

DAYANE CRISTINA DA SILVA SANTOS

**Avaliação de isolados polimórficos de
Cryptococcus neoformans e *C. gattii* tolerantes a
anfotericina B em modelos de camundongos e
alternativo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador:

Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

SÃO PAULO

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Santos, Dayane Cristina da Silva.

Avaliação de isolados polimórficos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* tolerantes a anfotericina B em modelos de camundongos e alternativo / Dayane Cristina da Silva Santos. – 2017.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.
Orientação: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem.

1. Criptococose. 2. Virulência 3. Anfotericina B. 4. Fluconazol. 5. Citocinas.

SES/CCD/CD-340/2017

**Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Micologia
do Instituto Adolfo Lutz e teve o apoio financeiro da Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo
2012/21563-0).**

Agradecimentos

À **Prof. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem e amiga**, meus sinceros agradecimentos pela orientação e contribuição para evolução do meu conhecimento científico. Muito obrigada por confiar em meu trabalho e pelas grandes oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

A todos os amigos do **Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz**, agradeço por fazerem parte desta fase tão importante. Sinto-me muito feliz por pertencer a essa equipe desde o aprimoramento profissional. Agradecimento especial aos pesquisadores Walderez, Sandra, Marilena, Dulcelena e Lucas obrigada por todo apoio. Ao apoio da bióloga Miriam, do querido Andrés, Lindete e Jeferson. Em especial aos queridos amigos e pós-graduandos que participaram ativamente deste projeto Juliana, Lidiane, Igor, Sônia e Carlos, e também à Cirlene, Letícia, Dayse e Tiago. Às aprimorandas Milena e Suelen. Muito obrigada pelo convívio, pelas discussões de artigos e por participarem das conquistas e vitórias.

A conclusão desse trabalho só foi possível devido à colaboração e participação de especialistas de várias instituições. Agradecimento especial ao Prof. Salman e equipe (Isabelly, Anie e Mitra) da McGill University (Canadá), ao Prof. Osmar e equipe (Thaysa e Helen) da UNESP Rio Claro, ao Prof. Pedro e equipe (Thiago) do Instituto Butantan, as pesquisadoras Juliana e Natália e equipe (Juliana, Lígia, Leonardo e Carol) da Patologia do Instituto Adolfo Lutz, aos pesquisadores Raquel, Paula e Cyro da Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, ainda agradeço à Rosa e ao Rogério pela participação nas análises estatísticas e à Cleide, Fátima e Leda por todo apoio no biotério de experimentação do Instituto Adolfo Lutz.

Com muito amor agradeço à minha família, em especial à minha vó Dulcinéia, minha mãe Shirlei, a minha irmã Mylena, ao Edson, e a todos os meus tios, tias e primos. Obrigada por todo incentivo e apoio.

Ao meu tesouro, querido esposo Denilson, pela força e principalmente compreensão às minhas ausências, seu amor e seu apoio foi fundamental!

Aos meus queridos amigos de toda vida Rê, Lú (querida prima) e Caco, Paula e Silvério, Silvinha, Day e Helton, Gilberto e Glênia, Mariane e Théo, Leila e Helton, Suzanice e Vinícius e ao "paredão": Mi Colombo, Mi Marques, Sô, Rô, Fá, Nessa, Daya e Paulinha o tempo e a distância não apagaram nossa amizade!

RESUMO

Criptococose é uma micose com alta morbidade e mortalidade. O estabelecimento e progressão da doença envolve uma interação complexa entre o fungo e células hospedeiras. Este estudo teve o objetivo de buscar novos modelos alternativos (larvas de insetos) para criptococose, selecionar cepas do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* por triagem em cultura celular pela produção de óxido nítrico, IL-8 e pela citotoxicidade, determinar a suscetibilidade de duas linhagens murinas (A/Sn e BALB/c) à infecção e analisar no modelo mais suscetível a virulência (carga fúngica, sobrevida e histopatológico) e a resposta imunológica por recrutamento de células T (CD3+, CD4+ e CD8+), células B, granulócitos e macrófagos, ou por produção de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6) e Th2 (IL-4 e IL-10). Os modelos invertebrados estudados foram *Apis mellifera* e *Zophobas morio* em fase larval. As larvas foram inoculadas com cepa padrão de *C. neoformans* e sobrevivência foi registrada, diariamente. Larvas foram eutanasiadas periodicamente e colônias foram analisadas pela técnica PCR *fingerprinting* com primer M13, para determinação molecular de similaridade. A linhagem murina mais suscetível foi BALB/c, para estudo em cepas produtoras de células titans foram selecionados três isolados resultantes de alta secreção de IL-8, e inoculados para quantificação de carga fúngica e histopatológico aos 14 e 21 dias. Para estudo em cepa tolerante a AmB foram selecionadas subpopulações tolerantes das cepas H99 e R265, e inoculadas em BALB/c, para produção de citocinas Th1 e Th2 e virulência aos 7, 14 e 21 dias. Larvas de *Apis mellifera* foram suscetíveis a infecção por *C. neoformans*, diferentemente, larvas de *Zophobas morio* apresentaram desenvolvimento biológico normal e 100% de sobrevida até o final do experimento. Este achado indica que a infecção ocorreu, porém foi debelada pelas defesas naturais do animal. Análise de bandas indicou que os isolados de *C. neoformans* obtidos de ambas larvas após a inoculação, apresentaram o perfil de bandas idêntico ao do isolado inicial. A formação de células titans *in vivo* provocou aumento significativo de células T em pulmões murinos e alta carga fúngica reforçando a proposta desse fator como marcador de mau prognóstico. A subpopulação tolerante de *C. gattii* R265 induziu menos, de modo significativo, citocinas Th1, tais como IFN- γ e TNF- α , aos 7 dpi, em relação à sua cepa parental. Estes achados indicam que o fenômeno de tolerância à AmB modula a resposta imune adaptativa em infecções por *C. gattii*. O presente estudo sugere que a formação de células titans ocorre devido a fatores da resposta imune, mas também está relacionada com as características da cepa. O encontro de maior carga fúngica em camundongos infectados com subpopulação tolerante pode implicar em necessidade de doses terapêuticas maiores na ocorrência de cepas com capacidade de formação dessas subpopulações.

ABSTRACT

Cryptococcosis, a life-threatening fungal disease. Establishment and progression of disease involves a complex interplay between the fungus and a diverse range of host cell types. The aim of this study was to evaluate strains of the complex species *C. neoformans*/*C. gattii* in murine model and in 2 new alternative model invertebrate. In first step, We evaluated the virulence of the *Cryptococcus spp.* strains at screening in cell culture human and murine, the release of the inflammatory cytokine IL-8 and host cell damage were adopted for analyze the activation of the cell line. To study strains produce titan cells, we select 2 clinical isolates and strain type H99 resulting high release of IL-8 to inoculated BALB/c mice aiming to analyze titan cell production and immune responses of T-cells (CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺), B-cells, granulocytes and macrophages. We quantified the cryptococcal burden (CFUs/mL) in the lungs and brains at 14 and 21 days. To study tolerant strain to amphotericin B we select 2 strains strain type H99 and IAL 3238, inoculated in two murine BALB/c and A/Sn, the progression of cryptococcosis was assessed by quantification of fungal burden and histopathology analysis after 7, 14 and 21 days. The invertebrate models studied were *Apis mellifera* and *Zophobas morio* in larval stage. The larvae were inoculate with strain type of *C. neoformans* and survival was recorded daily for up to 96 hours to *Apis mellifera* and *Zophobas morio* to adulthood. Larvae were euthanize periodically and colonies were analyze by polymerase chain reaction (PCR) fingerprinting with M13 primer for molecular determination of similarity. Larvae of *Apis mellifera* were susceptible to infection with *C. neoformans*, by contrast, larvae *Zophobas morio* had normal biological development and 100% survival to the end of the experiment. This finding indicates that the infection occurred, but was quelled by the natural defense of the animal. Analysis bands generated with the M13 primer by PCR-fingerprinting technique indicated that the *C. neoformans* isolates obtained from both larvae after inoculation showed the bands profile identical to the original isolate. BALB/c mice presented both Th1-type and Th2-type response, an effective Th1-type response control the infection limited to the lungs. In opposite, the Th2-type response allowed dissemination of the yeast to brains. Importantly, we found a positive correlation between Th2 type response and titan cells production as recently reported. Additionally, we suggested the formation of titan cells is a response to factors of the immune response but also is related to strain characteristics. These findings suggested the non-protective immune response is related to highly titan cell formation and depend on the strain. Future studies are needed to evaluate specific virulence strain factors that could influence *in vivo* titan growth pattern besides host immune response.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AmB	Anfotericina B
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	American type culture collection
BEAS-2B	Linhagem celular epitélio traqueobrônquico humano
°C	Graus Celsius
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>C. gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
DO	Densidade ótica
DL 50%	Dose Letal 50%
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
H&E	Hematoxilina Eosina
FLC	Fluconazol
HIV	Human Immunodeficiency Vírus - Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
L	litro
LDH	Lactato desidrogenase
mg	miligramas
MOI	Multiplicidade de infecção

MH-S	Linhagem celular macrófagos alveolares murinos
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NO	Óxido nítrico
PAS	Ácido Periódico-Schiff
PBS	Polymerase Chain Reaction - Reação em cadeia da polimerase
PCR	Restriction Fragment Length Polymorphisms - Análise de
RFLP	fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio quimicamente definido composto por aminoácidos e vitaminas)
spp.	Espécies
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE FIGURAS, TABELAS, QUADROS E APÊNDICES

- Figura 1. Fluxograma de experimento de padronização de via de inoculação e experimento de dose letal 50% com larvas de *Apis mellifera* 39
- Figura 2. Fluxograma de experimento de padronização com a espécie *Zophobas morio* 40
- Figura 3. Desenho do estudo experimental *in vivo* com a linhagem BALB/c; dpi, dias pós infecção; CFU, unidades formadoras de colônia; BAL, lavado broncoalveolar 45
- Figura 4. Curvas de morte de subpopulações de *C. neoformans* (IAL3704, IAL3705) e *C. gattii* (IAL3238, IAL3711) tolerantes *in vitro* à anfotericina B 51
- Figura 5. Secreção de óxido nítrico (NO) em cultura de células MH-S estimuladas por 24 h com várias concentrações (MOI 10, 20, 50) de cepas polimórficas de *C. neoformans* (3071,3075,3700,3702) e cepa-padrão de virulência H99. 52
- Figura 6. Secreção de lactato desidrogenase, mensurada em densidade óptica, em cultura de células MH-S estimuladas por 24 h com várias concentrações (MOI 10, 20, 50) de cepas polimórficas de *C. neoformans* (3071,3075,3700,3702) e cepa-padrão de virulência H99. 54
- Figura 7. Secreção de interleucina 8 em cultura de células BEAS-2B estimuladas por 24 h com várias concentrações (MOI 1, 10, 20) de cepas polimórficas de *C. neoformans* (3071,3075,3700,3702) e cepa-padrão de virulência H99 55

