

# EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE GLICOSE EM CÉLULAS EPITELIAIS BRÔNQUICAS HUMANAS INFECTADAS COM *Cryptococcus neoformans*

## ***EFFECT OF GLUCOSE SUPPLEMENTATION ON HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS INFECTED WITH Cryptococcus neoformans***

Roberta Pereira Soares Emrich<sup>1</sup>, Giovanna Ferreira Bueno<sup>1</sup>, Wanessa Maria dos Santos<sup>1</sup>, Aline Beatriz Mahler Pereira<sup>1</sup>, Leonardo Euripedes de Andrade e Silva<sup>1</sup>, João Batista Camargo Neto<sup>2</sup>, Paulo Roberto da Silva<sup>1</sup>, Mario Leon Silva-Vergara<sup>1</sup>, Alexandre Paula Rogerio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Triângulo Mineiro. <sup>2</sup>Universidade de São Paulo.  
alexandre.rogerio@uftm.edu.br

### **RESUMO**

A hiperglicemia pode causar deficiências nas respostas imune inata e adaptativa, além de aumentar a suscetibilidade a infecções fúngicas invasivas, como a criptococose. Avaliamos os efeitos da interação entre *Cryptococcus neoformans* (MOI 100) nas células BEAS-2B suplementadas com glicose (22,5 and 35 mM) após 24 horas de estímulo. Não foram detectados efeitos citotóxicos nas células estimuladas com *C. neoformans* e/ou suplementadas com glicose. Em comparação ao controle, *C. neoformans* aumentou a produção de IL-6 e IL-8, bem como a ativação de NF-κB, ERK1/2 e STAT3 nas células BEAS-2B. A suplementação de glicose promoveu efeitos pró-inflamatórios ao aumentar a produção de IL-6 e a ativação de fosfo-STAT3 nas células epiteliais brônquicas infectadas com *C. neoformans*, quando comparadas às apenas infectadas. Além disso, a suplementação de glicose promoveu efeitos anti-inflamatórios ao reduzir a produção de IL-8 e a fosforilação de ERK1/2. Ademais, a suplementação de glicose aumentou a internalização de *C. neoformans* pelas células, reduziu a porcentagem de fungos aderidos à superfície celular e diminuiu seu crescimento. Esses resultados demonstram que o aumento de glicose modula a ativação da resposta imune inata das células epiteliais brônquicas modulando a infecção criptocócica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Células epiteliais brônquicas, *Cryptococcus neoformans*, Citocinas, glicose.

### **ABSTRACT**

Hyperglycemia can cause deficiencies in innate and adaptive immune responses, as well as increase susceptibility to invasive fungal infections, such as cryptococcosis. We evaluated the effects of the interaction between *Cryptococcus neoformans* (MOI 100) on BEAS-2B cells supplemented with glucose (22.5 and 35 mM) after 24 hours of stimulation. No cytotoxic effects were detected in cells stimulated with *C. neoformans* and/or supplemented with glucose. Compared to the control group,

*C. neoformans* increased the production of IL-6 and IL-8, as well as the activation of NF-κB, ERK1/2, and STAT3 in BEAS-2B cells. Glucose supplementation promoted pro-inflammatory effects by increasing IL-6 production and phospho-STAT3 activation in bronchial epithelial cells infected with *C. neoformans*, when compared to those that were only infected. Furthermore, glucose supplementation promoted anti-inflammatory effects by reducing IL-8 production and ERK1/2 phosphorylation. Furthermore, glucose supplementation increased the internalization of *C. neoformans* by the cells, reduced the percentage of fungi adhered to the cell surface, and decreased their growth. These results demonstrate that increased glucose modulates the activation of the innate immune response of bronchial epithelial cells, thus modulating cryptococcal infection.

**KEYWORDS:** Bronchial epithelial cells, *Cryptococcus neoformans*, Cytokines, Glucose supplementation.

## INTRODUÇÃO

A criptococose é uma importante doença infecciosa em todo o mundo, particularmente na África Subsaariana, onde mais de 100.000 pessoas com HIV/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) morrem de meningite todos os anos. A incidência global de MC associada ao HIV diminuiu de 960.000 casos em 2007 para 220.000 em 2014 e depois para 150.000 em 2020. No entanto, a meningite criptocócica continua a ser responsável por cerca de 19% das mortes relacionadas com a SIDA todos os anos. Por outro lado, a incidência de CM na Europa, América do Norte e América Latina duplicou desde 2009<sup>1,2</sup>. A criptococose é uma infecção fúngica grave e potencialmente fatal que afeta predominantemente indivíduos imunocomprometidos, incluindo pessoas vivendo com HIV/AIDS, receptores de transplantes de órgãos sólidos e pacientes submetidos a terapias imunossupressoras<sup>3</sup>. Nesses indivíduos, a resposta imune comprometida é incapaz de controlar infecções causadas por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, facilitando a disseminação fúngica e aumentando a gravidade da doença<sup>4</sup>.

A hiperglicemia é uma condição metabólica caracterizada pela elevação dos níveis de glicose no sangue. Esse estado pode induzir disfunções na resposta imune contra patógenos invasores, por exemplo, atenuando a produção de citocinas, prejudicando o recrutamento de leucócitos, o reconhecimento de patógenos e inibindo mecanismos mediados por anticorpos e complemento<sup>5</sup>. Além disso, a

hiperglicemia tem sido identificada como um preditor de pior evolução clínica em diversas doenças infecciosas, devido à sua associação com estresse oxidativo, acidose láctica, inflamação sistêmica e comprometimento da integridade da barreira hematoencefálica<sup>6,7</sup>.

