonte de dados consultada foi o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), acessado através da plataforma TABNET, mantida pelo Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS).

A coleta de dados foi delimitada aos registros de óbito de residentes no Distrito Federal que continham "Criptococose" (CID-10: B45) como causa básica de morte.

A consulta foi segmentada para extrair informações sobre variáveis específicas em períodos distintos, com as variáveis faixa etária e gênero sendo levantadas no período de 2013 a 2024 e a variável escolaridade de 2000 a 2024.

Os dados brutos obtidos na plataforma TABNET foram exportados, organizados e tabulados em planilhas eletrônicas. A análise subsequente consistiu na consolidação dessas informações e na elaboração de tabelas síntese para

apresentar de forma estruturada o perfil e as tendências de mortalidades observadas no período.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Perfil Epidemiológico da Mortalidade por Criptococose no Distrito Federal (2013–2024)

Usando os dados encontrados no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) foram encontradas 18 mortes por criptococose em residentes do Distrito Federal, sendo que 11 dessas mortes eram de homens e 7 eram de mulheres.

Quando analisamos a distribuição das mortes por faixa etária, tivemos uma ampla distribuição conforme visto na tabela 3. Chama a atenção que a maioria das mortes se concentra a partir dos 50 anos.

Quanto à questão da escolaridade, tivemos uma distribuição mais centrada nas pessoas com baixa escolaridade, conforme visto na tabela 4. Ao analisarmos mais a fundo vemos que esse padrão permanece desde os anos 2000, totalizando 18 mortes de pessoas com Ensino Fundamental ou menos, como visto na tabela 5.

**Tabela 3 – Mortalidade por faixa etária entre 2013-2024**

Faixa Etária	Mortes
15-19	1
20-29	1
30-39	1
40-49	3
50-59	4
60-69	3
70-79	4
80+	1

**Tabela 4 – Mortalidade por escolaridade entre 2013-2024**

Escolaridade	Mortes
Analfabeta	1
Ensino Infantil	3
Ensino Fundamental	7
Ensino Médio	5
Ensino Superior	1
Não Informado	1

**Tabela 5 – Mortalidade por escolaridade entre 2000-2024**

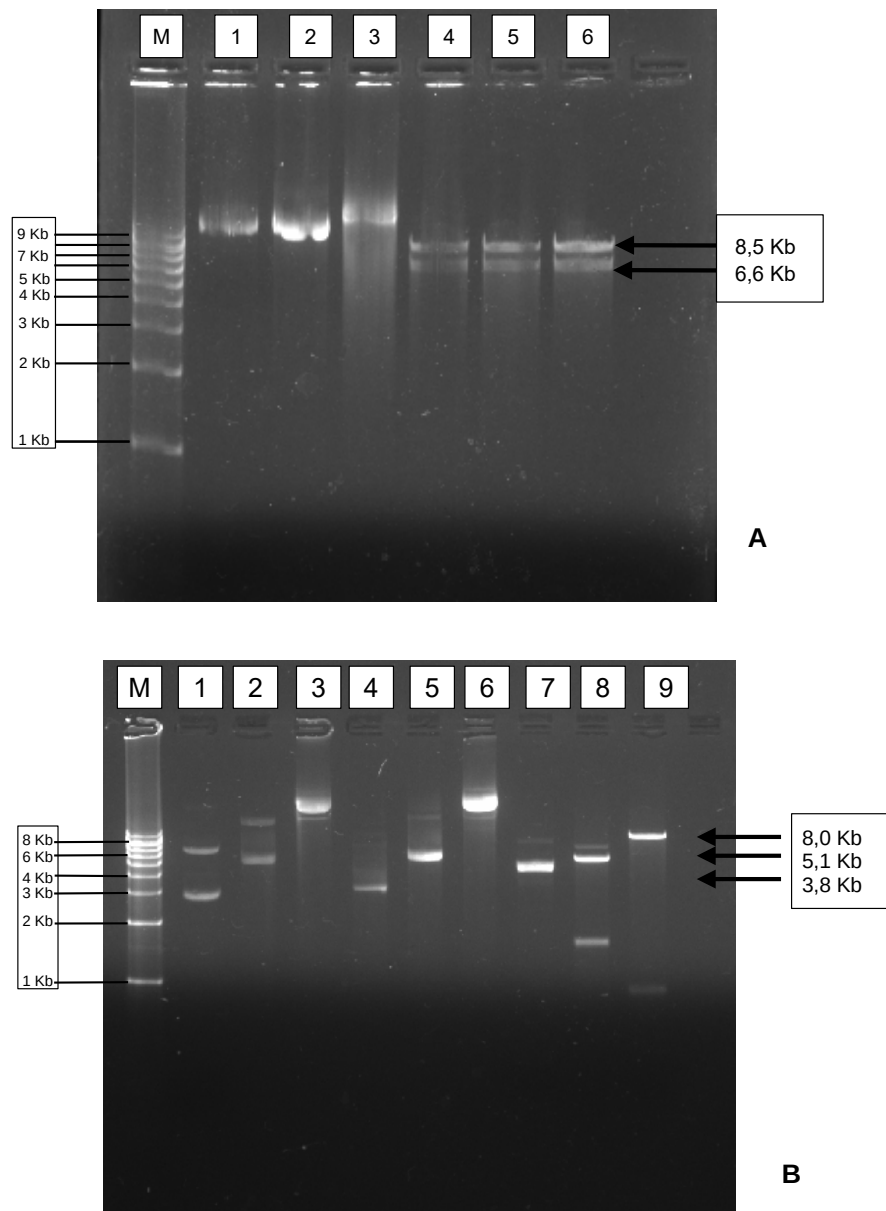
Escolaridade	Mortes
Analfabeta	2
Ensino Infantil	6
Ensino Fundamental	10
Ensino Médio	9
Ensino Superior	1
Não Informado	1

### **3.2 Validação dos Plasmídeos para Produção Lentiviral**

Após a extração via Miniprep, a identidade e a integridade de todos os plasmídeos foram verificadas por digestão com enzimas de restrição (análise de RFLP). As reações foram preparadas em duplicata e os fragmentos resultantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

O plasmídeo de expressão da Cas9 foi digerido com a enzima NcoI. A análise (Figura 6A) confirmou a integridade do vetor, revelando os fragmentos com os tamanhos esperados de 8,5 kb e 6,6 kb.

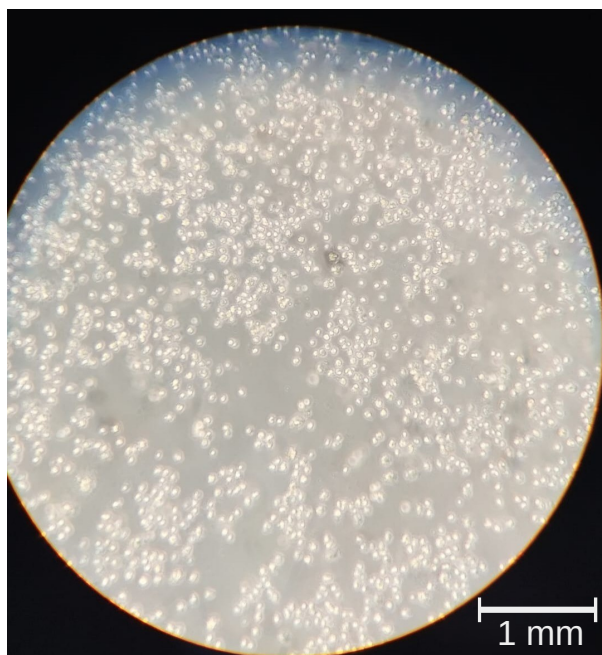
Os plasmídeos de empacotamento e envelope foram analisados de forma análoga (Figura 6B). O plasmídeo pMDLg/pRRE foi digerido com BamHI, resultando em fragmentos de 8 kb e 827 pb. O plasmídeo pRSV-Rev foi digerido com EcoRI, gerando fragmentos de 3,8 kb e 311 pb. Por fim, o plasmídeo pMD2.G foi submetido a uma digestão dupla com HindIII e PvuI, resultando nos fragmentos esperados de 5,1 kb e 712 pb.