Figura 8. Secreção de lactato desidrogenase, mensurada em densidade ótica, em cultura de células BEAS-2B estimuladas por 24 h com várias concentrações (MOI 1, 10, 52) de cepas polimórficas de <i>C. neoformans</i> (3071,3075,3700,3702) e cepa-padrão de virulência H99	56
Figura 9. Secreção de interleucina 8 em cultura de células BEAS-2B estimuladas por 24 h com várias concentrações (MOI 1, 10, 20) de cepas polimórficas de <i>C. neoformans</i> (IAL3071,IAL3075,IAL3700,IAL3702), tolerantes à anfotericina B de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> (IAL3238, IAL3704, IAL3705, IAL3711), cepas ambientais de <i>C. neoformans</i> (IAL 3706, IAL3707) e cepa-padrão de virulência H99. Cepas de controle interno: IAL3066, IAL3233, IAL3253, IAL3688	57
Figura 10. Curva dose-resposta para determinação de dose letal 50% em larvas de <i>Apis mellifera</i>	59
Figura 11. Eletroforese PCR- <i>fingerprinting</i> com <i>primer</i> M13 de colônias de <i>C. neoformans</i> obtidas após infecção de larvas de <i>Apis mellifera</i> . 1 Kb DNA ladder, padrão de peso molecular; H99 strain, cepa-padrão H99 antes da inoculação; demais bandas: isolados recuperados após infecção enumerados de AO107A a AO104D	60
Figura 12. Ilustração de fases do ciclo de vida de <i>Zophobas morio</i> inoculado com <i>C. neoformans</i>	61
Figura 13. Gel de eletroforese PCR- <i>fingerprinting</i> com <i>primer</i> M13.	62

1 Kb DNA ladder, padrão de peso molecular; bandas identificadas com WM, cepas-padrão de tipos moleculares; bandas identificadas como ZM, isolados recuperados de animais inoculados

Figura 14. Curvas de sobrevida (tempo em dias) de 2 linhagens de camundongos (A/Sn e BALB/c) inoculados com *C. neoformans* H99, segundo 3 concentrações de inóculo ($10^4=10^4$ UFC/mL, $10^5=10^5$ UFC/mL, $10^6=10^6$ UFC/mL). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox) em que asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Figura 15. Curvas de sobrevida e carga fúngica em 2 linhagens de camundongos infectados com *C. neoformans* H99 ($10^5=10^5$ UFC/mL). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox), histogramas representam média de resultados para 5 animais, asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ (test-t)

Figura 16. Cortes histológicos de pulmões de BALB/c e A/Sn após 7, 14 e 21 dias de infecção (dpi), com cepa *C. neoformans* H99, coloração HE (10x esquerda, 40x direita)

Figura 17. Curvas de sobrevida (tempo em dias pós infecção, dpi) e carga fúngica em 2 linhagens de camundongos infectados com *C. gattii* R265 (1×10^5 UFC/mL). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-

Cox), histogramas representam média de resultados para 5 animais, asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos $**p < 0,01$ (test-*t*)

Figura 18. Carga fúngica em camundongos BALB/c infectados (1x10⁵ UFC/mL) com *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265. Os histogramas representam média de resultados de 5 animais, asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos $*p < 0,05$ $**p < 0,01$ (test-*t*) 68

Figura 19. Camundongos BALB/c infectados via intranasal com 1x10⁴ células de *C. neoformans*, H99 (*n*=2), 3071 (*n*=4) e 3700 (*n*=4). 14 dias pós inoculação, foi retirado lavado broncoalveolar e contado cerca de 300 células por animal. (A) Células titans (diâmetro, >10 µm) corada com tinta da China quantificada por microscopia (40x). (B) Porcentagem de células titans por cepa inoculada $**$, $P < 0.000$ 70

Figura 20. Carga fúngica em tecidos de camundongos BALB/c infectados (10⁴ UFC/mL) com 2 cepas polimórficas (IAL3071, IAL3700) e cepa-padrão H99. A) pulmão aos 14 dias pós infecção (dpi); B) cérebro aos 21 dpi; C) pulmão aos 21 dpi. $*p < 0,05$; $***p < 0,001$ 71

Figura 21. Histopatológico de pulmão de BALB/c após 14 dias de infecção, colorações HE e PAS. (10x) 73

Figura 22. Resposta inflamatória pulmonar (14 dias) em camundongos BALB/c infectados com cepas de *C. neoformans* 74

IAL3071, IAL3700 ou cepa-padrão H99; DCS células dendríticas

* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Figura 23. Células da cepa *C. neoformans* H99 e de sua subpopulação tolerante, obtida após exposição por 72 horas à 1 mg de anfotericina B (coloração por azul de lactofenol, 40x) 76

Figura 24. Curvas de sobrevida e carga fúngica (em dias pós infecção, dpi) em camundongos BALB/c infectados (1×10^5 UFC/mL) com subpopulação tolerante de *C. neoformans* (H99T72) e cepa parental H99. Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox), histogramas representam média de 5 animais; asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos * $p < 0,05$ (test- t) 77

Figura 25. Curvas de sobrevida (tempo em dias pós infecção, dpi) e carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com subpopulação tolerante de *C. gattii* R265T72 ou cepa parental R265 (1×10^5 UFC/mL). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox), histogramas representam média de resultados de 5 animais; asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ (test- t) 78

Figura 26. Curvas de sobrevida de BALB/c infectados com subpopulação tolerante H99T72 ou cepa parental de *C. neoformans* H99 e tratados com AmB (1mg/kg/dia). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes 80

níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox); diferença estatística entre os grupos ** $p < 0,001$ (test- t)

Figura 27. Carga fúngica em camundongos BALB/c infectados (1x10⁵ UFC/mL) com subpopulação tolerante H99T72 ou cepa parental de *C. neoformans* H99 e tratados com AmB (1mg/kg/dia). Histogramas representam média de resultados de 5 animais, após 7, 14 e 21 dias pós infecção-dpi 81

Figura 28. Curvas de sobrevida e carga fúngica em camundongos BALB/c infectados subpopulação tolerante R265T72 ou cepa parental de *C. gattii* R265, tratados com AmB (1mg/kg/dia). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox) ** $p < 0,001$ 82

Figura 29. Carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com subpopulação tolerante R265T72 ou cepa parental de *C. gattii* R265, tratados (AmB) e não tratados. Histogramas representam média de resultados de 5 animais, após 7, 14 e 21 dias pós infecção-dpi; asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos sem tratamento ** $p < 0,001$ (test- t) 83

Figura 30. Histopatológico de pulmões de camundongos BALB/c infectados com subpopulações tolerantes à AmB (acima H99T72 e abaixo R265T72), sem tratamento (esquerda) e com tratamento (direita) com AmB (1mg/kg/dia), coloração HE (40x) 84

Figura 31. Concentração de citocinas em camundongos BALB/c e A/Sn infectados com *C. neoformans* H99. A concentração das 86

citocinas foi determinada em pulmões macerados aos 7, 14 e 21 dias pós infecção (dpi) ou cérebro macerado aos 21 dpi (*). Os histogramas representam média e o desvio padrão de resultados de 5 animais em cada período analisado. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2-way com *post-test* Dunnett) * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Figura 32. Concentração de citocinas em camundongos BALB/c e A/Sn infectados com *C. gattii* R265. A concentração das citocinas foi determinada em pulmões macerados aos 7, 14 e 21 dias pós infecção (dpi) ou cérebro macerado aos 21 dpi(*). Os histogramas representam média e o desvio padrão de resultados de 5 animais em cada período analisado. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2-way com *post-test* Dunnett) * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Figura 33. Concentração de citocinas em camundongos BALB/c infectados com *C. neoformans* H99 ou *C. gattii* R265. A concentração das citocinas foi determinada em pulmões macerados aos 7, 14 e 21 dias pós infecção (dpi) ou cérebro macerado aos 21 dpi (*). Os histogramas representam média e o desvio padrão de cinco diferentes animais em cada período analisado. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2-way com *post-test* Dunnett) * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Figura 34. Concentração de citocinas em camundongos A/Sn infectados com *C. neoformans* H99 ou *C. gattii* R265. A

concentração das citocinas foi determinada em pulmões macerados aos 7, 14 e 21 dias pós infecção (dpi) ou cérebro macerado aos 21 dpi (*). Os histogramas representam média e o desvio padrão de resultados de 5 animais em cada período analisado. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2-way com post-test Dunnett) * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Figura 35. Concentração de citocinas em camundongos BALB/c infectados com *C. neoformans* subpopulação tolerante à AmB (H99T72) ou cepa parental H99. A concentração das citocinas em pulmões macerados aos 7 dias pós infecção. Os histogramas representam média e o desvio padrão de resultados para 5 diferentes animais do período analisado 91

Figura 36. Concentração de citocinas em camundongos BALB/c infectados com *C. gattii* subpopulação tolerante à AmB (R265T72) ou cepa parental R265. A concentração das citocinas em pulmões macerados aos 7 dias pós infecção. Os histogramas média e o desvio padrão de resultados de 5 diferentes animais do período. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos ** $p < 0,001$ 92

Figura 37. Carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com subpopulação heterorresistente de *C. neoformans* (IAL 3066 adaptada) ou cepa parental 3066 (1×10^5 UFC/mL) tratados com fluconazol (40 mg/kg/dia). Os histogramas média de 5 animais; asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos ** $p < 0,001$ (test-*t*) 94