A hiperglicemia é amplamente reconhecida por potencializar a reatividade inflamatória<sup>8,9</sup> e reprogramar células imunes por meio de mecanismos epigenéticos, promovendo maior suscetibilidade a infecções<sup>10-12</sup>. Dentre essas, infecções fúngicas invasivas como mucormicose, candidíase, coccidioidomicose e criptococose apresentam maior incidência em indivíduos hiperglicêmicos<sup>13</sup>. Embora esteja bem estabelecido que níveis elevados de glicose podem modular respostas imunes e potencialmente influenciar a progressão de doenças<sup>14,15</sup>, o impacto específico da hiperglicemia na patogênese das infecções por *Cryptococcus neoformans* permanece pouco compreendido. A hiperglicemia crônica é amplamente reconhecida como uma condição que compromete tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, aumentando a suscetibilidade a infecções fúngicas invasivas, incluindo a criptococose<sup>6</sup>. Níveis graves de hiperglicemia (glicemia  $\geq 200$  mg/dL) em pacientes com criptococose foram associados a maior risco de mortalidade em três anos<sup>7</sup>. Um estudo demonstrou que a meningite criptocócica deve ter um diagnóstico diferencial em pacientes diabéticos, visto a crescente prevalência de diabetes e os baixos níveis de controle glicêmico adequado<sup>16</sup>. Em outro estudo dos 120 pacientes diabéticos com infecção fúngica sistêmica, a infecção por *Cryptococcus* ssp foi a mais comum (44,6%)<sup>17</sup>. Essa lacuna de conhecimento destaca a necessidade de estudos que investiguem como a hiperglicemia altera as interações entre o hospedeiro e o patógeno na criptococose. Para isso, examinamos os efeitos de altas concentrações de glicose na interação entre *C. neoformans* e a resposta imune inata das vias aéreas, utilizando um modelo *in vitro* de células epiteliais brônquicas humanas, uma vez que as células da mucosa pulmonar provavelmente são as primeiras a entrar em contato com *C. neoformans*.

## METODOLOGIA

### CÉLULAS EPITELIAIS BRÔNQUICAS

A linhagem celular epitelial brônquica humana (BEAS-2B; ATCC, Rockville, MD) foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-F12; Gibco-Life Technologies), que contém 17,5 mM de glicose em sua formulação, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies) e 1% de penicilina + estreptomicina (Gibco-Life Technologies), sendo incubada a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

### *Cryptococcus neoformans*

A cepa *C. neoformans* (ATCC MYA-4564) foi utilizada em todos os experimentos. Ágar Sabouraud dextrose (BD Biosciences) foi utilizado como meio para crescimento e manutenção do fungo. Uma suspensão de *C. neoformans* em caldo Sabouraud dextrose (BD Biosciences) foi preparada e cultivada até a fase estacionária inicial (48 h) à temperatura ambiente ou a 30 °C para estimulação celular. As células foram estimuladas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de acordo com estudo prévio do nosso grupo<sup>18</sup>.

### ESTIMULAÇÃO

Células BEAS-2B ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C contendo concentrações de 22,5 mM ou 35 mM<sup>19</sup> e estimuladas com *C. neoformans* (MOI 100)<sup>20</sup>. Após 24 horas do estímulo, o sobrenadante e/ou as células são coletados para os ensaios. As células não tratadas e não estimuladas foram denominadas de grupo controle. As células somente com meio de cultura, sem tratamento ou estímulo, se referem ao grupo controle.

### ENSAIO DE CFU

O ensaio de unidades formadoras de colônia (CFU) foi adaptado conforme estudos anteriores<sup>20</sup>. Células BEAS-2B foram cultivadas em placas de 96 poços e

infectadas com *C. neofomans* e/ou glicose por 24 horas. Água destilada autoclavada foi adicionada por 20 min para lise celular. Após a lise celular, a UFC foi obtida a partir da lavagem (3X) do precipitado em solução salina 0,9%, que foi posteriormente plaqueada em ágar Sabouraud dextrose a 33 °C por 48 h.

#### ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

A viabilidade celular foi estimada utilizando o corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (BD Biosciences), seguindo o protocolo do fabricante. Após a suplementação de glicose e/ou a infecção com *C. neofomans* as células foram incubadas com o corante MTT por 2 horas a 37 °C no escuro. A intensidade da fluorescência foi medida utilizando um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 550 nm, com comprimento de onda de referência de 630 nm<sup>21</sup>.

#### ENSAIO DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRIPANO

A viabilidade celular também foi examinada utilizando o teste de exclusão do azul de tripan. A solução de azul de tripan foi preparada na hora, a 0,4% em cloreto de sódio a 0,9%. As células foram lavadas em PBS, tripsinizadas e centrifugadas. Vinte microlitros da suspensão celular foram adicionados a 20 µL da solução de azul de tripan e 500 células foram contadas microscopicamente. A viabilidade celular foi expressa como a porcentagem de células negativas para o azul de tripan em relação aos controles não tratados<sup>22</sup>.

#### PRODUÇÃO DE CITOQUÍNA

As concentrações de IL-6, IL-8 e IL-10 foram determinadas por ensaios de ELISA, conforme as instruções do fabricante (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA). Brevemente, as medições de citocinas por ELISA foram realizadas em um volume final de 50 µL, utilizando amostras do sobrenadante. As amostras foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços previamente revestida com um anticorpo monoclonal específico para cada citocina e incubadas por 2 horas.

Após quatro lavagens, os soros foram incubados por 2 horas com anticorpos anti-IL-6, -IL-8 ou -IL-10 conjugados com peroxidase de raiz-forte (HRP) para detecção. As placas foram lavadas quatro vezes, a solução de substrato foi adicionada e as placas foram incubadas por 30 minutos. Finalmente, 50 µL de solução de parada foram adicionados a cada poço, e a cor mudou de azul para amarelo. A densidade óptica de cada poço foi medida a 450 nm utilizando um leitor de microplacas. Os resultados foram linearizados plotando-se o logaritmo da concentração de cada citocina versus o logaritmo da densidade óptica, e a linha de melhor ajuste foi determinada por análise de regressão. Padrões para as diferentes citocinas foram utilizados em concentrações que variaram de 2,5 a 5 pg/mL e de 100 a 500 pg/mL para gerar uma curva linear, a fim de determinar a concentração da amostra desconhecida. Diluições seriadas das citocinas recombinantes foram utilizadas para gerar a curva padrão.

## **EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO**

As vias NF-κB, ERK1/2 e STAT3 foram avaliadas por citometria de fluxo conforme métodos anteriores<sup>23</sup>. Resumidamente, 24 h após a estimulação com *C. neoformans*, as células foram fixadas com BD Cytofix Buffer (4% paraformaldeído), lavadas e permeabilizadas em Perm/Wash Buffer gelado (BD Biosciences). Em seguida, foram incubadas com anticorpos monoclonais de camundongo Alexa Fluor 488 anti-serina 529 fosforilada do NF-κB p65 humano, Alexa Fluor 488 anti-serina 727 fosforilada do STAT3 humano e PE anti-treonina 202 e tirosina 204 fosforiladas (pT202/pY204) da ERK1 humana e anti-treonina 184 e tirosina 186 fosforiladas (pT184/pY186) da ERK2 humana (BD Biosciences) por 60 min a 10 °C no escuro. O mesmo protocolo foi realizado com o controle isotípico correspondente; IgG1 para STAT3 e ERK1/2 e IgG2b para NF-κB. A expressão de fosfo-STAT3, fosfo-NF-κB e fosfo-ERK1/2 foi medida em 50.000 eventos (células) em citômetro de fluxo FACSCalibur. Os resultados foram expressos como porcentagem de células positivas para fosfo-STAT3, fosfo-NF-κB e fosfo-ERK1/2.