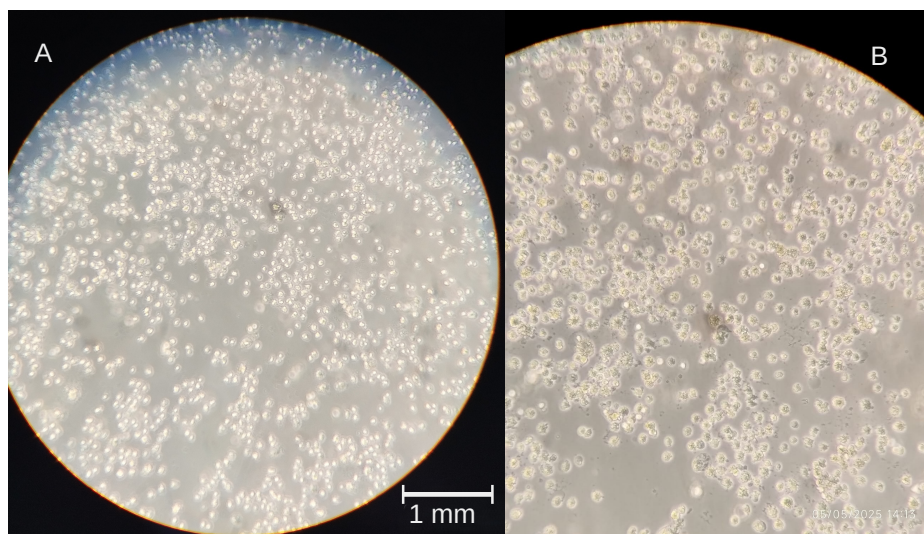
**Figura 6:** Gel de agarose, em A temos o Plasmídeo de Cas9 inteiro em 1,2 e 3 e ele digerido em 4,5 e 6. Já em B temos 1,4 = pRSV; 2,5 = pMD2G; 3,6 = pMDLg; 7 = pRSV Digerido; 8 = pMD2G Digerido 9 = pMDLg Digerido.

### 3.3 Otimização do Protocolo de Seleção de Células Transduzidas

A primeira tentativa de seleção de células J774 transduzidas com lentivírus Sp-Cas9, utilizando G418 a 500  $\mu\text{g/mL}$ , não obteve sucesso. Foi observado crescimento confluyente tanto no grupo de células transduzidas quanto no grupo controle negativo (células não transduzidas), indicando uma falha na atividade do antibiótico (Figura 7). A hipótese levantada foi a possível degradação do antibiótico, que havia sido preparado em 2019. Para validar essa hipótese e determinar a concentração mínima efetiva, um novo ensaio de mortalidade foi realizado com um lote recém-preparado de G418. As concentrações de 500  $\mu\text{g/mL}$  e 1000  $\mu\text{g/mL}$  conseguiram eliminar a população de células controle em 7 dias, enquanto a concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  necessitou de 14 dias (Figura 8). Com base nestes dados, a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  foi definida como ótima para os protocolos de seleção subsequentes.



**Figura 7: J774 WT com G418 velho por 10 dias. Ocular de 4X com escala aproximada de 1 mm.**



**Figura 8: J774 WT com G418 Novo A) Dia 1 com ampliação de 4X B) Dia 4 com ampliação de 10X. Escala aproximada de 1 mm**

### **3.4 Obtenção de Células J774 Resistentes após Seleção Otimizada**

Após a repetição da transdução e aplicação do protocolo de seleção otimizado com G418 a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , observou-se uma mortalidade celular massiva nos primeiros dias. Após aproximadamente 7 dias de seleção, a cultura controle foi eliminada, enquanto na cultura transduzida foi possível observar o surgimento de colônias (ilhas) de células sobreviventes, indicando que estas haviam integrado com sucesso o cassete de resistência ao G418 e, conseqüentemente, o sistema Sp-Cas9 (Figura 9).



**Figura 9: Ilhas de Células sobreviventes a seleção. Aumento em 4X e escala aproximada de 1 mm**

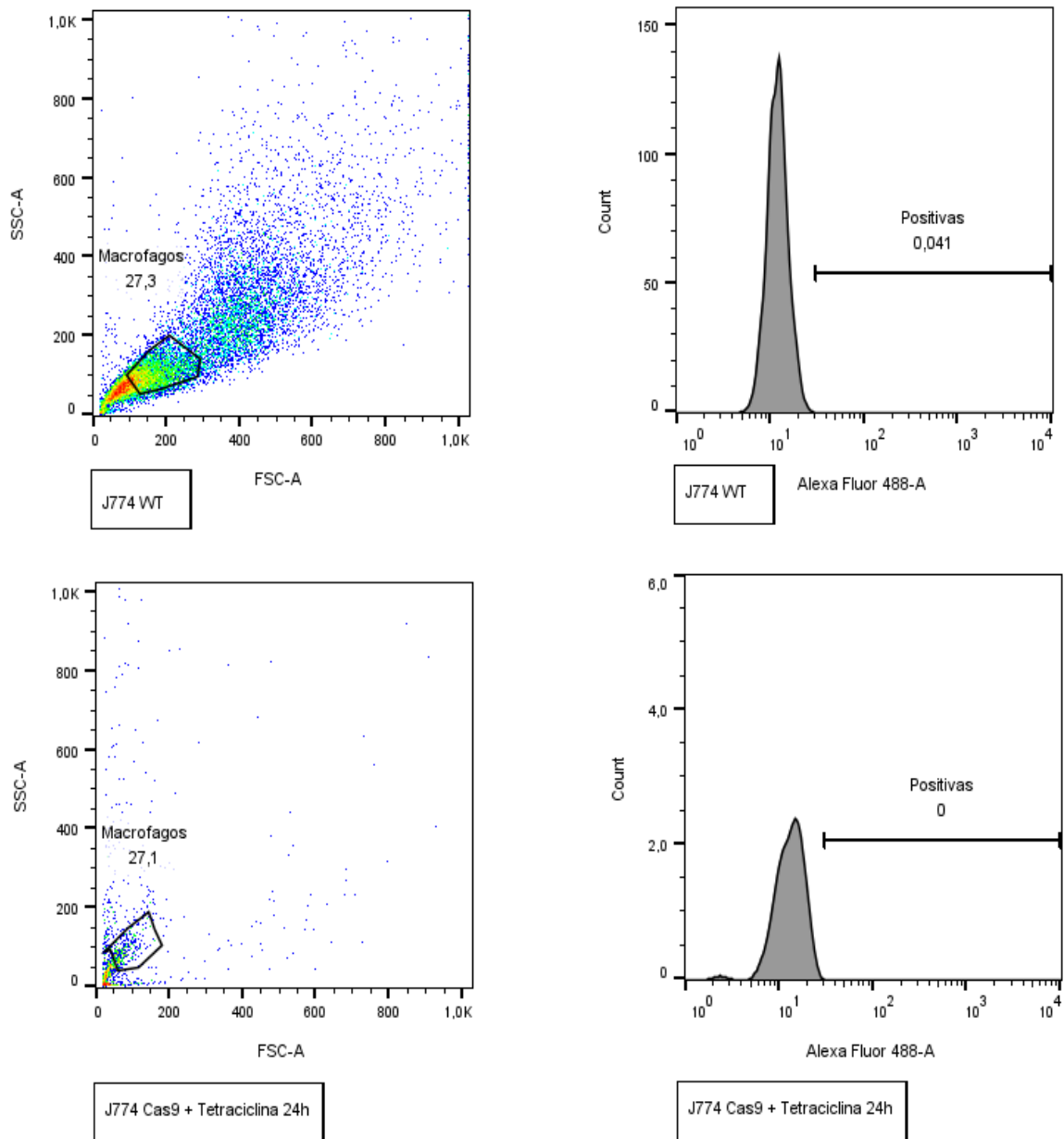
### 3.5 Falha na Detecção da Expressão Induzível de Cas9-EGFP

Após a seleção positiva com G418, buscou-se validar a expressão induzível do transgene. Conforme detalhado na Metodologia, o vetor de expressão da Cas9 desenvolvido neste trabalho (baseado no backbone Lenti-iCas9-neo) foi desenhado para expressar um único RNA mensageiro bicistrônico (via sequência P2A) que codifica tanto a nuclease SpCas9Plus quanto a proteína repórter EGFP. Desta forma, a detecção da EGFP por citometria de fluxo foi escolhida como o método de validação inicial, por representar uma verificação fenotípica da expressão proteica mais rápida e direta do que investigações moleculares, como Western Blot ou RT-qPCR.