ÍNDICE

1. Introdução	20
1.1 Criptococose e seus agentes etiológicos	20
1.2 Sorotipos e tipos moleculares	21
1.3 Tratamento da criptococose	22
1.4 Resistência ao tratamento.....	23
1.4.1 Resistência clínica à anfotericina B.....	23
1.4.2 Resistência <i>in vitro</i> à anfotericina B.....	24
1.4.3 Metodologias para determinação da concentração inibitória mínima...25	
1.4.4 Metodologia de curvas de morte.....	26
1.5 Modelos experimentais na criptococose	27
1.5.1 Modelos tradicionais.....	28
1.5.2 Modelos alternativos.....	32
1.6 Resposta imune na criptococose e interação patógeno-hospedeiro	34
2. Objetivos	37
2.1 Geral	37
2.2 Específicos.....	37
3. Material e Métodos	39
3.1 Cepas fúngicas	39
3.2 Ensaios <i>in vitro</i>	39
3.2.1 Curvas de morte.....	39
3.2.2 Avaliação de resposta celular contra <i>Cryptococcus</i> spp.....	40
3.3 Ensaios <i>in vivo</i>	43
3.3.1 Modelos Alternativos.....	43
3.3.2 Modelos tradicionais.....	50
4. Resultados	59
4.1 Ensaios <i>in vitro</i>	59
4.1.1 Curvas de morte para obtenção de subpopulação tolerante à AmB.....	59
4.1.2 Avaliação de resposta celular <i>in vitro</i>	60
4.2 Resultados <i>in vivo</i>	66
4.2.1 Experimentos com modelos alternativos.....	66

<i>Apis mellifera</i>	66
<i>Zophobas morio</i>	69
4.2.2 Experimentos com modelos tradicionais murinos.....	70
Carga fúngica de cepas polimórficas em tecidos murinos.....	77
Ensaio com <i>C. neoformans</i> cepa H99 e H99T72	83
Ensaio com <i>C. gattii</i> cepa R265 e sua subpopulação tolerante R265T72..	85
5. Discussão	103
6. Conclusões	113
7. Referências Bibliográficas	116

1.Introdução

A criptococose é micose com distribuição mundial, que tem formas localizada e sistêmica. A doença é causada por leveduras, com a característica de formarem cápsula de mucopolissárides, que pertencem a um complexo de duas espécies: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Casadevall e Perfect, 1998; Meyer e Trilles, 2010). Os quadros de meningoencefalite, comuns na doença, são potencialmente fatais e apresentam altos índices de recidivas. Dados recentes demonstram que, aproximadamente, 1.000.000 de casos de meningite criptocócica ocorrem a cada ano em pacientes com AIDS, resultando em aproximadamente 600.000 mortes no período inicial de três meses da infecção (Park *et al.*, 2009). No Brasil, a criptococose ocorre em taxas variadas, de 6% a 48% dos indivíduos com AIDS (Pappalardo e Melhem, 2003) e foi caracterizada como a micose mais frequente causando morte em pacientes com AIDS (Prado *et al.*, 2009).

1.1 Criptococose e seus agentes etiológicos

Além de *C. neoformans* e *C. gattii*, existem cerca de quinze outros membros do gênero *Cryptococcus*, descritos como agentes da doença humana: *C. laurentii*, *C. luteolus* (representam 80% dos agentes não-*C. neoformans* e não-*C. gattii*), *C. albidus*, *C. diffluens* e *C. uniguttulatus* entre outros (Heitman *et al.*, 2011). Infecções por *C. neoformans* ocorrem em todo o mundo relacionadas à imunodepressão, sendo o principal agente da doença quando associada à AIDS. Infecção por *C. gattii* são observadas, também, em hospedeiros imunocomprometidos, mas, são observadas em pacientes sem imunodepressão aparente e sem infecção pelo HIV (Kwon-Chung e Bennett, 1992; Chen *et al.*, 2010). *Cryptococcus gattii* forma, com mais frequência, nódulos tumorais únicos, ou múltiplos, denominados criptococomas (Kwong-Chung e Bennet, 1984; Mitchell e Perfect, 1995; Sorrel, 2001; Thompson *et al.*, 2012). A determinação exata da espécie é

importante, não apenas por questões clínico-epidemiológicas, mas ainda porque pode indicar diferenças na virulência ou na suscetibilidade aos agentes terapêuticos.

Os fatores de virulência de *C. neoformans* e *C. gattii* são múltiplos e desempenham papéis complexos durante a interação fungo-hospedeiro. Destacam-se nesse processo: produção de polissacarídeos capsulares, síntese de melanina, capacidade de termotolerância à 37°C e produção de exoenzimas (fosfolipase, proteinase e urease). O tipo conjugante (*mating-type*) também determina virulência, sendo α aquele considerado o mais virulento (Casali *et al.*, 2003). Estudos indicam que *C. gattii* é mais virulento e mais resistente ao tratamento do que *C. neoformans* (Gomez-Lopez *et al.*, 2008; Trilles *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2012). Isolados de *C. gattii*, tanto ambientais quanto clínicos, podem ser menos sensíveis aos antifúngicos em comparação a isolados de *C. neoformans* (Gomez-Lopez *et al.*, 2008; Trilles *et al.*, 2011). Em um estudo de virulência em animais de experimentação, *C. gattii* foi comparado a *C. neoformans*, observando-se que *C. gattii* apresentou maior virulência *in vivo* (Thompson *et al.*, 2012). Um surto por *C. gattii* no noroeste do Pacífico, especificamente, na costa do Canadá e Estados Unidos, em que 218 indivíduos apresentaram criptococose e 19 foram à óbito, indicou tipo molecular com alta virulência e ilustra ainda mais a alta morbidade e mortalidade associada a *C. gattii* e a necessidade de melhor compreendê-lo para avaliar as opções terapêuticas para a infecção por este patógeno emergente (Galanis e MacDougall, 2010; Thompson *et al.*, 2012).

1.2 Sorotipos e tipos moleculares

As duas principais espécies de *Cryptococcus* diferem na composição antigênica da cápsula e são, assim, classificadas em sorotipos (A, B, C, D e AD). *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* pertence ao sorotipo A, *C. gattii* aos sorotipos B ou C, *C. neoformans* var. *neoformans* ao sorotipo D e *C. neoformans* ao sorotipo AD.

As duas espécies *C. neoformans* e *C. gattii* englobam tipos moleculares distintos que são classificados de acordo com o perfil do DNA genômico e que, dependendo da técnica aplicada, são conhecidos como: VNI ou AFLP1, VNII ou AFLP1A, VNIII ou AFLP3, VNIV ou AFLP2 e VGI ou AFLP4, VGII ou AFLP6, VGIII ou AFLP5 e VGIV ou AFLP7 (Meyer *et al.*, 2003; Boekhout *et al.*, 2001). As letras VN e VG correspondem à metodologia de DNA-*Fingerprinting* e PCR RFLP, relacionado aos tipos das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente, que eram denominadas: variedade *neoformans* e variedade *gattii*. As iniciais AFLP são originárias da técnica de *Amplified Fragment Length Polymorphism*.

O reconhecimento preciso dos tipos moleculares é importante, pois, cada um está relacionado a distintas formas clínicas associadas a diferentes respostas terapêuticas (Sorrell, 2001). No Brasil, o tipo molecular mais comum é o VNI (64%), seguido por VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada) e VNIII (<1%). Criptococose primária, causada pelo tipo molecular VGII (sorotipo B) prevalece em pacientes sem imunocomprometimento aparente na região Norte e Nordeste do país, revelando um padrão endêmico regional para este tipo molecular (Trilles *et al.*, 2008). Uma recente revisão com base em abordagens fenotípicas e diversidade genotípica apoia a presença de linhagens distintas e concordantes dentro do complexo de espécies *C. neoformans*/*C. gattii*, a qual propõe reconhecer a atual *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* como espécies separadas e cinco espécies dentro de *C. gattii* (Hagen *et al.*, 2015). No entanto, há que se aguardar consenso dos especialistas em taxonomia para essa nova nomenclatura ser amplamente adotada.

1.3 Tratamento da criptococose

A escolha do tratamento da doença depende da imunidade e doença de base do paciente, do sítio de infecção e da toxicidade do antifúngico. Os antifúngicos mais comumente utilizados para tratar a meningite criptocócica são: anfotericina B (AmB), 5-fluorocitosina (5-FC), fluconazol

(FLU) e itraconazol (ITZ) (Perfect *et al.*, 2010; Saag *et al.*, 2000). O tratamento consiste em uma fase de indução por duas semanas, com uma dose de 0,7-1mg/kg/dia de AmB associada ou não a 100mg/kg/dia de 5-FC, seguida por 10 semanas de terapia de consolidação com 400mg/dia de FLU, e completada, em casos com alto risco de recidiva da infecção, com terapia de manutenção com FLU (Saag *et al.*, 2000; Moretti *et al.*, 2008; Perfect *et al.*, 2010). Para pacientes nos quais o FLU não pode ser utilizado, ITZ é aceitável, porém é uma alternativa menos eficaz (Saag *et al.*, 2000).

1.4 Resistência ao tratamento

Falência terapêutica ou resistência clínica é definida como: isolamento do agente etiológico associado à deterioração do estado clínico (manutenção de pressão intracraniana elevada, falta de melhora dos sinais e sintomas clínicos após duas semanas de terapia antifúngica apropriada ou recaída após a terapêutica inicial), na vigência de terapêutica adequada (Moretti *et al.*, 2008).

Altas taxas de persistência de fungos e recidiva da doença provocaram a crescente preocupação entre os médicos sobre o potencial para o surgimento de resistência antifúngica entre isolados de *C. neoformans* (Brandt *et al.*, 2001).

A resistência microbiológica é definida, classicamente, como um fenômeno verificado *in vitro*, no qual o agente etiológico consegue se desenvolver na presença de concentrações terapêuticas do antifúngico.

1.4.1 Resistência clínica à anfotericina B

Apesar da terapia antifúngica disponível, a criptococose ainda tem taxas de mortalidade próxima à 20% (Perfect *et al.*, 2010). Pacientes com AIDS e meningite criptocócica que sobrevivem após o tratamento inicial de indução geralmente requerem longa terapia de manutenção para evitar recidivas (Brandt *et al.*, 2001).

Nos países desenvolvidos, onde a terapia padrão é iniciada com AmB, as taxas de recaídas anuais para doença criptocócica durante a manutenção de tratamento com FLU situam-se em 5% (Bicanic *et al.*, 2005).

O insucesso do tratamento atribuível ao desenvolvimento da resistência em pacientes tratados com AmB ainda não está comprovado, já que o número de relatos de resistência clínica relacionado à cepas menos sensíveis de *C. neoformans* é, surpreendentemente, baixo e foi observado apenas em três relatos associados à AIDS (Powderly *et al.*, 1992; Marriott *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997). No entanto, a própria doença de base poderia ser responsável pela má evolução clínica e é difícil isolar a variável resistência microbiológica como fator preponderante no curso da infecção. A correlação *in vivo-in vitro* em casos tratados com AmB permanece, portanto, ainda um desafio e não há dados conclusivos a respeito do impacto da resistência *in vitro* na evolução da doença.