## FAGOCITOSE *IN VITRO*

Para determinar o nível de internalização de *C. neoformans*, os fungos foram marcadas com 0,1 mg/mL de isotiocianato de fluoresceína (FITC) no escuro por 30 min após lavagem em PBS<sup>24</sup>. Após a estimulação, as células foram lavadas extensivamente com PBS para remover fungos não aderidos. Algumas interações fungo–célula foram tratadas por 10 min a 25 °C com azul de tripano (200 µg/mL), que atua como agente de extinção da fluorescência derivada de FITC. Como esse corante não penetra em células viáveis, ele permite discriminar fungos aderidos à superfície dos internalizados, apagando a fluorescência dos não internalizados. O azul de tripano não ligado foi removido com PBS, e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

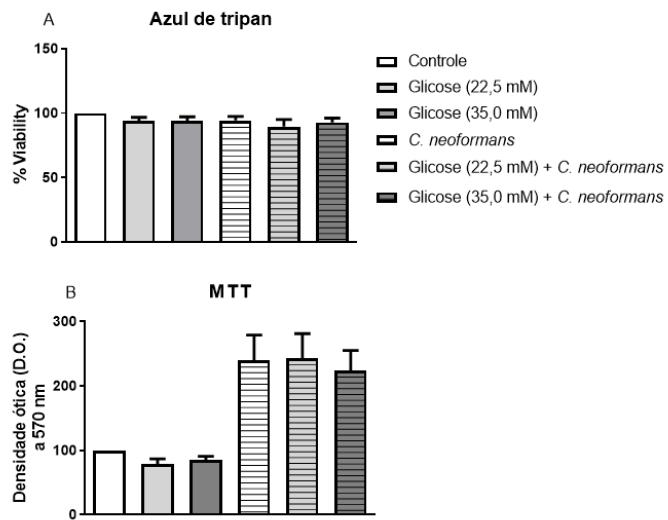
Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). As análises foram realizadas por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism (Versão 6.0; GraphPad Software Inc.). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## RESULTADOS

### PERCENTUAIS DE CÉLULAS BEAS-2B VIÁVEIS E ATIVADAS

No ensaio com azul de tripano, não foram observados efeitos citotóxicos nas células estimuladas com *C. neoformans* e/ou tratadas nas concentrações de 22,5 mM e 35 mM de glicose por 24 horas (Fig. 1A). No entanto, em comparação com o controle, as células estimuladas apenas com *C. neoformans* ou em combinação com glicose apresentaram maior percentual de proliferação no ensaio de MTT (Fig. 1B).

Figura 1. A suplementação com glicose e/ou *C. neoformans* não induziu efeitos citotóxicos em células BEAS-2B. A suplementação com glicose (5 ou 17,5 mM) foi adicionada ao meio (17,5 mM), resultando em concentrações finais de 22,5 e 35,0 mM. As células BEAS-2B foram suplementadas com glicose e infectadas com *C. neoformans* (MOI 100). Os resultados dos ensaios de viabilidade celular com azul de tripano (A) e de MTT (B) foram obtidos após 24 h de estímulo. Os dados são apresentados como média ± EPM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata ( $n = 4$ ). \* $P < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

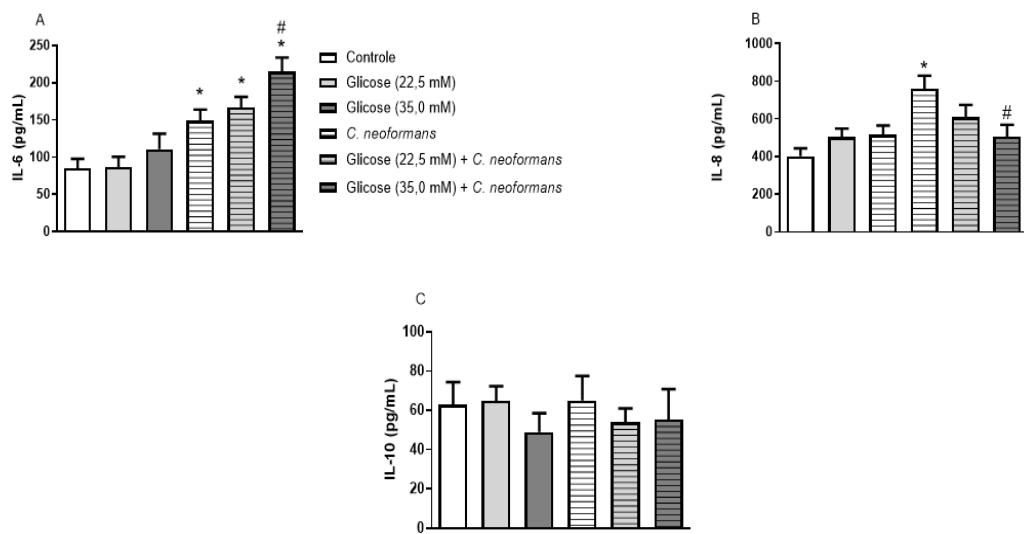


#### A SUPLEMENTAÇÃO COM GLICOSE AUMENTOU A PRODUÇÃO DE IL-6 E REDUZIU A DE IL-8 EM CÉLULAS BEAS-2B INFECTADAS COM *C. neoformans*

Em comparação ao controle, *C. neoformans* aumentou a produção de IL-6 e IL-8 (Fig. 2A e 2B, respectivamente), mas não de IL-10 (Fig. 2C). A combinação de glicose elevada e fungo aumentou significativamente a concentração de IL-6 em relação às células estimuladas apenas com *C. neoformans* (Figura 2A). A produção de IL-6 aumentou aproximadamente 1,4 vezes, de  $148,55 \pm 24,16$  pg/mL (*C. neoformans*) para  $214,90 \pm 12,70$  pg/mL (glicose + *C. neoformans*) (média ± EPM). Além disso, a combinação de glicose com *C. neoformans* reduziu a produção de IL-8 induzida por *C. neoformans* (Figura 2B). A produção de IL-8 diminuiu cerca de 33%, de  $759,35 \pm 93,72$  pg/mL (*C. neoformans*) para  $506,56 \pm 38,12$  pg/mL (glicose + *C. neoformans*) (média ± EPM). Nas células infectadas com *C. neoformans* e suplementadas com glicose, a concentração de IL-10 não foi alterada

em comparação ao controle ou às células apenas infectadas (Figura 2C). Nenhuma alteração significativa na produção de IL-6, IL-8 e IL-10 foi observada nas células tratadas com a glicose (22,5 e 35,0 mM).