A primeira tentativa de indução com Tetraciclina foi analisada por citometria de fluxo, monitorando a fluorescência no canal Alexa 488. Contudo, esta análise foi inconclusiva. A análise dos gráficos de dispersão de luz revelou que a vasta maioria dos eventos se concentrava próxima à origem dos eixos (0,0), um padrão indicativo de alta mortalidade celular e detritos, o que foi atribuído ao método de coleta mecânica por raspagem (Figura 10).

O ensaio foi, então, repetido utilizando Doxíciclina como indutor e um método de coleta mais brando, utilizando tripsina-EDTA (0,25%). Mesmo sob estas condições otimizadas, a análise no canal Alexa 488 não resultou na detecção de uma população EGFP positiva acima dos níveis observados no controle não induzido, mesmo em diferentes concentrações do indutor (Figura 11).

Apesar da aparente ausência de sinal de EGFP, a sobrevivência robusta e consistente das células à seleção com G418 foi considerada uma forte evidência indireta da presença e integração do transgene. Diante deste dado de seleção positivo, tomou-se a decisão estratégica de prosseguir para a etapa seguinte de transdução com os RNA guias, para avaliar a funcionalidade final do sistema (a edição gênica) antes de retornar à investigação molecular da falha de expressão do repórter.



**Figura 10-Análise de Citometria com alta mortalidade celular conforme mostrado pelo agrupamento de eventos próximo ao eixo 0,0. Ao lado vemos o histograma mostrando a fluorescência da EGFP pelo canal Alexa Fluor 488-A**

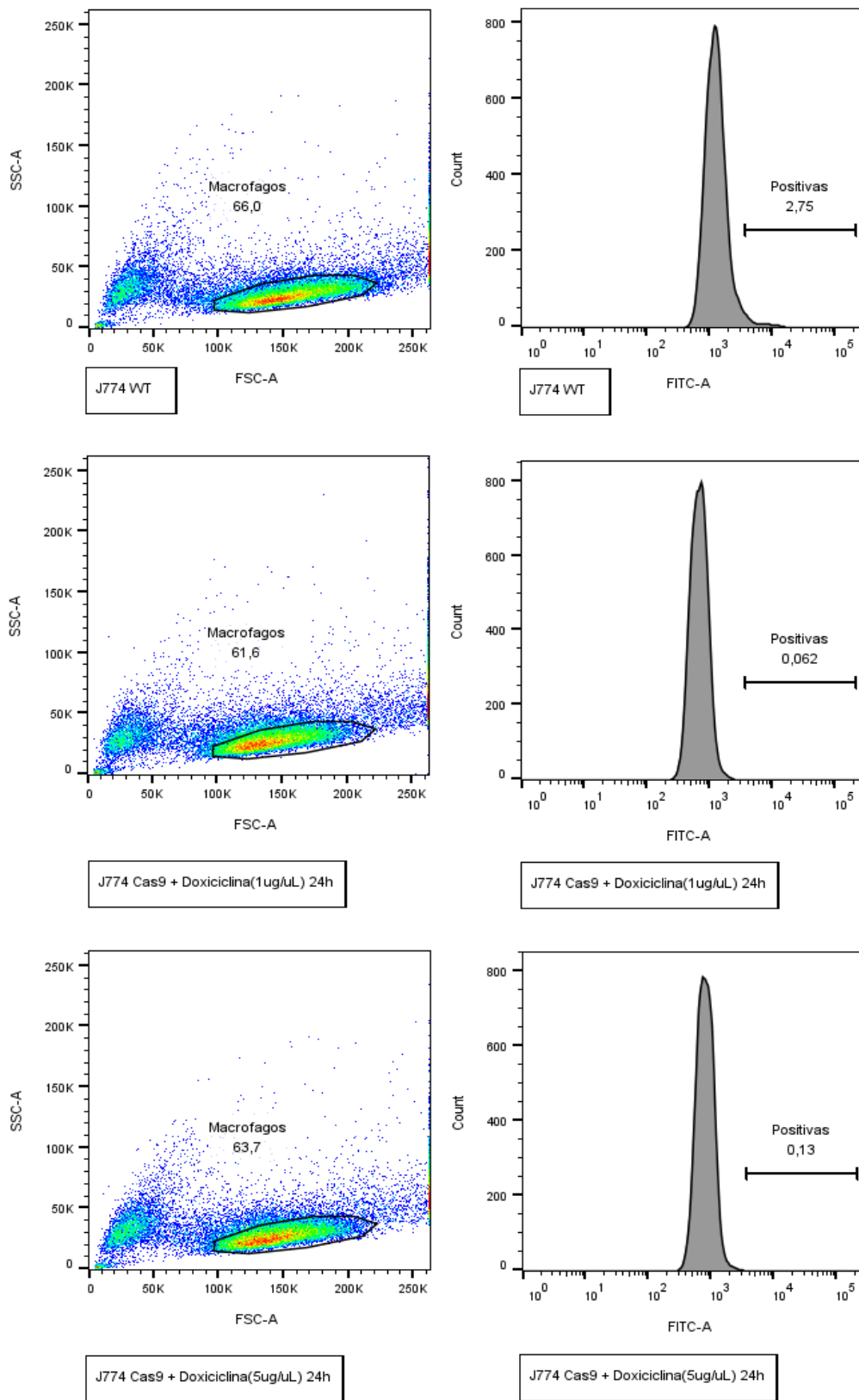


Figura 11-Análise de Citometria com células viáveis, ao lado vemos o histograma mostrando a fluorescência da EGFP pelo canal FITC-A

### 3.6 Obtenção de Células Duplamente Resistentes após Seleção com Puromicina

Após a transdução das células J774-Cas9 e seleção com Puromicina, observou-se um perfil de seleção similar ao obtido com G418: mortalidade inicial da maior parte da população a partir de 7 dias de tratamento, seguida pelo surgimento de colônias resistentes expandidas com sucesso (Figura 12).