Os modelos de infecção experimental ocupam posição essencial no estudo de doenças infecciosas, como resultado de problemas éticos de exposição de humanos a agentes potencialmente letais (Wiles *et al.*, 2006; Zak; O' Reilly, 1993). Novas perspectivas abrem-se com o estudo em modelos *in vivo*, que podem complementar resultados de estudos *in vitro* e testar hipóteses sobre falha clínica na criptococose.

1.4.2 Resistência *in vitro* à anfotericina B

O parâmetro mais comum para se avaliar a resistência *in vitro* a AmB é a verificação da concentração inibitória mínima (CIM), parâmetro usado para analisar a eficácia de qualquer fármaco. Os valores de CIM da AmB são, relativamente, baixos e homogêneos, situando-se para *C. neoformans* e para *C. gattii* entre 0,12-2 mg/L (Iqbal *et al.*, 2010; Hagen *et al.*, 2010; Trilles *et al.*, 2011; Chowdhary *et al.*, 2011; Espinel-Ingroff *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012). Em geral, quando o valor de CIM for abaixo de 2 mg/L as cepas de leveduras são classificadas como sensíveis e é o que ocorre com as cepas de *Cryptococcus* spp. (Brandt *et al.*, 2001; Pfaller *et al.*, 2005). No entanto, a importância clínica desses dados é ainda desconhecida

e poucos estudos têm relacionado a evolução clínica e a suscetibilidade do agente etiológico *in vitro* aos antifúngicos usados na prática clínica (Moretti *et al.*, 2008).

Dados anteriores demonstraram que isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* são altamente suscetíveis à AmB e nenhuma diferença foi encontrada nas suscetibilidades entre tipos moleculares VNI, VGI e VGII de isolados brasileiros (Trilles *et al.*, 2011). O mesmo ocorreu com isolados dos Estados Unidos (Iqbal *et al.*, 2010), de países da Europa (Hagen *et al.*, 2010) e da Índia, cujos valores de CIM variaram de 0,12-1mg/L (Chowdhary *et al.*, 2011).

Resistência *in vitro* à AmB foi relatada em alguns estudos, em taxas de 0,6% a 5,3% considerando-se 2 mg /L como ponto de corte (De Bedout *et al.*, 1999; Brandt *et al.*, 2001; Pfaller *et al.*, 2005; Perkins *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2009).

Alguns estudos demonstraram que *C. gattii* pode ser menos sensível do que *C. neoformans* para AmB, porém estes foram avaliados por metodologias distintas (Khan *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2009). Khan e colaboradores, por exemplo, utilizaram o E-test®, ensaio que utiliza meio sólido para difusão do fármaco e cujos resultados nem sempre são compatíveis ao método de microdiluição em caldo (Varma e Kwon-Chung, 2010).

1.4.3 Metodologias para determinação da concentração inibitória mínima

Os métodos para investigação *in vitro* de fenótipos de resistência em leveduras são fundamentados em método de referência, desenvolvidos especialmente pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). O método tem como base a reação de inibição de crescimento do agente etiológico, em meio líquido contendo antifúngicos, denominada microdiluição (CLSI, 2008). O comitê europeu *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) propôs modificações nesse método, no intuito de tornar mais objetiva e reprodutível a leitura do ensaio e diminuir o tempo para emissão de resultados (Cuenca-Estrella *et al.*, 2002; Rodriguez-

Tudela *et al.*, 2007). O método produz resultados equivalentes ao do CLSI para o gênero *Candida* (Espinel-Ingroff *et al.*, 2005). Apenas recentemente, o método europeu foi recomendado para o gênero *Cryptococcus*, mas a metodologia foi empregada, anteriormente, para avaliar amostras de *C. neoformans* e *C. gattii* (Cuenca-Estrella *et al.*, 2002; Espinel-Ingroff *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2006; Gomez-López *et al.*, 2009; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2007; Arendrup *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; EUCAST, 2012)

A determinação da CIM é uma ferramenta que tornou-se extremamente útil para orientar o tratamento de pacientes infectados com leveduras, em especial *Candida* sp. Porém o crescimento de leveduras não-fermentadoras da glicose, como as do gênero *Cryptococcus* nas condições previstas nos protocolos de teste de sensibilidade, é em grande parte, comprometida, devido à limitação de oxigênio encontrada nas placas de microdiluição, além do meio líquido utilizado e da temperatura de incubação. Algumas modificações dessas condições foram sugeridas para melhorar o crescimento de isolados de *Cryptococcus* nos testes de referência (Zaragoza *et al.*, 2011).

Ainda que a microdiluição tenha acurácia para avaliar fenótipos de resistência ao FLU é consenso que, para AmB, outras técnicas devem ser empregadas para melhorar a detecção de tais isolados (Park *et al.*, 2006). O método de curvas de morte foi indicado como uma dessas ferramentas que oferece dados mais fidedignos para demonstrar a atividade fungicida da AmB. Esta metodologia já foi empregada para amostras de *Candida* spp. e *C. neoformans* (Klepser *et al.*, 1998; Rodero *et al.*, 2000; Pappalardo *et al.*, 2009; Córdoba *et al.*, 2011).

1.4.4 Metodologia de curvas de morte

A metodologia de curvas de morte expressa a porcentagem de micro-organismos mortos em função da ação de uma concentração fixa do antifúngico, em condições pré-estabelecidas. Para isso, é realizada uma contagem do número de células viáveis após intervalos periódicos de exposição ao fármaco. Uma Figura tipo dose tempo-resposta pode ser

construída, na base log 10, para ilustrar as diferentes contagens segundo o período de incubação. O ponto final da reação (*endpoint*) é definido quando a taxa de morte for $\geq 99,9\%$ em relação ao número inicial de colônias no tempo zero. Trata-se, portanto, de um teste para avaliar a eficácia fungicida *in vitro* de um fármaco; mas ao contrário de outros métodos de concentração fungicida mínima a metodologia de curvas de morte fornece a informação da dinâmica da ação do antifúngico sobre o agente etiológico (Klepser *et al.*, 1998; Rodero *et al.*, 2000; Pappalardo *et al.*, 2009; Córdoba *et al.*, 2011). Por curvas de morte, podem ser ensaiadas várias concentrações do fármaco, como fizeram Klepser e colaboradores (1997; 1998), que estudaram a atividade de FLU e AmB contra isolados de *C. albicans* e *C. neoformans* (Klepser *et al.*, 1997; Klepser *et al.*, 1998).

O método de curvas de morte por determinar a atividade fungicida representa uma ferramenta especialmente útil para monitorar a ação de AmB, desde que permite a compreensão mais clara dos padrões de inativação de isolados de *Cryptococcus* frente a esse fármaco. Em estudo prévio, Pappalardo e colaboradores com metodologia de curvas de morte, demonstraram que a diferença entre a atividades fungistática, avaliada por CIM, e a atividade fungicida pode ser cepa-dependente entre isolados clínicos de *C. neoformans* (Pappalardo *et al.*, 2009). Pela metodologia de curvas de morte, é possível observar padrões fungicidas distintos entre as cepas *C. gattii* ou *C. neoformans* com valores baixos de CIM à AmB. Isso pode indicar que a CIM obtida pelo método de microdiluição em caldo é limitada para avaliar a atividade inibitória da AmB, desde que trata-se de fármaco fungicida, como sugerido em estudos anteriores (Rex *et al.*, 1995; Ernest *et al.*, 2000; Pappalardo *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012).

1.5 Modelos experimentais na criptococose

A utilização de novos modelos de experimentação tem sido frequente em muitas áreas da pesquisa biomédica, incluindo a de fungos patogênicos isolados de pacientes (Sabiiti *et al.*, 2011).

1.5.1 Modelos tradicionais

A criptococose tem sido estudada em ratos, coelhos, porcos e camundongos, sendo o último modelo de experimentação mais frequente por ser altamente suscetível às espécies de *Cryptococcus* spp. (Zaragoza *et al.*, 2007). Várias vias e locais de inoculação têm sido utilizado para induzir a infecção em modelos experimentais: intradérmico (Perceval, 1965), intracerebral (Blasi *et al.*, 1992), inalação intranasal (Lin *et al.*, 1980; Lima e Vital., 1994; Riera *et al.*, 1984), intratraqueal (Mody *et al.*, 1988; Goldman *et al.*, 1994; Kawakami *et al.*, 2002), intravenosa (Mody *et al.*, 1988; Goldman *et al.*, 1994; Kawakami *et al.*, 2002) e intraperitoneal (Lim *et al.*, 1980). Em contraste, coelhos são inerentemente resistentes à criptococose e se faz necessária a inoculação em locais incomuns, como tecido subcutâneo, testículos ou fluido cérebro-espinhal. A condição de imunossupressão com fármacos corticosteróides pode ser necessária para estabelecimento da doença (Casadevall e Perfect, 1998; Perfect *et al.*, 1989).

O uso do modelo de camundongo torna possível avaliar o curso infeccioso e a terapêutica em diversas micoses sistêmicas (Graybill *et al.*, 2003). Além disso, a manutenção desses animais é de baixo custo, são de manuseio fácil e apresentam diversas linhagens caracterizadas geneticamente, viabilizando a escolha de modelo adequado à análise proposta. A suscetibilidade de camundongos, em particular da linhagem BALB/c-SCID (imunodeficiente), varia conforme o sorotipo, sendo mais suscetíveis à criptococose sistêmica experimental causada por *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) (Clemons *et al.*, 1996; Huffnagle *et al.*, 1991). A criptococose sistêmica induzida em camundongos com imunodeficiência é útil, também, para estudos imunológicos, além da avaliação terapêutica em indivíduos imunodeficientes (Clemons *et al.*, 1996). O Quadro 1 mostra uma revisão de autores que realizaram criptococose experimental.

Estudos de infecção experimental com *C. neoformans* resultaram em aumento celular deste agente fúngico e da espessura da parede (Feldmesser *et al.*, 2001; Okagaki *et al.*, 2010). Estas alterações morfológicas

afetaram a patogenicidade através da redução da fagocitose por células mononucleares hospedeiras, aumentando a resistência à oxidação, e reduzindo a penetração no sistema nervoso central (Okagaki *et al.*, 2010).