Figura 2. A associação entre *C. neoformans* e suplementação com glicose aumentou a produção de IL-6 e reduziu a de IL-8, sem alterar as concentrações de IL-10, em células epiteliais brônquicas. A suplementação com glicose (5 ou 17,5 mM) foi adicionada ao meio (17,5 mM), resultando em concentrações finais de 22,5 e 35,0 mM. As células BEAS-2B foram suplementadas com glicose e infectadas com *C. neoformans* (MOI 100). Após 24 h, as concentrações de IL-6 (A), IL-8 (B) e IL-10 (C) foram avaliadas por ELISA. Os dados são apresentados como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata ( $n = 3$ ). \* $P < 0,05$  em comparação ao grupo controle; # $P < 0,05$  em comparação ao grupo *C. neoformans*.

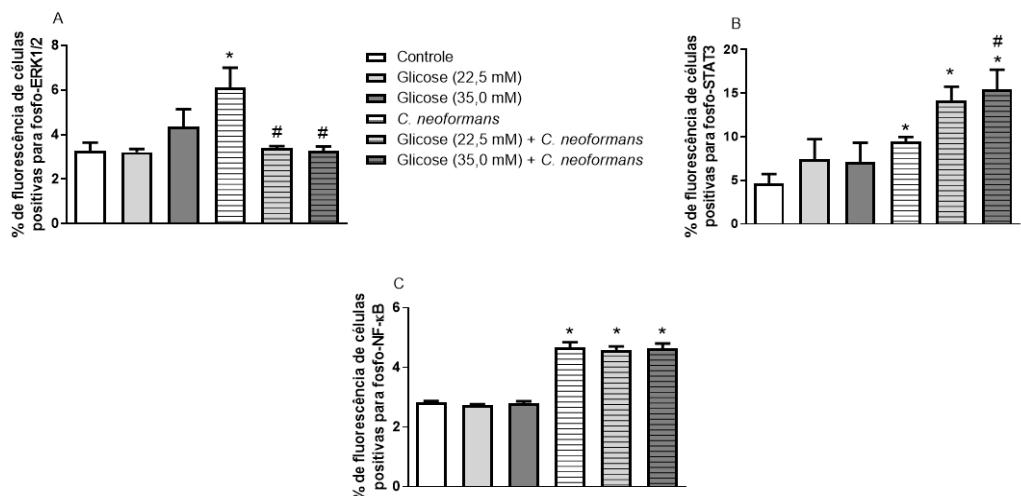


#### A ASSOCIAÇÃO DE *C. NEOFORMANS* COM SUPLEMENTAÇÃO DE GLICOSE INIBIU A ATIVAÇÃO DE FOSFO-ERK1/2 E PROMOVEU EFEITO ADITIVO NA FOSFORILAÇÃO DE STAT3 EM CÉLULAS EPITELIAIS BRÔNQUICAS

Em comparação às células controle, células estimuladas com *C. neoformans* apresentaram aumento na ativação de pNF-κB, pERK1/2 e pSTAT3 (Fig. 3A-C, respectivamente). A combinação de suplementação com glicose, nas concentrações de 22,5 e 35 mM, e *C. neoformans* reduziu a ativação de pERK1/2 (Figura 3C) em comparação às células estimuladas apenas com *C. neoformans*. A ativação de fosfo-

pERK1/2 foi reduzida em cerca de 44% e 47%, de  $6,13 \pm 1,28\%$  (*C. neoformans*) para  $3,38 \pm 0,1\%$  (glicose (22,5 mM) + *C. neoformans*) e  $3,27 \pm 1,27\%$  (glicose (35 mM) + *C. neoformans*) (média ± EPM), respectivamente. Além disso, a associação de glicose, somente na concentração de 35 mM, e *C. neoformans* aumentou a fosforilação de STAT3 (Figura 3D). A fosforilação de STAT3 aumentou aproximadamente 1,6 vezes, de  $9,41 \pm 2,09\%$  (*C. neoformans*) para  $15,40 \pm 3,32\%$  (glicose (35 mM) + *C. neoformans*) (média ± EPM). A combinação de glicose, ambas concentrações, e *C. neoformans* não alterou a ativação de fosfo-NF-κB em comparação às células estimuladas apenas com *C. neoformans*. Não foram observadas alterações significativas na ativação dos fatores de transcrição nas células suplementadas apenas com as glicoses nas concentrações de 22,5 e 35 mM.

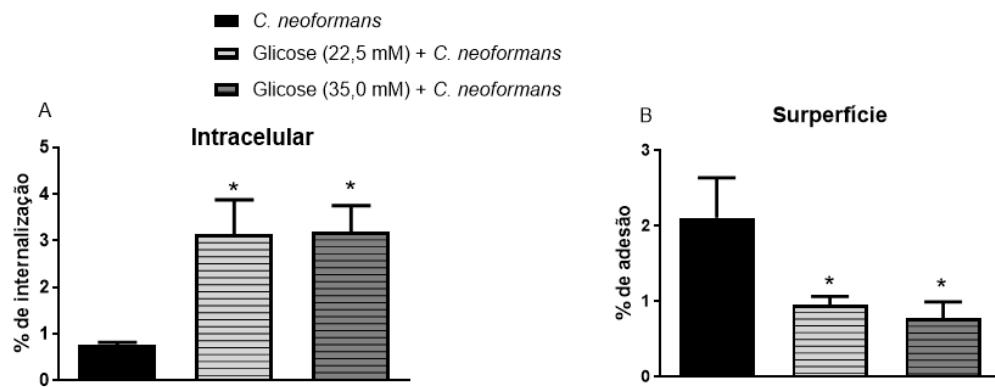
Figura 3. A combinação de *C. neoformans* com alta concentração de glicose reduziu a ativação de fosfo-ERK1/2 e aumentou a ativação de fosfo-STAT3, sem alterar a ativação de fosfo-NF-κB. A suplementação com glicose (5 ou 17,5 mM) foi adicionada ao meio (17,5 mM), resultando em concentrações finais de 22,5 e 35,0 mM. As células BEAS-2B foram suplementadas com glicose e infectadas com *C. neoformans* (MOI 100). Após 24 h, as células foram recuperadas e analisadas por citometria de fluxo para detecção da ativação de fosfo-ERK1/2 (A), fosfo-STAT3 (B) e fosfo-NF-κB (C). Os dados são apresentados como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata ( $n = 3$ ). \* $P < 0,05$  em comparação ao grupo controle; # $P < 0,05$  em comparação ao grupo *C. neoformans*.