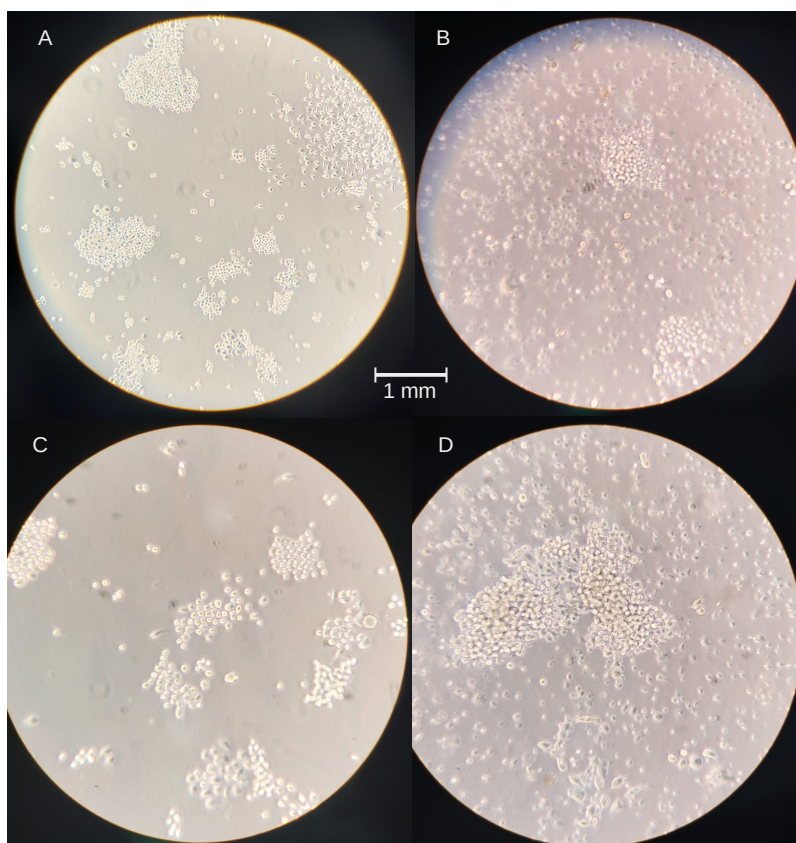


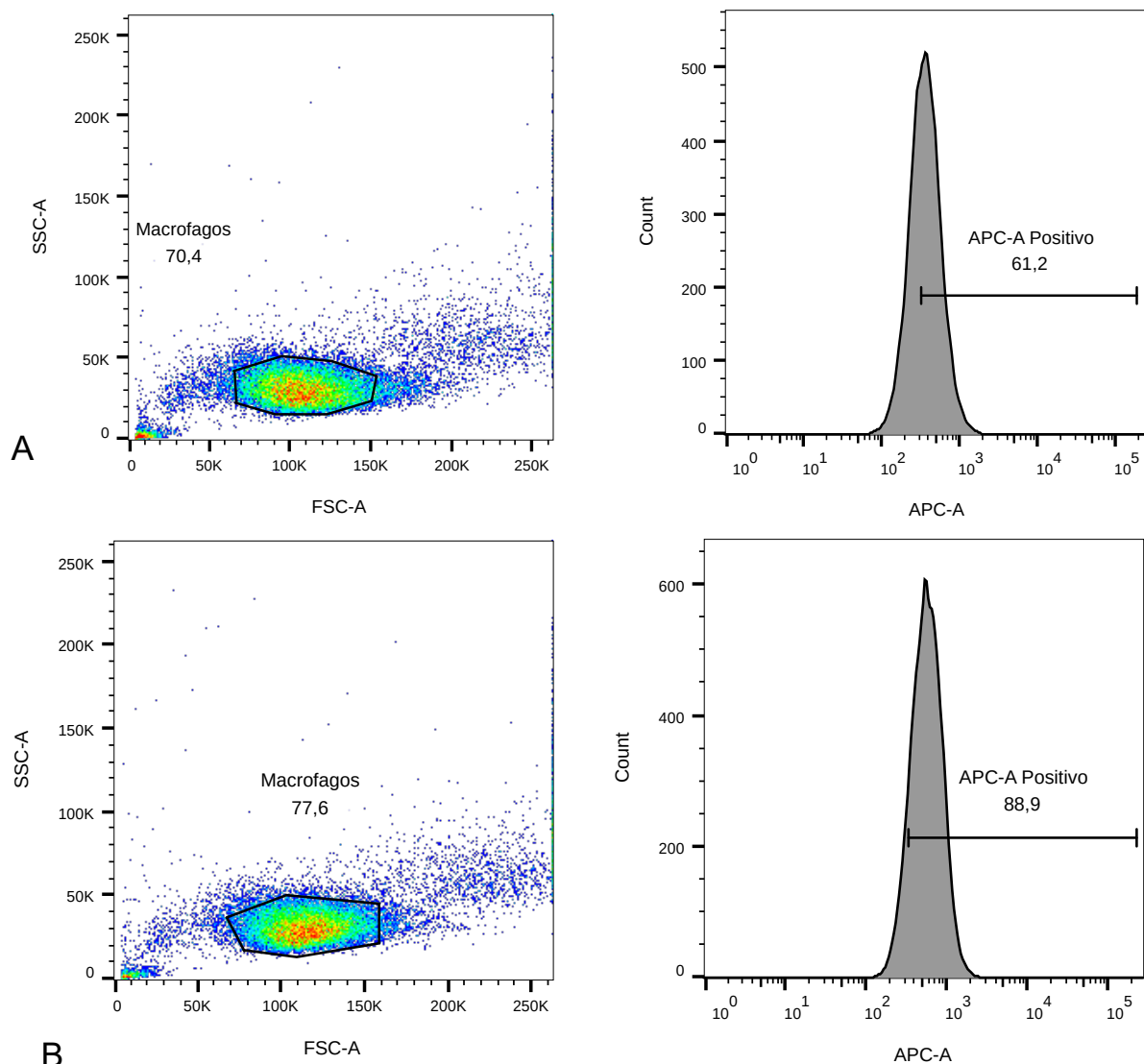
Figura 12: Seleção de Células. A) ITGAM B)ITGAX C)ITGB1 D)ITGB2. Aumento em 4X e escala aproximada de 1 mm

### 3.7 Titulação de Anticorpos Sugere Baixa Expressão Basal de ITGB2 e ITGAX

Durante a padronização da análise fenotípica, observou-se que os anticorpos anti-ITGB2 (CD18) e anti-ITGAX (CD11c) demandaram concentrações maiores para a obtenção de uma resolução de sinal adequada em comparação aos demais alvos. Enquanto as concentrações para anti-ITGB1 (CD29) e anti-ITGAM (CD11b) foram

estabelecidas em 0,3125  $\mu\text{g/mL}$  e 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, os clones anti-ITGB2 e anti-ITGAX exigiram 3  $\mu\text{g/mL}$ .

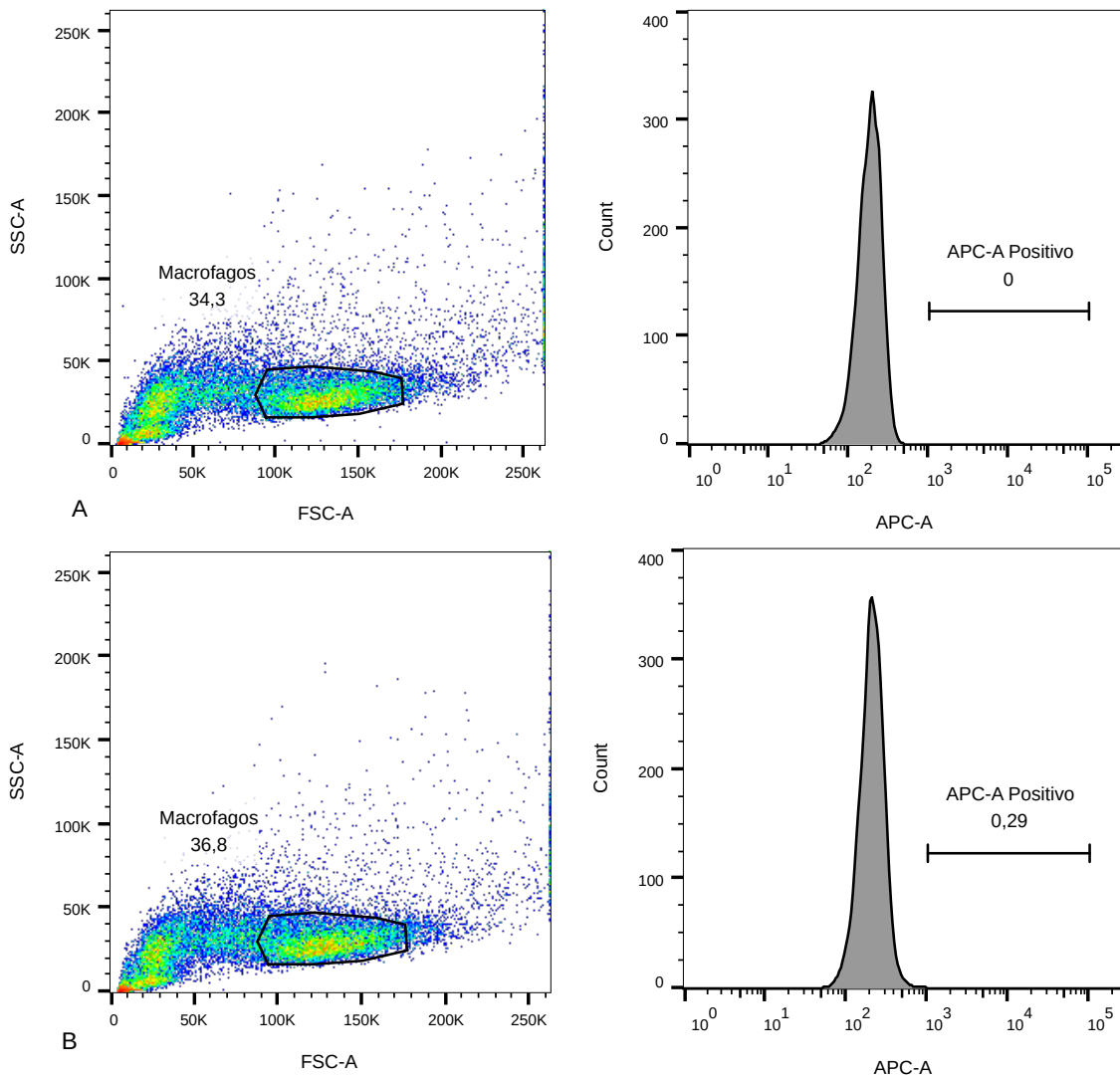
Ressalta-se que a necessidade de uma maior carga de anticorpo não implica necessariamente uma expressão proteica reduzida, visto que a dinâmica de marcação é influenciada pela afinidade intrínseca de ligação dos anticorpos pelos seus respectivos epítodos. Contudo, o ajuste criterioso dessas concentrações foi fundamental para assegurar a acurácia da análise de deleção subsequente (Figura 13).