Estudos para avaliar a resposta terapêutica em camundongos foram realizados com os principais antifúngicos. Dados recentes de Mendes e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento com FLU em camundongos da linhagem Swiss infectados com *C. gattii*, pode levar à aquisição de resistência a este fármaco (Mendes *et al.*, 2010). Estudos para AmB no tratamento da criptococose experimental são mais numerosos, destacando-se os resumidos no Quadro 2.

Quadro 1. Estudos em criptococose animal para investigação de virulência do agente

Ano	Autores	Modelo animal
1965	Perceval	Camundongos
1980	Lim <i>et al.</i>	Camundongos CBA/J
1980	Perfect <i>et al.</i>	Coelhos machos New Zealand
1994	Goldman <i>et al.</i>	Ratos machos Fischer
1994	Lima e Vital	Porcos guinea
2000	Feldmesser <i>et al.</i>	Camundongos C57BL/6, A/JCr e 129/SvEv
2001	Feldmesser <i>et al.</i>	Camundongos C57BL/6, A/JCr, e 129/SvEv
2003	Cox <i>et al.</i>	Camundongos fêmeas A/Jcr
2005	Fraser <i>et al.</i>	Camundongos fêmeas A/Jcr
2006	Silva <i>et al.</i>	Camundongos machos BALB/c
2009	Cheng <i>et al.</i>	Camundongos fêmeas C57BL/6 e A/JCr
2009	Pedroso <i>et al.</i>	Camundongos fêmeas BALB/c
2010	Krockenberger <i>et al.</i>	Ratos fêmeas- Fischer 344 ou Machos- Wistar-Furth
2010	Zaragoza <i>et al.</i>	Camundongos fêmeas BALB/c, C57BL/6J e CD1
2010	Okagaki <i>et al.</i>	Camundongos fêmeas A/J
2012	Ngamskulrunroj <i>et al.</i>	Camundongos C57BL/6 e BALB/c

Quadro 2. Estudos em modelo animal para investigação de resposta terapêutica à anfotericina B

Autor	Modelo	Cepa	Objetivo	CIM		
				AmB (CIM)	FLU (CIM)	PCZ (CIM)
2011 Silva <i>et al.</i>	BALB/c SCID	<i>C. neoformans</i>	terapia combinada cepa R a FLU	0,016µg/mL	128 µg/mL	
2010 Calvo <i>et al.</i>	Swiss machos	<i>C. gattii</i>	PCZ, VCZ, AmB	0,5/0,12 µg/mL	0,5 /0,12 µg/mL	0,25 µg/mL
2006 Schawarz <i>et al.</i>	Swiss machos	<i>C. neoformans</i>	cepas S ou R a 5-FC	1 µg/mL	S ou R a 5-FC	
2005 Zaragoza <i>et al.</i>	C57BL/6J fêmeas	<i>C. neoformans</i>	AmB e tamanho da cápsula	não citado		
1998 Diamond <i>et al.</i>	BALB/c machos	<i>C. neoformans</i>	dispersão coloidal de AmB + 5-FC ±FLU	não citado		
1978 Graybill <i>et al.</i>	BALB/c machos	<i>C. neoformans</i>	miconazol + AmB	não citado		

Id, imunodeficiente; *AmB*, anfotericina B; *FLU*, fluconazol; *VCZ*, voriconazol; *PCZ*, posaconazol; *S*, sensível; *R*, resistente; *5-FC*, 5 fluorcitosina, *±FLU*, com ou sem *FLU*

O número de estudos de virulência com *C. gattii* em camundongos aumentaram após o surto de Vancouver (Fraser *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009; Krockenberger *et al.*, 2010). Fraser e colaboradores observaram alta virulência de genótipos VGI e VGII de *C. gattii* de isolados clínicos representativos do surto de Vancouver (Fraser *et al.*, 2005). Recentemente, a resposta imune do hospedeiro em modelo de camundongos foi comparada frente à cepa de *C. neoformans* VNI (padrão de virulência H99) e *C. gattii* VGII (cepa do surto R265) (Cheng *et al.*, 2009). O estudo demonstrou que a cepa R265 suprime as respostas imunológicas do hospedeiro de forma mais eficaz do que a cepa H99 e sugeriu ainda que esta descoberta pode explicar parcialmente por que *C. gattii* infecta pacientes imunocompetentes mais frequentemente do que *C. neoformans* (Cheng *et al.*, 2009).

1.5.2 Modelos alternativos

Os modelos hospedeiros alternativos são invertebrados que demonstraram correlação com o modelo mamífero de infecção. De fato, estudos de experimentação em insetos, tanto em isolados de *C. neoformans* quanto *C. gattii* mostraram mortalidade similar, em comparação com a infecção em modelo de mamíferos (Fan *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2000; Swanson e Hammer, 2000). Estes estudos têm baixo custo e menos restrições éticas, permitindo a facilidade de análises de fatores ligados à virulência e dimorfismos dos agentes (Chen *et al.*, 2000; Mylonakis *et al.*, 2002; Steenbergen *et al.*, 2003; Nemecek *et al.*, 2006; Byrnes *et al.*, 2011). Embora as células titãs de *C. neoformans* têm sido descritas em levedura isolada a partir de pulmões de camundongos infectados (Goldman *et al.*, 1998; Feldmesser *et al.*, 2001), o seu papel durante a infecção não é completamente compreendido. A atividade de antifúngicos em modelos invertebrados também pode ser avaliada de forma rápida e econômica, possibilitando a medida de fatores-chave no desenvolvimento de medicamentos, incluindo resposta imunológica do hospedeiro, eficácia e toxicidade (Pukkila-Worley *et al.*, 2009; Chamilos *et al.*, 2007; Sabiiti *et al.*, 2011).

Cryptococcus neoformans pode infectar grande variedade de hospedeiros, tais como ameba (*Acanthamoeba castellanii*), nematóides (*Caenorhabditis elegans* e *Dictyostelium discoideum*) ou insetos (tais como *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella*) (Steenbergen *et al.*, 2001; Apidianakis *et al.*, 2004; Mylonakis *et al.*, 2004; Mylonakis *et al.*, 2005; Steenbergen *et al.*, 2003; Steenbergen *et al.*, 2004; Byrnes *et al.*, 2009; García-Rodas *et al.*, 2011). Alguns dos modelos alternativos mencionados acima são limitados pela incapacidade do sistema hospedeiro sobreviver à 37°C ou à dificuldade em administrar o inóculo fúngico exato. Essas limitações não se aplicam para o modelo de hospedeiro *G. mellonella* (Fuchs *et al.*, 2010). *Cryptococcus neoformans* pode proliferar na hemocele da *G. mellonella* levando à morte eventual da larva (Mylonakis *et al.*, 2005). Em estudo recente, García-Rodas e colaboradores (2011) investigaram a interação entre *C. neoformans* e *G. mellonella* e relataram que a infecção criptocócica neste hospedeiro também está associada à significativas alterações morfológicas, tais como: espessamento da cápsula e aparecimento de células gigantes, as quais desempenham um papel importante no desenvolvimento da infecção. Uma vez que estes processos ocorrem também em vertebrados, essas observações indicam respostas celulares semelhantes frente à *C. neoformans* nesse tipo de hospedeiro (García-Rodas *et al.*, 2011).

Galleria mellonella foi empregada, recentemente, para investigar se a atividade antifúngica de FLU poderia ser melhorada com a adição de outras drogas. FLU mostrou ter maior efeito benéfico para a sobrevivência de *G. mellonella* quando administrado em combinação com um anti-histamínico (Vu e Gelli, 2010). Os resultados deste estudo *in vivo* foram apoiados e reforçados por experimentos *in vitro*, em que o FLU, normalmente com ação fungistática, tornou-se fungicida quando combinado com astemizol (Vu e Gelli, 2010). Esta investigação, demonstrou como os dados de sobrevivência em um modelo invertebrado que é relativamente fácil de infectar e monitorar, podem complementar os estudos *in vitro*.

1.6 Resposta imune na criptococose e interação patógeno-hospedeiro

Na criptococose experimental observa-se aumento da formação de granulócitos no sangue e pulmões; porém a proporção de cada população celular parece depender da linhagem do modelo utilizado, indicando modulação da resposta dependente do hospedeiro (Hernandez *et al.*, 2005).

Entre os fatores que influenciam a susceptibilidade à criptococose, a resposta Th1 e Th2, é determinante para o desfecho clínico (Hernandez *et al.*, 2005). A reação inflamatória protetora que envolve o recrutamento de neutrófilos é essencial para indução de resposta imune adaptativa do tipo Th1, não apenas na criptococose mas, também, para outros patógenos respiratórios (Chaturvedi *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 2008). Em contraste, uma resposta não-protetora envolve uma resposta tipo Th2, com a produção de níveis elevados de interleucina-4 (IL-4), bem como, infiltração pulmonar difusa que consiste de células dendríticas imaturas ou macrófagos ativados (Chen *et al.*, 2008; Lin e Heitman, 2006; Jain *et al.*, 2009).

Além de imunidade ineficaz mediada por células, a virulência do agente causador é importante para o desenvolvimento de infecção. *Cryptococcus neoformans* possui múltiplas estratégias de escape das defesas do hospedeiro. Novos conhecimentos sobre virulência deste patógeno e mecanismos de defesa fornecem maior compreensão da natureza da interação patógeno-hospedeiro. A morfologia das células na forma pulmonar da criptococose foi bem caracterizada e o polimorfismo foi descrito. Após a exposição ao ambiente pulmonar, formam-se um subgrupo de células de *C. neoformans* maiores, denominadas "titans" que atingem 50 µm a 100 µm de diâmetro, valores 5 a 10 vezes acima daquele de uma célula típica (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). Estas formas são resultantes tanto do aumento do corpo celular, quanto da cápsula. Cerca de 10% a 20% das células de *C. neoformans* nos pulmões mudam para o fenótipo de células titans (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2013; Blouklas *et al.*, 2013; Zaragoza *et al.*, 2015).

Células titans têm várias características que as diferenciam de células de tamanho normal. A cápsula muda sua estrutura tornando-se,

altamente reticulada, o que dificulta a lise da célula fúngica por métodos químicos ou físicos (Zaragoza *et al.*, 2010). Além disso, a parede celular das células titans é 30 a 50 vezes mais espessa do que a parede celular de células de tamanho regular, visto por microscopia eletrônica de transmissão (Zaragoza *et al.*, 2010). Células titans contribuem para a permanência da levedura no hospedeiro, porque elas não podem ser fagocitadas ou eliminadas e participam ativamente no desenvolvimento da doença, porque elas replicam de forma lenta, além de produzirem gerações de células de tamanho regular (Zaragoza *et al.*, 2010; Bouklas *et al.*, 2013).