## A SUPLEMENTAÇÃO COM GLICOSE AUMENTOU A INTERNALIZAÇÃO E REDUZIU A PORCENTAGEM DE *C. NEOFORMANS* ADERIDO À SUPERFÍCIE DE CÉLULAS BEAS-2B

A suplementação com glicose aumentou o percentual de *C. neoformans* internalizado por células BEAS-2B (Fig. 4A). O percentual de internalização aumentou aproximadamente 4,2 vezes, de  $0,756\% \pm 0,66\%$  (*C. neoformans*) para  $3,2\% \pm 2,37\%$  (glicose + *C. neoformans*) (média ± EPM). Além disso, a suplementação com glicose reduziu o percentual de fungos aderidos à superfície celular (Fig. 4B). O percentual de *C. neoformans* na superfície foi reduzido em cerca de 63%, de  $2,10 \pm 0,57\%$  (*C. neoformans*) para  $0,77 \pm 1,12\%$  (glicose + *C. neoformans*) (média ± EPM).

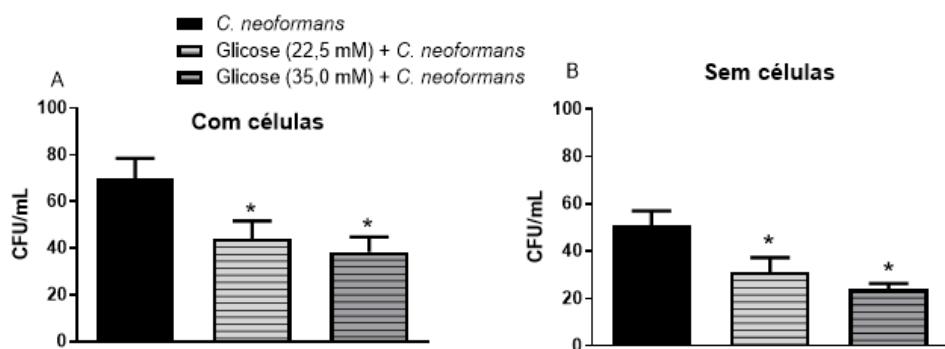
Figura 4. A suplementação com glicose modulou a interação do *C. neoformans* com as células BEAS-2B. A suplementação com glicose (5 ou 17,5 mM) foi adicionada ao meio (17,5 mM), resultando em concentrações finais de 22,5 e 35,0 mM. As células BEAS-2B foram suplementadas com glicose e infectadas com *C. neoformans* (MOI 100). Após 24 h, as células foram recuperadas e analisadas por citometria para determinar a quantidade de *C. neoformans* intracelular (A) e aderido à superfície celular (B). Os dados são apresentados como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata ( $n = 3$ ). # $P < 0,05$  em comparação ao grupo *C. neoformans*.



## ENSAIO DE CARGA FÚNGICA

A suplementação com glicose reduziu a contagem fúngica (UFC/mL) de *C. neoformans* em células BEAS-2B tanto na presença quanto na ausência das células epiteliais (Figuras 5A e 5B, respectivamente).

Figura 5. A suplementação com glicose reduziu o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *C. neoformans*. A suplementação com glicose (5 ou 17,5 mM) foi adicionada ao meio (17,5 mM), resultando em concentrações finais de 22,5 e 35,0 mM. As células BEAS-2B foram suplementadas com glicose e infectadas com *C. neoformans* (MOI 100). O número de unidades formadoras de colônia foi determinado por ensaio de UFC na presença (A) e na ausência (B) de células BEAS-2B após 24 h. Os dados são apresentados como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata ( $n = 3$ ). \* $P < 0,05$  em comparação ao grupo *C. neoformans*.



## DISCUSSÃO

Neste estudo, observou-se que a associação entre *C. neoformans* e suplementação com glicose desencadeou respostas tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias em células epiteliais brônquicas, caracterizadas pelo aumento da produção de IL-6 e da fosforilação de STAT3, concomitantemente à redução da produção de IL-8 e da ativação de ERK1/2. Apesar dessas alterações funcionais, não foram detectados efeitos citotóxicos. Curiosamente, a presença de glicose elevou significativamente a internalização do fungo pelas células, diminuindo sua permanência na superfície e reduzindo o crescimento fúngico.

A IL-6 possui papel ambíguo, atuando como mediadora inflamatória e reguladora metabólica<sup>25,26</sup>. Estudos clínicos indicam que níveis elevados de IL-6 no líquido cefalorraquidiano de pacientes com criptococose meníngea estão associados a respostas protetoras<sup>27</sup>, e componentes capsulares de *C. neoformans*, como GXM e GalXM, são capazes de induzir sua produção em células humanas<sup>28</sup>. Além disso,

camundongos deficientes em IL-6 exibem maior suscetibilidade à infecção criptocócica<sup>29</sup>. Concentrações basais cronicamente elevados de IL-6 e de seu receptor são encontradas em pacientes com diabete do tipo 1<sup>30</sup>, apoiando a noção amplamente aceita de diabetes como uma doença inflamatória crônica<sup>31</sup>. Além dos aumentos intrínsecos relacionados ao próprio diabetes, também foi demonstrado que a IL-6 aumenta agudamente em resposta à hiperglicemia<sup>32</sup>. Embora o papel da IL-6 e de outras citocinas pró e anti-inflamatórias na evolução do diabetes ainda não esteja completamente definido, as evidências acima sugerem que a presença simultânea de diabetes e hiperglicemia (capazes de aumentar a IL-6 independentemente) pode resultar em concentrações de IL-6 inadequadamente elevadas, com implicações potencialmente negativas no início e na progressão das complicações diabéticas. STAT3 é um fator de transcrição que medeia as respostas de sinalização de IL-6. A hiperglicemia aumenta a fosforilação e a translocação nuclear de STAT3 e portanto corroborando com os resultados da IL-6<sup>33</sup>. Assim, o aumento sinérgico de IL-6 e STAT3 pela associação de glicose na maior concentração (35 mM) e o *C. neoformans* observado em nosso estudo sugere que a hiperglicemia pode favorecer tanto o controle da infecção quanto a lesão tecidual decorrente da hiperativação inflamatória<sup>34-36</sup>.