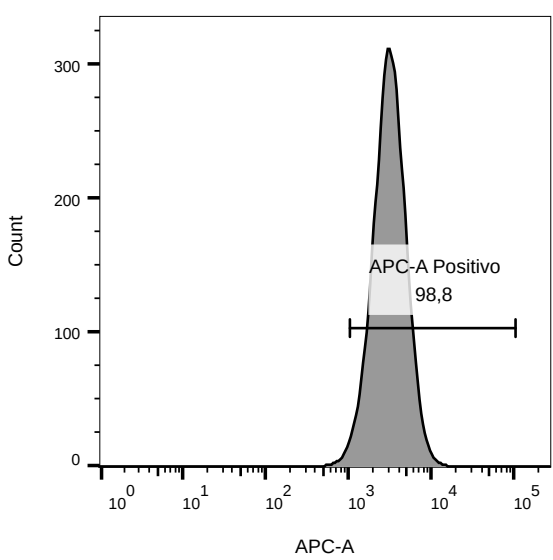
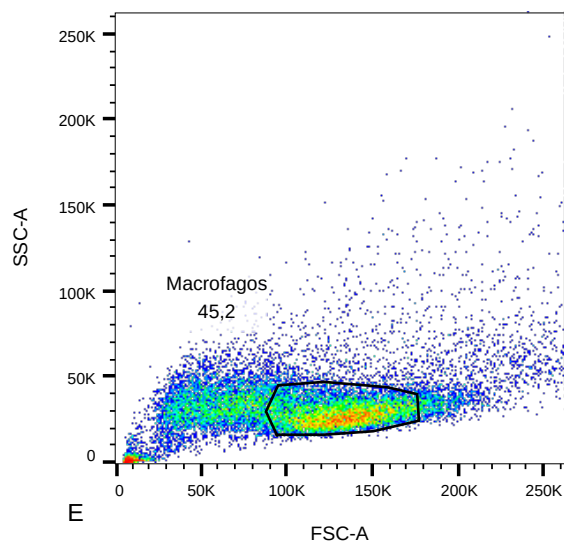
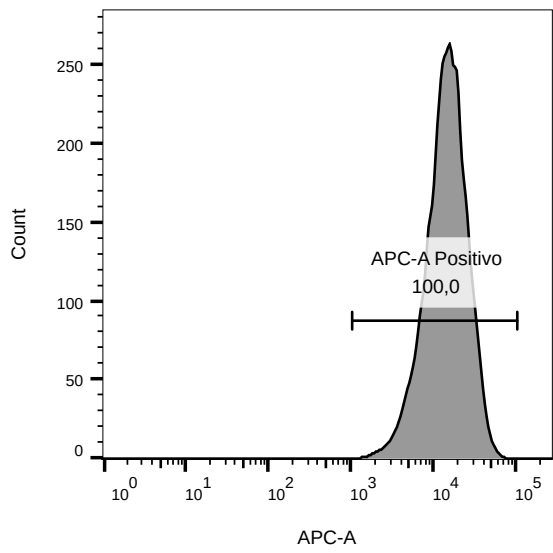
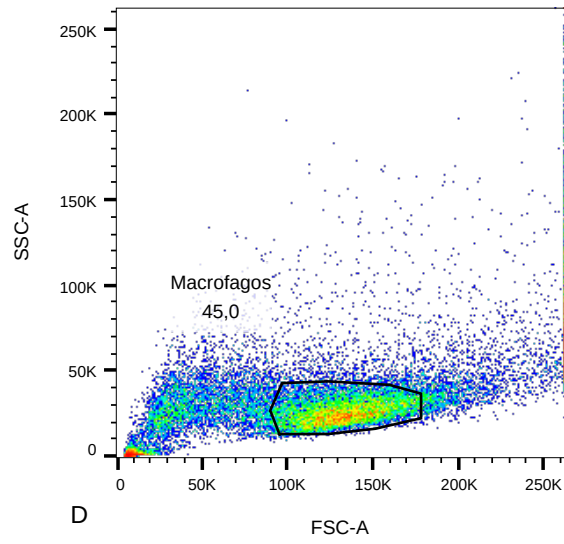
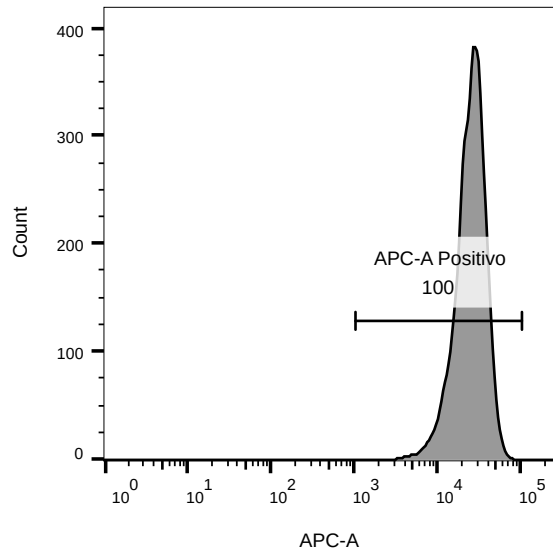
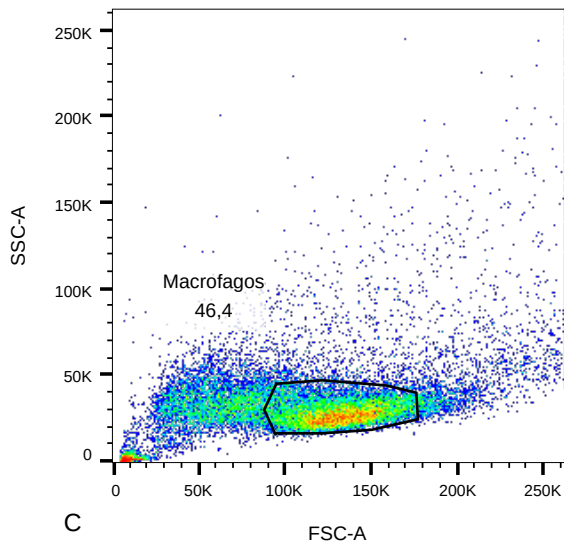