De grande importância no curso da doença é a correlação entre o tipo de resposta celular e a indução de produção de células titans, indicando que um padrão Th2 está ligado à alta presença dessas células (Cabtree *et al.*, 2012; Okagaki *et al.*, 2012; Garcia-Barbazán *et al.*, 2015). No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa correlação.

Considerando-se as altas taxas de mortalidade por criptococose em pacientes com AIDS e a dificuldade no tratamento da doença, é evidente a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre as características dos seus agentes etiológicos. A suscetibilidade à fármacos de primeira escolha, como anfotericina B é um parâmetro útil para o prognóstico da infecção. A demonstração *in vitro* de cepas denominadas tolerantes à AmB despertou a atenção sobre a relevância clínica deste achado. Estudos que possam correlacionar a presença de tais cepas com falha terapêutica trarão grande contribuição para a compreensão da patogênese da criptococose. Embora a terapêutica das micoses também tenha evoluído, melhorando não só sua eficácia e espectro de ação, mas também sua tolerabilidade, manejo e tempo de tratamento, o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos tem sido um importante fator de complicação no tratamento das infecções fúngicas, sobretudo em pacientes imunocomprometidos. Do mesmo modo, a existência de polimorfismo nos agentes da criptococose pode estar relacionada ao curso da doença e estudos *in vivo* implementarão informações sobre o tema. Hospedeiros alternativos, como larvas de insetos,

são novos modelos para investigar características específicas dos agentes infectantes, com vantagens significativas sobre outros hospedeiros vertebrados tradicionais. O emprego de modelos *in vivo* abre novas perspectivas que podem complementar resultados de estudos *in vitro*, assim como atuar como ferramenta valiosa para fazer novas descobertas e testar hipóteses sobre falha clínica na criptococose. Investigações focadas na formação de células titans e sua relação com a resposta imune do hospedeiro podem elucidar mecanismos de adaptação que resultem em maior eficácia no desenvolvimento e disseminação da doença.

2. Objetivos

2.1 Geral

Contribuir para o conhecimento de fatores, relacionados aos agentes etiológicos da criptococose- *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*- que possam influenciar a evolução da doença e resposta ao tratamento antifúngico.

2.2 Específicos

1. Buscar novos modelos alternativos invertebrados (larvas de insetos) para criptococose experimental, estudando sobrevivência, carga fúngica e disseminação;
2. Selecionar cepas, de *C. neoformans* e *C. gattii*, quanto à formação de: i) células titans (denominadas polimórficas); e ii) subpopulação tolerante à anfotericina B para avaliar resposta imune *in vitro* induzida por esses grupos;
3. Determinar a suscetibilidade de 2 linhagens murinas à infecção experimental criptocócica;
4. Analisar no modelo murino mais suscetível:
 - resposta imune celular *in vivo* às cepas-padrão de virulência (*C. neoformans* -H99 e *C. gattii* R265), às cepas polimórficas (com formação de células titans) e às subpopulações tolerantes à anfotericina B
 - virulência de cepas polimórficas, sob aspectos de: carga fúngica, histopatologia e/ou recrutamento celular;
 - virulência de subpopulações tolerantes à anfotericina B, quanto à: sobrevivência, carga fúngica, histopatologia e resposta imunológica adaptativa;

-virulência de subpopulações heterorresistentes a fluconazol, quanto à carga fúngica de modelos murinos infectados;

5. Verificar efeito terapêutico de anfotericina B em infecção experimental de murino causada por subpopulações tolerantes ao fármaco, e

6. Avaliar o efeito terapêutico de fluconazol em infecção experimental de murino causada por subpopulação heterorresistente ao fluconazol.

3. Material e Métodos

3.1 Cepas fúngicas

Doze cepas do complexo *C. neoformans/C. gattii* foram utilizadas neste estudo, sendo selecionadas conforme o tipo de procedimento, sendo: 4 cepas de *C. neoformans* polimórficas, assim definidas por conterem células titans (IAL3071, IAL3075, IAL3700, IAL3702), 4 subpopulações tolerantes à anfotericina B de *C. neoformans* e *C. gattii* (IAL3238, IAL3704, IAL3705, IAL3711) e 2 cepas ambientais de *C. neoformans* (IAL 3706, IAL3707). Para as cepas que contém células titans, para efeito deste estudo, foi empregado também o termo “cepas polimórficas”. Para os testes foram utilizadas cepas-padrão de virulência *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265.

3.2 Ensaio *in vitro*

3.2.1 Curvas de morte

Para isolar subpopulações tolerante à anfotericina B (AmB) foi realizada a metodologia de curvas de morte, como descrito anteriormente (Rodero *et al.*, 2000). O estudo incluiu duas cepas de *C. neoformans* (IAL3704 e IAL3705) e duas cepas *C. gattii* (IAL3238 e IAL3711). As cepas foram selecionadas a partir de resultados obtidos em estudos prévios do grupo (Pappalardo *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012) e foram submetidas a novos experimentos para selecionar a subpopulação. Para tanto, as 4 cepas foram descongeladas, repicadas em tubos contendo meio ágar Sabouraud dextrose (ASD) (Becton Dickinson) e incubadas a 30°C por 24 a 48 horas. Em seguida, foram submetidas a crescimento por 18h a 35°C em agitação constante, em meio RPMI-1640, tamponado com MOPS pH 7,2, em 2% de glicose. O inóculo inicial, de cada uma das 4 cepas, foi ajustado à turbidez igual a do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1×10^6 a

5x10⁶ UFC/mL) e 1 mL deste inóculo foi diluído em 9 mL de meio RPMI com 1mg/L de AmB.

Todos os 4 tubos foram incubados à 35°C sob agitação, junto com um tubo controle-positivo de crescimento, ou seja, sem adição do fármaco, além de um controle de esterilidade sem inóculo. Alíquotas de 500 µL de cada suspensão foram diluídas em 4,5 mL de solução salina estéril e, destas, 30 µL foram retirados e plaqueados em meio ágar batata. As placas com ágar foram incubadas a 35°C por aproximadamente 72 h. A partir desse momento, denominado tempo zero (T0) de incubação, foi iniciada contagem de tempo para novos procedimentos. Assim, às 6h, 12h, 24h, 48h e 72 h de incubação, foram removidas alíquotas de 500 µL de cada suspensão para avaliação do efeito fungicida da AmB por contagem de UFC/mL. Para tanto, cada alíquota foi diluída em 4,5 mL de solução salina estéril e 30 µL foram plaqueados em meio ágar batata, seguido de incubação a 30°C por até 72 h. Após este período, as colônias foram enumeradas e congeladas a -20°C. A atividade fungicida (*end point*) da AmB foi avaliada quando obtida inibição de 99,9% da contagem obtida no tempo zero de cada isolado.

Para analisar a atividade fungicida pelo método de curva de morte, foi confeccionado um gráfico referente a contagem de colônias de todos os isolados *versus* tempo de incubação com fármaco, permitindo observar a diminuição do número de unidades formadoras de colônias viáveis ao longo do tempo. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.2.2 Avaliação de resposta celular contra *Cryptococcus* spp.

Avalio-se a produção de óxido nítrico (NO), citocinas e citotoxicidade celular como subsídios para avaliar interação patógeno-hospedeiro e auxiliar na compreensão da patogênese da criptococose. Desde que a resposta celular na criptococose pode determinar o curso da infecção, foi considerado importante incluir esta etapa no estudo. Os experimentos desta etapa foram realizados na McGill University (Montreal, Ca).

As 11 cepas foram cultivadas em caldo Sabouraud dextrose (Becton Dickinson) a 37°C com agitação moderada até à fase estacionária (48 h)

antes dos experimentos. Subsequentemente, a cultura obtida foi centrifugada e lavada duas vezes com solução tamponada com fosfato estéril (PBS) e as células foram contadas e ajustadas para concentração de 4×10^6 UFC/mL em DMEM (Gibco, Dorval, QC) suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (FBS) (Wisent, Quebec, QC) ou meio RPMI-1640 (Invitrogen, Life Technologies) utilizando um hemocítômetro. As concentrações de células de *C. neoformans*, assim obtidas, foram confirmadas (UFC/mL) por plaqueamento em ASD a 37°C por 72 h. A concentração (4×10^6 UFC/mL) foi determinada como multiplicidades de infecção (MOI 20) e foi utilizada para estimular a linhagem celular BEAS-2B. Diluições adicionais foram realizadas para preparar a MOI 10 (2×10^6 UFC/mL) e MOI 1 (2×10^5 UFC/mL).

3.2.2.1 Seleção da linhagem celular murina e humana: fase pré-analítica

Preparo de culturas celulares

A linhagem celular de epitélio traqueobrônquico humano BEAS-2B foi obtida a partir da linhagem *American Type Culture Collection* (ATCC) CRL-9609. A linhagem celular de macrófagos alveolares murinos MH-S foi obtida a partir de ATCC CRL-2019. Células BEAS-2B foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Wisent, Quebec, QC), suplementado com 2% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina (Gibco, Dorval, QC) e 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco, Dorval, QC). A incubação foi realizada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. A confluência maior que 80% de células foi adotada como condição ideal, segundo recomendação do ATCC. As células de MH-S foram cultivadas (>80% de confluência) em meio RPMI-1640. Para repiques, as células foram lavadas em PBS estéril e submetidas à incubação com tripsina a 0,25% (Gibco, Dorval, QC). A seguir, as células foram contadas utilizando hemocítômetro e inoculadas em placas de 96 poços (2×10^5 células/ poço em placas de 12

poços) (Costar, Nova Iorque, Nova Iorque) para as células BEAS-2B. Após 48h a 37°C, sob 5% de CO₂, foi obtida 100% de confluência.

3.2.2.2 Estimulação das culturas celulares com *C. neoformans*

As células da linhagem MH-S foram estimuladas com quatro diferentes concentrações MOI, incluindo: MOI 1, MOI 10, MOI 20 e MOI 50 de cada uma das quatro polimórficas e da cepa-padrão, durante 24 h a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂. O sobrenadante de cada cultura celular, em total de 20 µl, foi recolhido e armazenado a -80°C para determinação da produção de óxido nítrico.

Do mesmo modo, as células da linhagem BEAS-2B foram estimuladas com 3 diferentes concentrações (MOI 1, MOI 10, MOI 20) de cada uma das 11 cepas e 20 µl dos sobrenadantes resultantes da incubação (total de 33) foram, igualmente, recolhidos e armazenados para avaliação de produção de citocina IL-8 e lactato desidrogenase (LDH).