A modulação observada em ERK1/2 e IL-8 reforça esse dualismo funcional. Embora *C. neoformans* ative ERK1/2 em diferentes tipos celulares<sup>37-39</sup>, a glicose elevada reduziu essa fosforilação, acompanhada da diminuição na produção de IL-8 — uma quimiocina essencial para o recrutamento de neutrófilos<sup>40-42</sup>. Estudos prévios demonstram que a produção de IL-8 em condições hiperglicêmicas depende do tipo celular<sup>43</sup>, e nossos resultados indicam que a redução da via IL-8/ERK1/2 pode atenuar o dano pulmonar, mas também comprometer o recrutamento neutrofilico essencial para o controle da infecção<sup>44,45</sup>.

O *C. neoformans* e a glucuronoxilomanana (GXM), o principal componente do material capsular de *C. neoformans*, ativam o NF-κB<sup>46</sup>. Macrófagos alveolares de camundongos C57BL/6 J e SJL/J infectados com *C. neoformans* apresentam aumento da fosforilação de NF-κB<sup>47</sup>. No entanto, a atividade de NF-κB em células

epiteliais pulmonares pode ser totalmente dispensável para o desenvolvimento da inflamação das vias aéreas em resposta a *C. neoformans*<sup>48</sup>. Esses resultados estão em concordância com prévios estudos do nosso grupo<sup>18,39,49</sup>. Nossos resultados demonstraram que a associação de glicose e *C. neoformans* não modulam a via NF-κB, sugerindo que os efeitos da modulação da glicose na ativação das células infectada por *C. neoformans* ocorrem predominantemente sobre as vias STAT3 e ERK1/2, em vez de uma ativação inflamatória global<sup>50,51</sup>.

A suplementação de glicose ou o fungo e as suas associações não apresentaram efeitos citotóxicos. No entanto, no ensaio MTT, observou-se um aumento na taxa de proliferação na cultura com *C. neoformans*, o que pode estar associado às taxas de crescimento dos fungos, que podem aumentar a produção de formazan. Por fim, observamos que a hiperglicemia aumenta a internalização do fungo e reduziu sua aderência à superfície celular, bem como seu crescimento in vitro, o que está de acordo com relatos de que fungos respondem de forma distinta à disponibilidade de glicose quando comparados a bactérias. O crescimento de fungos e bactérias pode ser afetado pelo tratamento com glicose. Enquanto as bactérias reagem rapidamente a uma maior concentração de glicose, os fungos parecem reagir em menor grau à adição de glicose, e com uma dinâmica temporal diferente<sup>52-54</sup>, o que está de acordo com nossos resultados. Dessa forma, pelo menos em células BEAS-2B, a suplementação com glicose pode promover alterações no desenvolvimento de infecções por *C. neoformans*. Estudos in vivo devem ser conduzidos para correlacionar os efeitos observados in vitro.

## CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados indicam que a suplementação com glicose exerce efeitos paradoxais — anti-inflamatórios e pró-inflamatórios — sobre a infecção por *C. neoformans* em células epiteliais brônquicas. Essas alterações podem tanto favorecer a contenção fúngica quanto aumentar o risco de dano tecidual, dependendo do contexto fisiológico. Considerando as limitações do

modelo in vitro, estudos in vivo serão fundamentais para determinar se a hiperglicemia representa um fator de susceptibilidade ou proteção frente à criptococose.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram não possuir quaisquer conflitos de interesse relevantes para o conteúdo deste artigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Este estudo contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – Bolsista BPQ-06531-24; APQ-01241-22), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Rede Mineira de Pesquisa Translacional em Imunobiológicos e Biofármacos no Câncer (REMITRIBIC, RED-00031-21). Este trabalho também recebeu apoio parcial da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001.

## **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

Todos os autores contribuíram para a concepção e o delineamento do estudo e revisaram versões anteriores do manuscrito, leram e aprovaram a versão final. A preparação do material experimental, a coleta e a análise dos dados foram realizadas por Roberta Pereira Soares Emrich, Giovanna Ferreira Bueno, Wanessa Maria dos Santos, Aline Beatriz Mahler Pereira, Leonardo Euripedes de Andrade e Silva e Alexandre Paula Rogerio. A primeira versão do manuscrito foi redigida por Roberta Pereira Soares Emrich, Leonardo Euripedes de Andrade e Silva, João Batista Camargo Neto, Paulo Roberto da Silva, Mario Leon Silva-Vergara e Alexandre Paula Rogerio.

## **REFERÊNCIAS**

1. Zhao Y, Ye L, Zhao F, Zhang L, Lu Z, Chu T, Wang S, Liu Z, Sun Y, Chen M, Liao G, Ding C, Xu Y, Liao W, Wang L. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. Infectious Diseases of Poverty. 2023; 12(1): 20. <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01073-4>.
2. Kushima H, Ishii H. Cryptococcosis. Medical Mycology Journal, 2025; 66(1): 27-31. <https://doi.org/10.3314/mmj.25.001>.