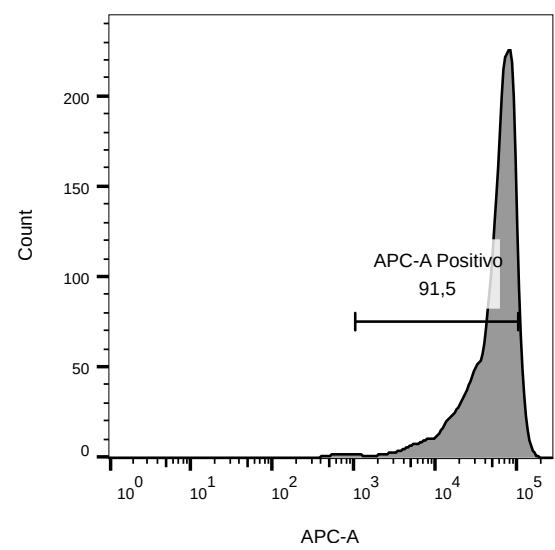
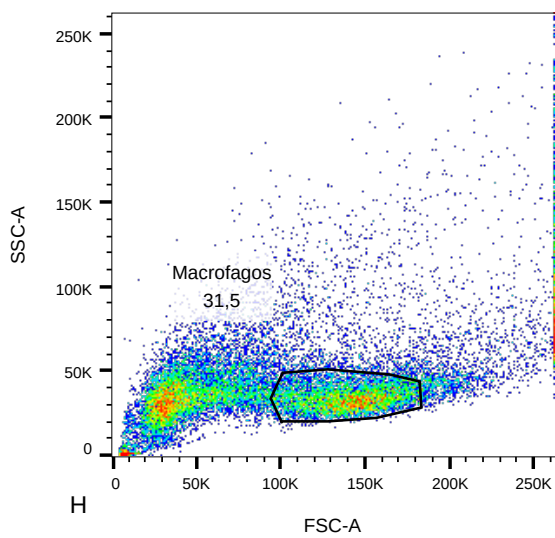
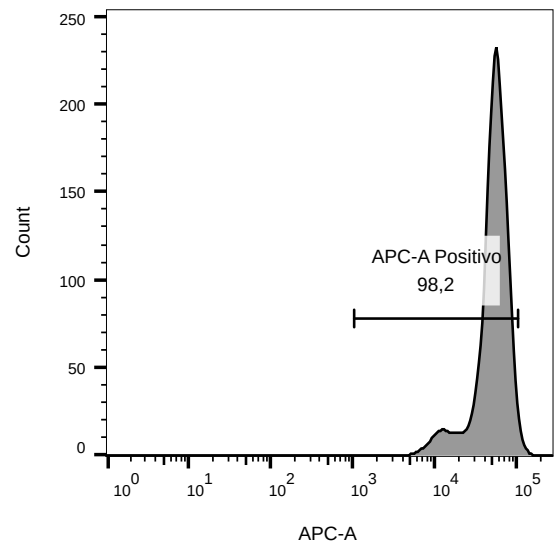
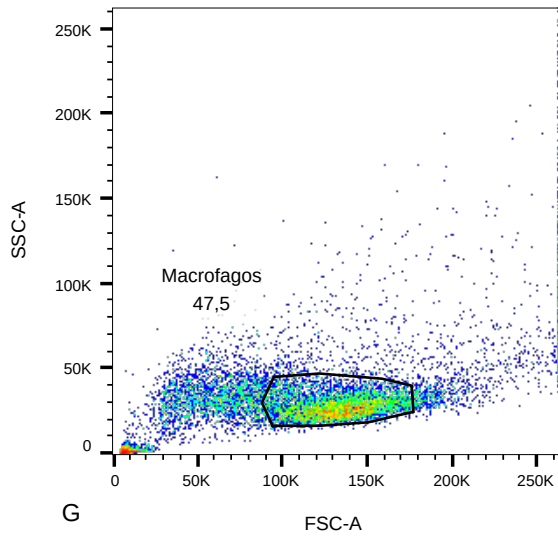
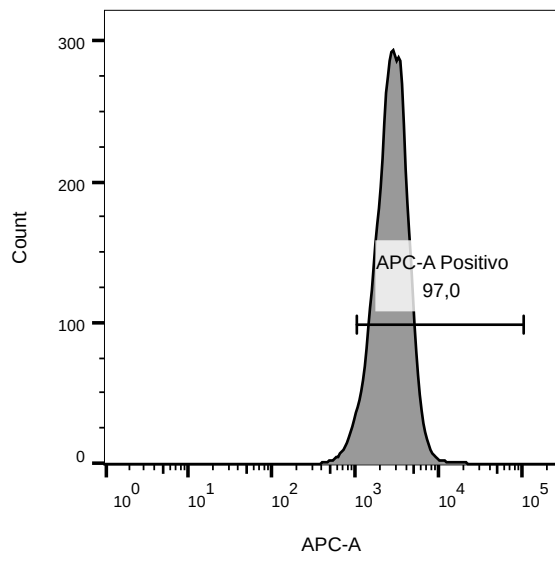
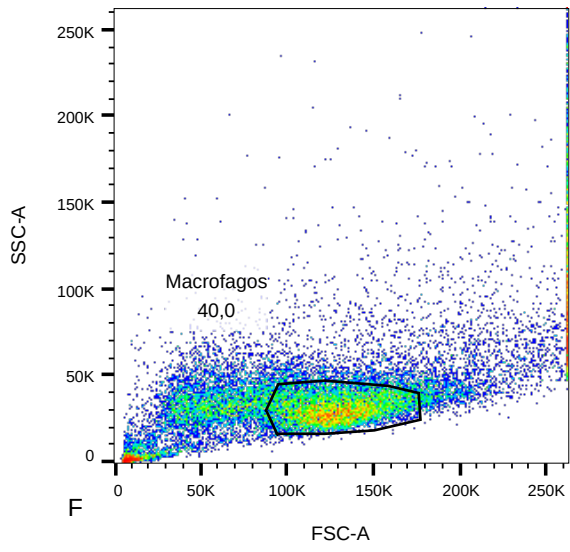
**Figura 13: Análise de Titulação dos anticorpos nas concentrações de 3  $\mu\text{g/mL}$ . Em A temos CD18 e em B temos CD11c**