Produção de óxido nítrico (NO)

Os níveis de óxido nítrico em cada sobrenadante de cultura de células MH-S foram determinados utilizando placas de 96 poços. Foram preparados reagentes Griess consistindo de 0,2% dicloridrato de naftiletilediamina e 2% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%. Ambos os compostos foram preparados, separadamente, em frascos de cor âmbar rotulados e armazenados a 4°C. Posteriormente, ambas as soluções foram misturadas em volume igual antes do ensaio. Para estimar a concentração de NO a partir do sobrenadante da cultura celular foi adicionado um volume igual de sobrenadante e de reagente Griess e feita a leitura, imediatamente, em leitor de multiplacas sob filtro 540 nm. Controles negativos foram incluídos em todos os experimentos utilizando células não estimuladas de cada linhagem. Um controle positivo de lipopolissacárido (LPS) extraído de *E. coli* (linhagem O55:B5) foi incluído em todas as placas.

3.2.2.3 Produção de citocinas e lactato desidrogenase

Os níveis de IL-8 e de LDH no sobrenadante da cultura de células foram determinados usando-se *kit* DuoSet ELISA (R & D systems, Minneapolis, MN) e *kit* de ensaio de LDH (*Cytotoxicitynassay* CytoTox 96® não radioativos, Promega, Madison, WI), respectivamente, em placas de 96 poços seguindo o protocolo do fabricante. A leitura da densidade ótica foi feita em leitor de microplacas (espectrofotômetro) e a concentração de citocina foi interpretada a partir da densidade ótica de cada amostra em comparação com uma curva-padrão apropriada. Controles negativos foram incluídos em todas as placas, utilizando células não estimuladas de cada linhagem. Um controle positivo constituído de cultura celular morta foi incluído em placas de LDH, e controle positivo de lipopolissacárido (LPS) extraído de *E. coli* (linhagem O55:B5) foi incluído em placas de IL-8.

3.3 Ensaio *in vivo*

3.3.1 Modelos Alternativos

Larvas de *Apis mellifera* (Hymenoptera; Apidae) e *Zophobas morio* (Coleoptera; Tenebrionidae) foram obtidas do Centro de Estudo de Insetos Sociais da UNESP *campus* de Rio Claro, sendo conhecida e controlada sua linhagem. Os ensaios com as larvas destes insetos foram desenvolvidos na UNESP *campus* de Rio Claro.

Para fins de comparação foram, também, realizados ensaios com o modelo invertebrado estabelecido na literatura *Galleria mellonella*. As larvas de último instar de *Galleria mellonella* (origem Vanderhorst Atacado, Inc, St Marys, OH e Mous Livebait R.J., Holanda) foram selecionadas pelo seu tamanho homogêneo ($330\text{mg} \pm 25\text{mg}$) e ausência de manchas acinzentadas para obtenção de resultados mais reprodutíveis.

3.3.1.1 Definição de condições experimentais

Foram realizados ensaios de padronização experimental de acordo com as necessidades de cada gênero estudado.

Para *Apis mellifera* foram inclusos os seguintes ensaios: definição de via de inoculação (injetável, tópica ou oral); definição de incubação (placas de Petri ou placas de 96 poços) e temperatura e definição do instar larval. A avaliação da padronização experimental levou em consideração a sobrevivência das larvas.

Para *Zophobas morio* foi realizada a avaliação da via de inoculação por injeção, a fim de se observar se o trauma causado pela perfuração da cutícula levaria à morte. O parâmetro para inclusão das larvas no estudo foi o peso das larvas.

Nesta etapa os ensaios com *Apis mellifera* e *Zophobas morio* foram realizados com a cepa *C. neoformans* VNI (WM 148), devido ao grau de virulência da cepa ser de baixo a moderado, permitindo o acompanhamento de sobrevivência das larvas.

As larvas de *G. mellonella* foram mantidas no escuro e utilizadas em até 7 dias após seu recebimento o fornecedor. Os experimentos com esta espécie foram realizados com cepa-padrão H99, como descrito por Garcia-Rodas *et al.*, 2011.

3.3.1.2 Estudo de sobrevivência e dose letal 50% para *Apis mellifera* e *Zophobas morio*

Para *G. mellonella* não foi necessário a determinação da dose letal 50%, desde que, essa informação consta de Garcia-Rodas *et al.*, 2011. Os experimentos com esta espécie foram executados no laboratório do Instituto Carlos III, Majadahonda, Es. As larvas selecionadas foram inoculadas, com 10 uL de inóculo contendo 10^6 UFC/mL da cepa padrão H99, na pró-perna terminal usando-se seringa Hamilton e agulha calibre 26. As seringas foram preparadas, antes da inoculação, limpando-se com hipoclorito e a pró-perna

das larvas foram desinfetadas usando-se swab embebido em etanol a 70%. Após a injeção, as larvas foram mantidas em placas de Petri de vidro com 90 milímetros de diâmetro (Soria GENLAB S.A., Madrid, Espanha), sob 37°C e o número de larvas mortas foi marcado diariamente. Um grupo de larvas foi inoculado com PBS em cada experimento para monitorar devido a morte por lesão física e outro grupo de larvas sem qualquer manipulação foi monitorada em paralelo como um controle não tratado (García-Rodas *et al.*, 2012)

Para *Apis mellifera* e *Zophobas morio* foram usadas 50 larvas de cada espécie. *Apis mellifera* foram selecionada no quarto instar larval e de *Zophobas morio* foram selecionadas com peso aproximado de 0,8 gramas. Em seguida as duas espécies foram separadas em grupos de 10 espécimes.

Larvas de *Apis mellifera* foram mantidas em placas de 96 poços na temperatura de 34°C para cada concentração fúngica estudada. Cada larva de *Apis mellifera* recebeu, via oral, diferentes concentrações da suspensão fúngica (1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 UFC/mL) da cepa de *C. neoformans* H99 adicionada à dieta açucarada inoculada na proporção de 1:1 (Figura 1).

As larvas de *Zophobas morio* receberam 5 μ L de diferentes concentrações da suspensão fúngica (1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 UFC/mL) da cepa de *C. neoformans* H99. A via de inoculação foi realizada no abdômen após assepsia local com etanol (70%), com seringa Hamilton. Após a injeção, as larvas foram incubadas em recipiente plástico em temperatura ambiente com alimento e água (Figura 2).

A sobrevivência das larvas de ambas espécies foi registrada, diariamente, por período de até 96 horas tanto para *Apis mellifera*, quanto para *G. mellonella*. Para *Zophobas morio* a sobrevivência foi acompanhada em até 3 períodos: 37 dias, 133 dias e 6 meses.

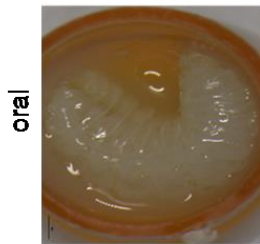
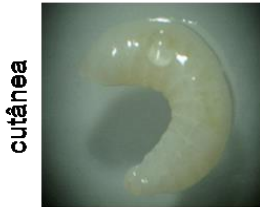
Dois grupos-controle, para cada espécie, foram preparados e mantidos nas mesmas condições experimentais, sendo um com larvas inoculadas apenas com solução salina, para avaliar morte por injúria do trauma, e outro grupo sem inoculação.

A morte larvar foi considerada quando na ausência de movimento ao toque, sendo que para *Apis mellifera* essa observação necessitou de lupa. Testes por Probit (método Finney), programa BioStat (2008) foram aplicados aos resultados para determinação da dose letal 50% destas espécies.

As larvas sobreviventes nos períodos finais dos experimentos, como informado, foram eutanasiadas para recuperação da cepa H99 inoculada e confirmação de sua identidade por PCR-*fingerprinting* usando-se *primer* M13 (Meyer *et al.*, 2003), como descrito a seguir. As larvas eutanasiadas de *Zophobas morio* foram formolizadas para processamento histológico.

Apis mellifera
(Hymenoptera: Apidae)

Via de inoculação
1x10⁵ ufc/mL
10 larvas/grupo
Cepa: WM 148 (VNI)



Dose Letal 50%
1x10³ ufc/mL
1x10⁴ ufc/mL
1x10⁵ ufc/mL
1x10⁶ ufc/mL
1x10⁷ ufc/mL
27 larvas /grupo
4 instar
Cepa:H99

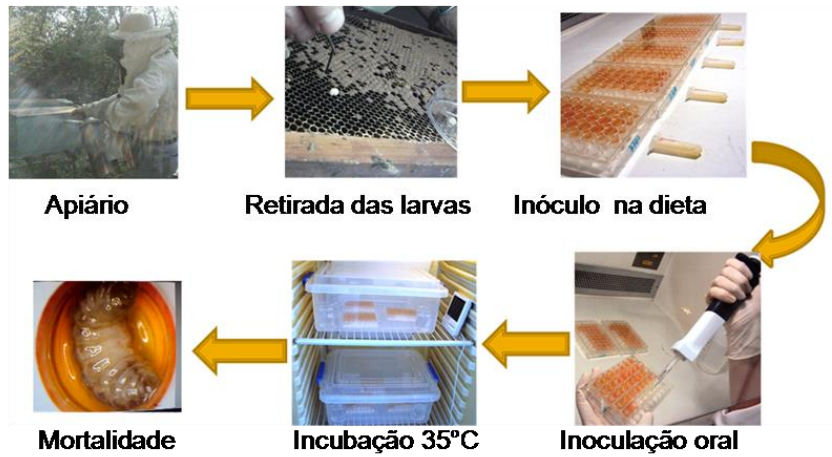
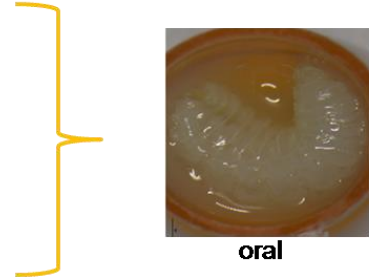


Figura 1. Fluxograma de experimento de padronização de via de inoculação e experimento de dose letal 50% com larvas de *Apis mellifera*

Zophobas morio
(Coleoptera: Tenebrionidae)