3. Moreira TA, Ferreira MS, Ribas RM, Borges AS. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2006; 39(3). <https://doi.org/10.1590/s0037-86822006000300005>.
4. Vilchez RA, Fung J, Kusne S. Cryptococcosis in organ transplant recipients: an overview. American Journal of Transplantation. 2002; 2(7): 575-80. <https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2002.20701.x>.
5. Berbudi A, Rahmadika N, Tjahjadi AI, Ruslami R. Type 2 diabetes and its impact on the immune system. Current Diabetes Reviews. 2020; 16(5): 442-449. <https://doi.org/10.2174/1573399815666191024085838>.
6. Peleg AY, Weerarathna T, McCarthy JS, Davis TME. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycemic control. Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 2007; 23(1): 3-13. <https://doi.org/10.1002/dmrr.682>.
7. Tsai ST, Lin FY, Chen PS, Chiang HY, Kuo CC. Three-year mortality in cryptococcal meningitis: Hyperglycemia predicts unfavorable outcome. PLoS One. 2021; 16(5): e0251749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251749>.
8. Khateeb J, Fuchs E, Khamaisi M. Diabetes and lung disease: an underestimated relationship. Review of Diabetic Studies. 2019; 15:1–15. <https://doi.org/10.1900/RDS.2019.15.1>.
9. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. Annals of the New York Academy of Sciences. 2021 1243: 88–102. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06320.x>.
10. Ahmed M, de Winther MPJ, Van den Bossche J. Epigenetic mechanisms of macrophage activation in type 2 diabetes. Immunobiology. 2017; 222(10): 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.08.011>.
11. van Crevel R, van de Vijver S, Moore DAJ. The global diabetes epidemic: what does it mean for infectious diseases in tropical countries? Lancet Diabetes Endocrinol. 2017; 5(6): 457–468. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30081-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30081-X).

12. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, Zheng D, Soffer E, Blacher E, Braverman S, Tengeler AC, Barak O, Elazar M, Ben-Zeev R, Lehavi-Regev D, Katz MN, Pevsner-Fischer M, Gertler A, Halpern Z, Harmelin A, Aamar S, Serradas P, Grosfeld A, Shapiro H, Geiger B, Elinav E. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science*. 2018; 359(6382): 1376–1383. <https://doi.org/10.1126/science.aar3318>.
13. Shilling AM, Raphael J. Diabetes, hyperglycemia, and infections. Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology. 2008; 22(3): 519–535. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2008.06.005>.
14. Ehrlich SF, Quesenberry CP, Van Den Eeden SK, Shan J, Ferrara A. Patients diagnosed with diabetes are at increased risk for asthma, chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary fibrosis, and pneumonia but not lung cancer. *Diabetes Care*. 2010; 33(1): 55–60. <https://doi.org/10.2337/dc09-0880>.
15. Enomoto T, Usuki J, Azuma A, Nakagawa T, Kudoh S. Diabetes mellitus may increase risk for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2003; 123(6): 2007–2011. <https://doi.org/10.1378/chest.123.6.2007>.
16. Owuor OH, Chege P. Cryptococcal meningitis in an HIV-negative newly diagnosed diabetic patient: A case report. *BMC Infectious Diseases*. 2019; 19(1): 5. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3625-4>.
17. Lao M, Li C, Li J, Chen D, Ding M, Gong Y. Opportunistic invasive fungal disease in patients with type 2 diabetes mellitus from Southern China: Clinical features and associated factors. *Journal of Diabetes Investigation*. 2020; 11(3): 731–744. <https://doi.org/10.1111/jdi.13183>.
18. Souza HI, Pereira ABM, Oliveira JR, Silva PR, Teixeira DNS, Silva-Vergara ML, Rogério AP. *Cryptococcus neoformans* in association with *Dermatophagooides pteronyssinus* has pro- (IL-6/STAT3 overproduction) and anti-inflammatory (CCL2/ERK1/2 downregulation) effects on human bronchial epithelial cells. *Inflammation*. 2020; 45(3): 1269–1280. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01619-4>.
19. Bearham J, Garnett JP, Schroeder V, Biggart MGS, Baines DL. Effective glucose metabolism maintains low intracellular glucose in airway epithelial cells after exposure to hyperglycemia. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2019; 317(5): C983–C992. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00193.2019>.

20. Cunha MM, Pereira ABM, Lino RC, da Silva PR, Andrade-Silva LE, de Vito FB, de Souza HM, Silva-Vergara ML, Rogério AP. Effects of combination of *Cryptococcus gattii* and IFN- $\gamma$ , IL-4 or IL-27 on human bronchial epithelial cells. *Immunobiology*. 228(1): 152312. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152312>.
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1-2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
22. McMullan BJ, Desmarini D, Djordjevic JT, Chen SC-A, Roper M, Sorrell TC. Rapid microscopy and use of vital dyes: potential to determine viability of *Cryptococcus neoformans* in the clinical laboratory. *PLoS One*. 2015; 10(1): e0117186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117186>.
23. de Oliveira JR, Pereira ABM, de Souza HI, Dos Santos WM, de Assunção TSF, de Vito FB, de Souza HM, da Silva PR, da Silva MV, Junior VR, Rogério AP. Anti-inflammatory actions of aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1) in bronchial epithelial cells stimulated by cigarette smoke extract. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2024; 172: 106833. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2024.106833>.
24. Chaka W, Scharringa J, Verheul AF, Verhoef J, Van Strijp AG, Hoepelman IM. Quantitative analysis of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1995; 2(6): 753–759. <https://doi.org/10.1128/cdli.2.6.753-759.1995>
25. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *International Immunology*. 2021; 33(3): 127–148. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa078>.
26. Wueest S, Konrad D. The controversial role of IL-6 in adipose tissue on obesity-induced dysregulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2020; 319(3): E607–E613. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00306.2020>.
27. Li X, Liu G, Ma J, Zhou L, Zhang Q, Gao L. Lack of IL-6 increases blood-brain barrier permeability in fungal meningitis. *Journal of Biosciences*. 2015; 40(1): 7–12. <https://doi.org/10.1007/s12038-014-9496-y>.
28. Delfino D, Cianci L, Lupis E, Celeste A, Petrelli ML, Curró F, Cusumano V, Teti G. Interleukin-6 production by human monocytes stimulated with *Cryptococcus neoformans* components. *Infection and Immunity*. 1997; 65(6): 2454–2456. <https://doi.org/10.1128/iai.65.6.2454-2456.1997>.