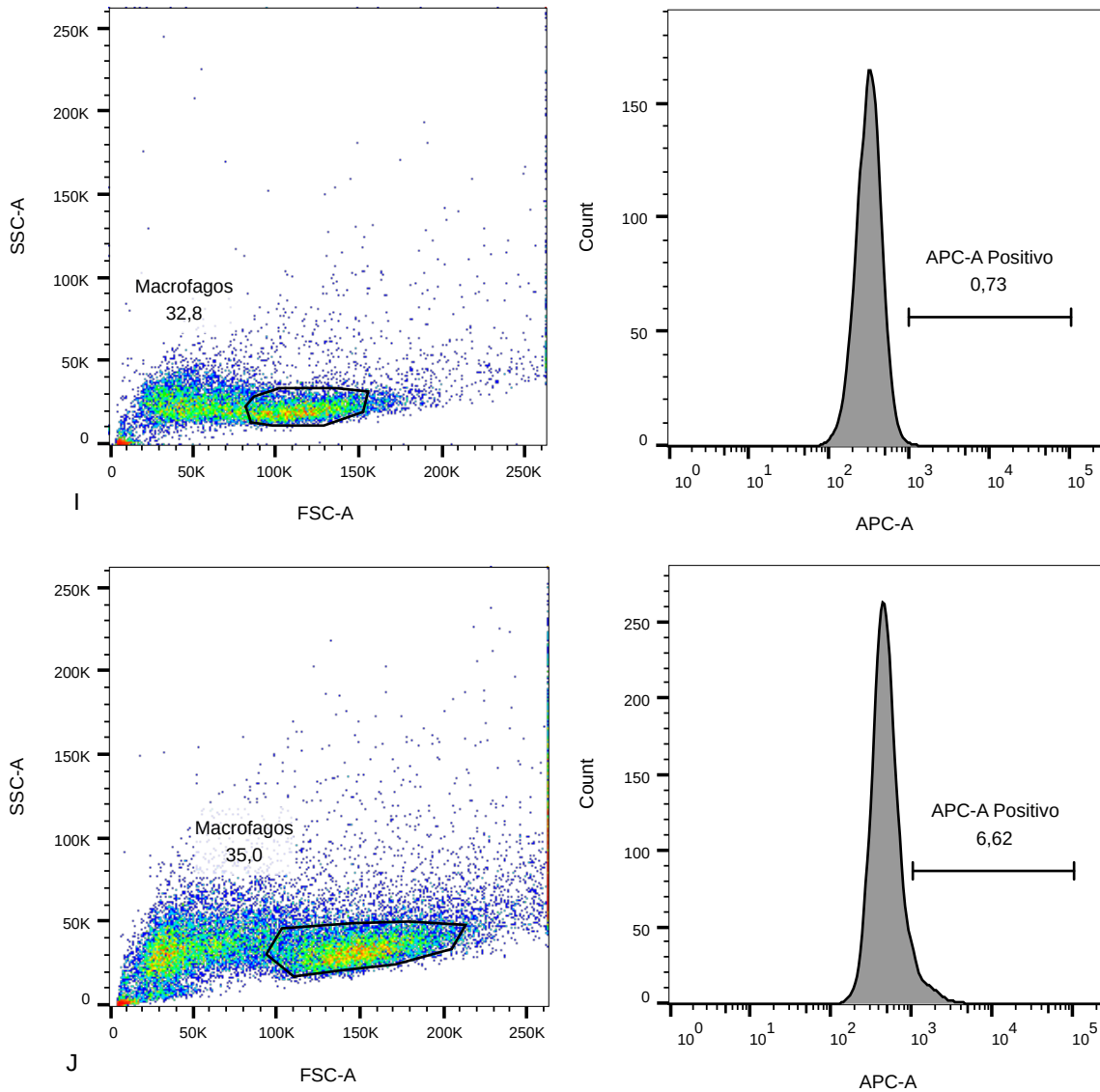
### 3.8 Análise da Deleção Gênica Demonstra Ausência de Knockout Efetivo

Após a indução final com doxiciclina, a análise por citometria de fluxo das populações celulares não revelou uma diminuição significativa na expressão de superfície de nenhuma das integrinas alvo (ITGAM, ITGAX, ITGB1 ou ITGB2) quando comparada à população controle não induzida (Figura 12). Os histogramas das populações induzida e não induzida se sobrepuseram quase que completamente, indicando que a deleção gênica não foi eficiente sob as condições testadas.









**Figura 14: Análise de deleção dos genes via citometria de fluxo. À direita temos os gráficos de dispersão de eventos com o gate marcado para as células analisadas, na esquerda temos um histograma para a Estreptomicina-Alexa Fluor 647 no canal do APC-A. A) Controle Celular; B) Controle Estreptomicina-Alexa Fluor 647; C) Análise do ITGAM na J774 WT; D) Análise do ITGAM na J774 Del; E) Análise do ITGAX na J774 WT; F) Análise do ITGAX na J774 Del; G) Análise do ITGB1 na J774 WT; H) Análise do ITGB1 na J774 Del; I) Análise do ITGB2 na J774 WT e J) Análise do ITGB2 na J774 Del**

#### 4. DISCUSSÃO

A análise dos dados epidemiológicos disponíveis sugere que a criptococose se mantém como um relevante agravo de saúde pública, com aparente impacto sobre populações de maior vulnerabilidade socioeconômica. A natureza dos dados analisados, provenientes do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), limita as informações disponíveis, pois não conseguimos saber o histórico prévio do paciente. Considerando a limitação amostral não podemos fazer análises estatísticas, contudo observamos uma tendência de aumento da taxa de mortalidade em indivíduos a partir dos 50 anos. Este é um padrão que levanta a hipótese de uma possível correlação com o declínio funcional do sistema imune associado à idade, a imunossenescência.

A dificuldade em traçar um perfil epidemiológico exato a partir das bases de dados atuais, que dependem do registro do óbito e não da incidência da doença, ressalta a necessidade de se debater a instituição da criptococose como uma doença de notificação compulsória. Tal medida permitiria um monitoramento em tempo real, uma melhor compreensão da real carga da doença e o direcionamento mais eficaz de políticas de saúde pública para os grupos de risco identificados.

Adicionalmente, duas tendências demográficas e clínicas convergem para delinear um futuro cenário de risco. O envelhecimento progressivo da população geral, somado ao aumento da sobrevivência e, conseqüentemente, ao envelhecimento da população que vive com HIV devido à eficácia da terapia antirretroviral, aponta para a emergência de um novo e crescente grupo populacional vulnerável às formas graves da doença. Este panorama epidemiológico reforça a urgência da elucidação dos mecanismos moleculares da interação patógeno-hospedeiro, alvo do presente estudo, visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Para abordar esta questão utilizando a linhagem de macrófagos J774 como modelo, foi necessário superar desafios técnicos significativos, uma vez que a dificuldade na expressão de proteínas exógenas nestas células é um obstáculo documentado. Sangsri et al., (2020), por exemplo, relataram morte celular massiva ao tentar transfectar diretamente plasmídeos de Cas9 e gRNAs em células J774 utilizando Lipofectamina 3000. Alternativas bem-sucedidas em outras linhagens de

macrófagos incluem o uso de métodos não virais, como a eletroporação em células RAW 264.7 (Hossain; O'Connor, 2024), ou a co-incubação de lentivírus com partículas Vpx para transdução de macrófagos derivados de iPSC (Navarro-Guerrero et al., 2021).

Uma análise comparativa dos componentes genéticos utilizados nesses protocolos de sucesso revela um elemento em comum: o uso do promotor EF1 $\alpha$  (elongation factor-1 alpha) para controlar a expressão da Cas9. Park et al., (2022) demonstraram que a substituição do promotor mínimo CMV pelo EF1 $\alpha$  resultou em um aumento drástico da expressão de Cas9 em macrófagos derivados de iPSC. De forma análoga, os plasmídeos utilizados tanto por Navarro-Guerrero et al., (2021) quanto por Hossain; O'Connor, (2024) também continham o promotor EF1 $\alpha$ , que demonstrou um perfil de atividade superior a outros promotores nessas células.

Diante dessas evidências, levanta-se a hipótese de que o componente promotor do nosso sistema de indução — especificamente, o promotor mínimo CMV (pCMVmin) que opera em conjunto com o Tetracycline-Responsive Element (TRE) no sistema Ptet — tenha sido o ponto de falha, sofrendo silenciamento epigenético nas células J774. Esta hipótese é sustentada por relatos de que o silenciamento de promotores virais, incluindo o CMV, é um evento conhecido em contextos de integração lentiviral, podendo ocorrer por mecanismos como a metilação de ilhas CpG (Herbst et al., 2012) ou alterações na estrutura da cromatina. O fenômeno do silenciamento do Ptet explicaria a principal contradição observada nos resultados: as células se tornaram resistentes ao antibiótico G418 (controlado por um promotor distinto), mas não expressaram Cas9 e EGFP, cujas sequências estavam sob o controle deste sistema induzível.