29. Peng L, Zhong J, Xiao Y, Wang B, Li S, Deng Y, He D, Yuan J. Therapeutic effects of an anti-IL-6 antibody in fungal keratitis: Macrophage inhibition and T-cell subset regulation. *Int Immunopharmacology*. 2020; 85: 106649. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106649>.
30. Targher G, Zenari L, Bertolini L, Muggeo M, Zoppini G. Elevated levels of interleukin-6 in young adults with type 1 diabetes without clinical evidence of microvascular and macrovascular complications. *Diabetes Care*. 2001; 24(5): 956–957. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.5.956>.
31. Mohamed-Ali V, Armstrong L, Clarke D, Bolton CH, Pinkney JH. Evidence for regulation of plasma adhesion molecules by proinflammatory cytokines and their soluble receptors in type 1 diabetes. *Journal of Internal Medicine*. 2001; 250(5): 415–421. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2001.00900.x>.
32. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: Role of oxidative stress. *Circulation*. 2002; 106(16): 2067–2072. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000034509.14906.ae>.
33. Kuo FY, Cheng KC, Li Y, Cheng JT, Tsai CC. Promotion of adropin expression by hyperglycemia is associated with STAT3 activation in diabetic rats. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2020; 13: 2269–2277. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S243755>.
34. Xu H, Wang X, Du B. Mechanism of montelukast on autophagy and apoptosis of airway epithelial cells through STAT3-ROR $\gamma$ t-IL-17/IL-23 signaling pathway. *Materials Express*. 2024; 14(1): 91–96. <https://doi.org/10.1166/mex.2024.2596>.
35. Wang C-M, Hsu C-T, Niu H-S, Chang C-H, Cheng J-T, Shieh J-M. Lung damage induced by hyperglycemia in diabetic rats: The role of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *J Diabetes Complications*. 2016; 30(8): 1426–1433. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.07.005>.
36. Sato K, Hikita H, Myojin Y, Fukumoto K, Murai K, Sakane S, Tamura T, Yamai T, Nozaki Y, Yoshioka T, Kodama T, Shigekawa M, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T. Hyperglycemia enhances pancreatic cancer progression accompanied by elevations in phosphorylated STAT3 and MYC levels. *PLoS One*. 2020; 15(7): e0235573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235573>.
37. Gibson JF, Johnston SA. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genetics and Biology*. 2015; 78: 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.11.006>.

38. Pericolini E, Gabrielli E, Bistoni G, Cenci E, Perito S, Chow SK, Riuzzi F, Donato R, Casadevall A, Vecchiarelli A. Role of CD45 signaling pathway in galactoxylomannan-induced T-cell damage. *PLoS One*. 2010; 5(9): e12720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012720>.
39. Salerno BS, Pereira ABM, de Souza HI, Silva-Vergara ML, Levy BD, Rogerio AP. Anti-inflammatory actions of aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1) in bronchial epithelial cells infected with *Cryptococcus neoformans*. *Inflammopharmacology*. 2021; 29(5): 1603–1612. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00855-2>.
40. Lee MF, Wang NM, Liu SW, Lin SJ, Chen YH. Induction of interleukin 8 by American cockroach allergens from human airway epithelial cells via extracellular signal regulatory kinase and jun N-terminal kinase but not p38 mitogen-activated protein kinase. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2010;105(3): 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2010.07.008>.
41. Gremese E, Tolusso B, Bruno D, Perniola S, Ferraccioli G, Alivernini S. The forgotten key players in rheumatoid arthritis: IL-8 and IL-17 – Unmet needs and therapeutic perspectives. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*. 2023; 22: 10:956127. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.956127>.
42. Cimini FA, Barchetta I, Porzia A, Mainiero F, Costantino C, Bertoccini L, Ceccarelli V, Morini S, Baroni MG, Lenzi A, Cavallo MG. Circulating IL-8 levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with worse inflammatory and cardiometabolic profile. *Acta Diabetologica*. 2017; 54(10): 961–967. <https://doi.org/10.1007/s00592-017-1039-1>.
43. Wilkinson HN, Clowes C, Banyard KL, Matteuci P, Mace KA, Hardman MJ. Elevated local senescence in diabetic wound healing is linked to pathological repair via CXCR2. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2019; 139(5): 1171–1181. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.01.005>.
44. Wang YH, Zhang YG. Poly (I:C) alleviates obesity-related pro-inflammatory status and promotes glucose homeostasis. *Cytokine*. 2017; 99: 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.07.011>.
45. Tavares LP, Garcia CC, Machado MG, Queiroz-Junior CM, Barthelemy A, Trottein F, et al. CXCR1/2 antagonism is protective during influenza and post-influenza pneumococcal infection. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 1055. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01799>.
46. Hayden MS, Ghosh S. NF-κB in immunobiology. *Cell Research*. 2011; 21(2): 223–244. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.13>.

47. Guillot L, Carroll SF, Homer R, Qureshi ST. Enhanced innate immune responsiveness to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with resistance to progressive infection. *Infection and Immunity*. 2008; 76(10): 4745–4756. <https://doi.org/10.1128/IAI.00341-08>.
48. McDermott AJ, Tumey TA, Huang M, Hull CM, Klein BS. Inhaled *Cryptococcus neoformans* elicits allergic airway inflammation independent of Nuclear Factor Kappa B signalling in lung epithelial cells. *Immunology*. 2018; 153(4): 513–522. <https://doi.org/10.1111/imm.12853>.
49. Pereira ABM, Oliveira JR, Souza ALJ, Andrade-Silva L, Silva MV, Silva PR, Silva-Vergara ML, Rogerio AP. Effects of cigarette smoke extract on bronchial epithelial cells stimulated with *Cryptococcus neoformans*. *Medical Microbiology and Immunology*. 2021; 210(4): 221–233. <https://doi.org/10.1007/s00430-021-00715-4>.
50. Poladian N, Orujyan D, Narinyan W, Oganyan AK, Navasardyan I, Velpuri P, Chorbajian A, Venketaraman V. Role of NF-κB during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(2): 1772. <https://doi.org/10.3390/ijms24021772>.
51. Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *The Journal of Immunology*. 2001; 166(7): 4620–4626. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4620>.
52. Reischke S, Rousk J, Bååth E. The effects of glucose loading rates on bacterial and fungal growth in soil. *Soil Biol Biochem*. 2014; 70: 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.011>.
53. Paterson E, Osler G, Dawson LA, Gebbing T, Sim A, Ord B. Labile and recalcitrant plant fractions are utilized by distinct microbial communities in soil: Independent of the presence of roots and mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*. 2008; 40(5): 1103–1113. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.003>.
54. Moore JC, McCann K, de Ruiter PC. Modeling trophic pathways, nutrient cycling, and dynamic stability in soils. *Pedobiologia*. 2005; 49(6): 499–510. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2005.05.008>.