## **5. CONCLUSÃO**

O presente trabalho logrou êxito no estabelecimento e na otimização de um protocolo para a geração de linhagens celulares J774 duplamente estáveis, demonstrando a viabilidade da seleção sequencial por múltiplos antibióticos. Contudo, conclui-se que o sistema de expressão induzível por doxiciclina, dependente do promotor CMV, foi ineficaz para promover a expressão da nuclease Cas9 em níveis suficientes para mediar a edição gênica dos alvos propostos. Deste

modo, o estudo resultou na criação de uma plataforma celular validada para a seleção de macrófagos J774 geneticamente modificados, mas expôs uma limitação crítica no sistema de expressão gênica escolhido, que impede sua aplicação direta para estudos de nocaute genético funcional nesta linhagem específica.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados e conclusões apresentados, a principal perspectiva para a continuidade deste trabalho é a validação da hipótese de silenciamento epigenético do promotor CMV. Para tal, o passo imediato consiste na quantificação dos níveis de transcritos de cas9 por RT-qPCR e na tentativa de detecção da proteína Cas9 por Western Blotting em células induzidas com doxíciclina. A ausência de mRNA e/ou proteína confirmaria a supressão da expressão a partir deste promotor.

Confirmada a hipótese, a estratégia subsequente deverá focar na reengenharia do sistema de edição. Com base nas evidências da literatura discutidas, recomenda-se a substituição do promotor CMV por um promotor que demonstre atividade constitutiva robusta e sustentada em macrófagos, como o EF1 $\alpha$ . A clonagem da sequência codificadora de Cas9 em um novo vetor lentiviral sob controle deste promotor representa o caminho mais promissor para alcançar níveis de expressão adequados para a edição gênica.

A implementação bem-sucedida de um sistema de nocaute funcional permitirá, finalmente, a retomada do objetivo deste projeto: investigar o papel específico das integrinas ITGB2 e ITGAX na interação e fagocitose de *Cryptococcus ssp.* por macrófagos J774, contribuindo para a elucidação dos mecanismos moleculares que governam esta importante interação patógeno-hospedeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES SOARES, Emmanuel *et al.* Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 7, 1 jul. 2019.

BOULWARE, David R. *et al.* Multisite validation of cryptococcal antigen lateral flow assay and quantification by laser thermal contrast. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 1, p. 45–53, 2014.

CANTEROS, Cristina Elena *et al.* A rapid urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 136, n. 1, p. 21–23, 1996.

CAO, Chengjun. The emerging fungal pathogen *Cryptococcus gattii*: Epidemiology, pathogenesis, immunomodulatory attributes, and drug susceptibility. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 19, n. 7, 1 jul. 2025.

CASADEVALL, Arturo; COELHO, Carolina; ALANIO, Alexandre. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-Mediated Host Damage. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. APR, 30 abr. 2018.

DIAZ, James H. The Disease Ecology, Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Emerging *Cryptococcus gattii* Complex Infections. **Wilderness & environmental medicine**, v. 31, n. 1, p. 101–109, 1 mar. 2020.

DO CARMO, Fabíolla Nascimento *et al.* *Cryptococcus* spp. and Cryptococcosis: focusing on the infection in Brazil. **Brazilian journal of microbiology**, v. 53, n. 3, 2022.

DULL, Tom *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **Journal of virology**, v. 72, n. 11, p. 8463–8471, 1 nov. 1998.

ELSEGEINY, Waleed; MARR, Kieren A.; WILLIAMSON, Peter R. Immunology of cryptococcal infections: Developing a rational approach to patient therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, p. 347352, 4 abr. 2018.

ESHER, Shannon K.; ZARAGOZA, Oscar; ALSPAUGH, James Andrew. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, 1 jul. 2018.

GIBSON, Josie F.; JOHNSTON, Simon A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 76–86, 1 maio 2015.

HAGEN, Ferry *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16–48, 1 maio 2015.

HAWK, Carolyn Saylor *et al.* Integrin  $\beta$ 1 Promotes the Interaction of Murine IgG3 with Effector Cells. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 202, n. 9, p. 2782–2794, 1 maio 2019.

HERBST, Friederike *et al.* Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 5, p. 1014–1021, 2012.

HOSSAIN, Mohammad J.; O'CONNOR, Tamara J. An efficient and cost-effective method for disrupting genes in RAW264.7 macrophages using CRISPR-Cas9. **PloS one**, v. 19, n. 3, 1 mar. 2024.

JUNKER, Fabian; GORDON, John; QURESHI, Omar. Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. **Frontiers in immunology**, v. 11, 3 jul. 2020.

KALIDASAN, V. *et al.* A guide in lentiviral vector production for hard-to-transfect cells, using cardiac-derived c-kit expressing cells as a model system. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

KLEIN, K. R. *et al.* Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3669–3672, nov. 2009.

KULCSÁR, Péter István *et al.* Blackjack mutations improve the on-target activities of increased fidelity variants of SpCas9 with 5'G-extended sgRNAs. **Nature communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

KUTNER, Robert H.; ZHANG, Xian Yang; REISER, Jakob. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. **Nature Protocols** 2009 4:4, v. 4, n. 4, p. 495–505, 19 mar. 2009.

KWON-CHUNG, Kyung J. *et al.* The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357-16, 22 fev. 2017.

LI, Xin *et al.* Cryptococcosis Associated With Biologic Therapy: A Narrative Review. **Open forum infectious diseases**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2024.

MAZIARZ, Eileen K.; PERFECT, John R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 1 mar. 2016.

NAVARRO-GUERRERO, Elena *et al.* Genome-wide CRISPR/Cas9-knockout in human induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-derived macrophages. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

NORMILE, Tyler G.; BRYAN, Arielle M.; DEL POETA, Maurizio. Animal Models of Cryptococcus neoformans in Identifying Immune Parameters Associated With Primary Infection and Reactivation of Latent Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 581750, 15 set. 2020.

NOVERR, Mairi C. *et al.* Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1538–1547, 1 mar. 2003.

PARK, Seung Bum *et al.* A dual conditional CRISPR-Cas9 system to activate gene editing and reduce off-target effects in human stem cells. **Molecular therapy - Nucleic acids**, v. 28, p. 656–669, 14 jun. 2022.

RAJASINGHAM, Radha *et al.* The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, p. 1748–1755, 1 dez. 2022.

RATHORE, Sudarshan Singh *et al.* A holistic review on Cryptococcus neoformans. **Microbial pathogenesis**, v. 166, 1 maio 2022.

RHODES, Judith C. Contribution of complement component C5 to the pathogenesis of experimental murine cryptococcosis. **Sabouraudia**, v. 23, n. 3, p. 225–234, 1985.

RODRIGUES, Marcio L. *et al.* Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58–67, jan. 2008.

SANGSRI, Tanes *et al.* Tetraspanins are involved in *Burkholderia pseudomallei*-induced cell-to-cell fusion of phagocytic and non-phagocytic cells. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

SHALEM, Ophir *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. **Science** (New York, N.Y.), v. 343, n. 6166, p. 84–87, 2014.

SHI, Meiqing *et al.* Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 5, p. 1683–1693, 3 maio 2010.

SRIKANTA, Deepa; SANTIAGO-TIRADO, Felipe H.; DOERING, Tamara L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast** (Chichester, England), v. 31, n. 2, p. 47–60, fev. 2014.

STAIB, F. New concepts in the occurrence and identification of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 19, p. 143–145, 1963.

TABORDA, Carlos P.; CASADEVALL, Arturo. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 791–802, 2002.

TREVIJANO-CONTADOR, Nuria *et al.* Effects of human immunoglobulin A on *Cryptococcus neoformans* morphology and gene expression. **Microbiology spectrum**, v. 13, n. 4, abr. 2025.

WHO. Guidelines for diagnosing, preventing and managing cryptococcal disease among adults, adolescents and children living with HIV. Geneva: **World Health Organization**, 2022.

XIANG, Richard F. *et al.*  $\beta$ 1 Integrins Are Required To Mediate NK Cell Killing of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 201, n. 8, p. 2369–2376, 15 out. 2018.

YANG, Chen *et al.* *Cryptococcus* escapes host immunity: What do we know? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1041036, 13 out. 2022.