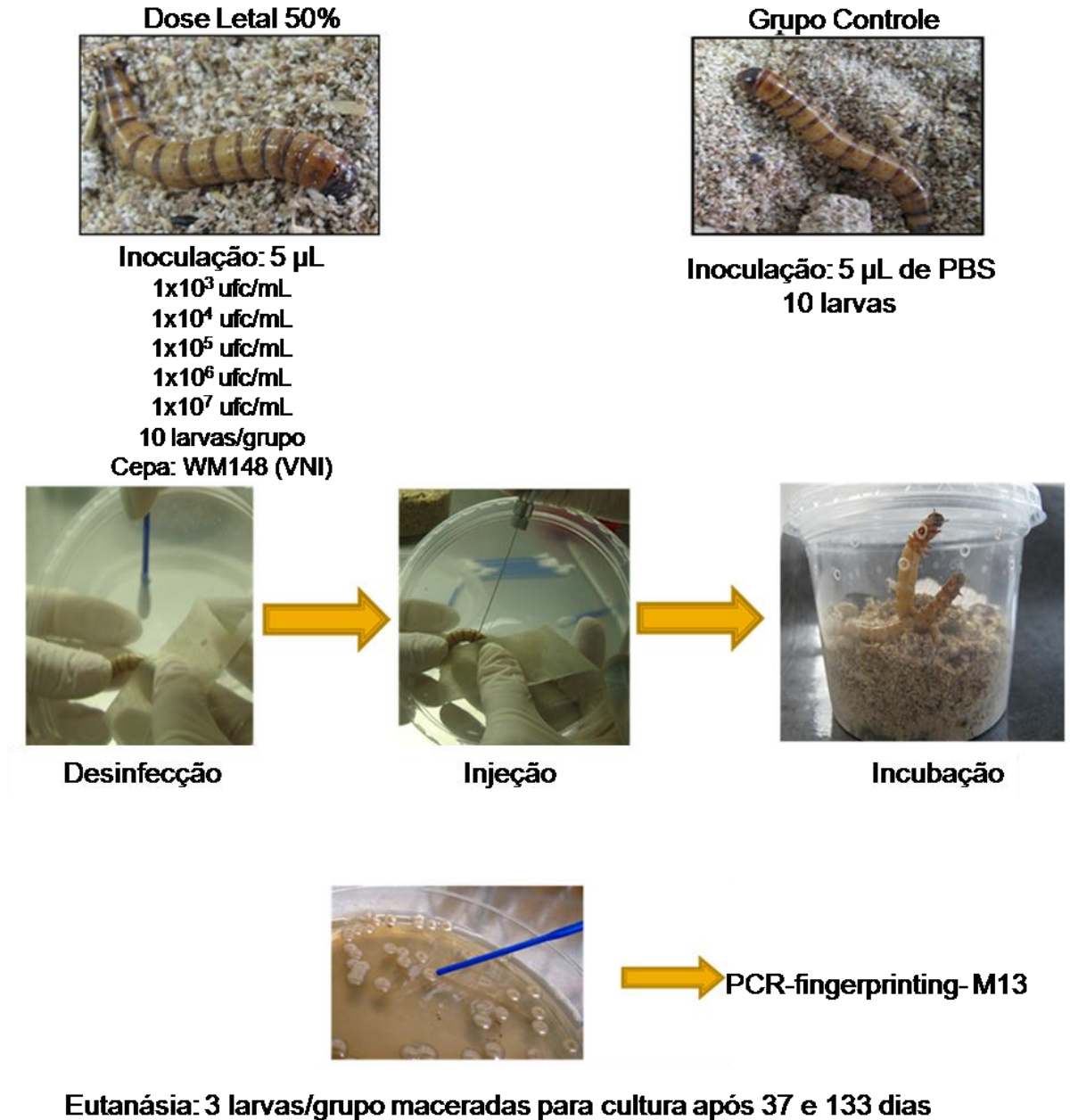


Figura 2. Fluxograma de experimento de padronização com a espécie *Zophobas morio*

PCR fingerprinting de colônias recuperadas de larvas

Das placas de contagem de UFC foram retiradas 3-4 colônias para determinação molecular de similaridade, pela técnica de reação da cadeia da polimerase (PCR) *fingerprinting*. Foi utilizado para reação de PCR um único *primer* (M13: 5 'GAGGGTGGCGGTTCT 3') (Meyer *et al.*, 2003). As reações de amplificação foram realizadas em volume de 50 µL, composta por 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl, 0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, acetato de magnésio a 3 mM, 30 ng de *primer*, e 2,5 U Amplitaq DNA polimerase. A PCR foi realizada durante 35 ciclos em um termociclador com 20s de desnaturação a 94°C, 1min de anelamento a 50°C, 20s e extensão a 72°C, seguido por um ciclo de extensão final de 6 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram retirados e separados por eletroforese em gel de agarose 1,4%, a 60 V durante 150 minutos, corados com brometo de etídio (10 mg/ml) em 1X EDTA borato tampão (TBE) e visualizados sob luz UV. Os perfis de bandas, assim gerados, foram comparados com os perfis de bandas de cepas-padrão, incluindo H99 e tipos moleculares (VNI, WM 148; VNII, WM 626; VNIII, WM628; VNIV, WM 629, gentilmente cedidas por Dr. Wieland Meyer, Sidney University, Australia) os quais foram processados do mesmo modo (Meyer *et al.*, 2003).

3.3.1.3 Análise histopatológica das larvas de *Zophobas morio*

Os experimentos desta etapa foram realizados no Núcleo de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, tendo sido realizado com larvas de *Zophobas morio*. Após a eutanásia, as larvas foram fixadas em 10mL de solução a 10% de acetato de formalina tamponada (Fisher Scientific) e seccionadas longitudinalmente. As larvas foram, então, embebidas em parafina, seccionadas a 5 µm e coradas com H&E.

3.3.2 Modelos tradicionais

3.3.2.1 Estudo de cepas polimórficas (contendo células titans)

Os experimentos em modelos murinos com cepas polimórficas foram realizados na McGill University (Mo,Ca), em vista da oportunidade de cooperação desse centro com grande experiência nesse tema e da necessidade de co-orientação para análise de resultados. Todos os protocolos experimentais foram revistos e aprovados pelo *Comitê Animal Care da Universidade McGill*. Camundongos machos isogênicos da linhagem BALB/c com sete semanas de idade (Charles River, Saint-Constant, QC) foram adquiridos e mantidos no biotério da McGill, com alimento e água esterilizada *ad libitum*. Camundongos foram eutanasiados, humanamente, com CO₂ após a conclusão dos experimentos e todo esforço foi feito para minimizar sofrimento de acordo com as orientações do Comitê Canadense de Cuidado Animal.

Inoculação intranasal de C. neoformans

Foi realizada inoculação intranasal com duas cepas polimórficas de *C. neoformans* (IAL3071 e IAL3700) e a cepa altamente virulenta H99 diluídas a 1x10⁴ UFC/mL em PBS. Trinta e oito camundongos da linhagem BALB/c foram anestesiados com 10 mg/kg quetamina (Ayerst Veterinary Laboratories) e 125 mg/kg xilasina (Bayer) intraperitoneal, colocados em posição vertical em uma placa cirúrgica e 50 µL das suspensões de *C. neoformans* foram introduzidos nas narinas por pipetagem. Grupos de 5 animais foram inoculados com mesma cepa. Grupo-controle de 3 animais foi mantido sem inoculação. Os camundongos foram monitorizados diariamente após a instilação.

Após períodos de 14 dias e 21 dias foi realizada eutanásia em três grupos inoculados com cada cepa de *C. neoformans*, sendo um grupo para quantificação de UFC (pulmão e cérebro), outro para estudo histológico e outro para citometria de fluxo e quantificação de células gigantes nos pulmões. Após eutanásia os camundongos foram imersos em etanol a 70%, submetidos à punção cardíaca terminal e dissecados ao longo da linha média utilizando técnica estéril.

Quantificação de carga fúngica

Os pulmões e cérebros foram retirados e colocados em tubos separados contendo 4 mL de Phosphate Buffered Saline (PBS) esterilizado sobre gelo. Subsequentemente, os órgãos foram homogeneizados usando um homogeneizador mecânico de tecidos (Glas-Col, de Terre Haute, IN) e plaqueados, em várias concentrações decrescentes, em placas contendo ASD. As placas foram incubadas a 37°C por 72 h antes da contagem de UFC/mL de *C. neoformans* por órgão.

Análise histopatológica

Após a eutanásia, os pulmões foram insuflados a uma pressão de 25 cm com 10% de acetato de formalina tamponada (Fisher Scientific) e fixados durante a noite. Subsequentemente, os pulmões foram embebidos em parafina; seccionados a 5 µm e corados com Hematoxilina Eosina (H&E) e ácido periódico Schiff (PAS). Imagens das lâminas foram adquiridas utilizando um microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus Canadá) equipado com um sistema de Captura Digital CoolSnap-Pro (Media Cybernetics).

Coleta e análise do lavado broncoalveolar

Outro grupo de animais, aos 14 dias pós-inoculação, foi eutanasiado e submetido a incisão para expor a traquéia. Um cateter de calibre 22 foi inserido dentro da via aérea e fixado por um fio. Um total de quatro volumes de 500 ml de PBS estéril refrigerado foi instilado através do cateter e, subsequentemente aspirado. As células do lavado foram centrifugadas a 16.000xg, lavadas uma vez com PBS, suspensas em tinta da China e analisadas em microscopia ótica (> 300 células por animal). O diâmetro celular de *C. neoformans* foi medido e as células foram classificadas como células titans (diâmetro, >10 µm) e não titans (diâmetro, <10 µm), de acordo com Okagaki e colaboradores, 2010 (Okagaki *et al.*, 2010)

Análise da resposta imune celular por citometria de fluxo

Os pulmões foram removidos utilizando técnica estéril e colocados em meio RPMI 1640 (Life Technologies, Invitrogen) suplementado com 5% de FBS (Wisent). Em seguida, os pulmões foram picados utilizando lâminas cirúrgicas e incubados com 1 mg/mL de colagenase (Sigma-Aldrich) a 37° C durante 1 h. Após a incubação, pedaços de pulmão foram passados através de uma agulha de calibre 16 e filtrados através de um filtro de células de 100 µm (BD Biosciences). Após a filtração as células foram contadas com um contador de células Coulter Beckman. Receptores de Fc foram bloqueados com a adição de moléculas anti-CD16 / 32 Abs (eBioscience), e as suspensões unicelulares foram coradas com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorescência, adquiridos da eBioscience: a-CD45 -V500 (30-F11; BD), a-CD11b-APC (M1/ 70; BD), a-CD11c-PE (N418), a-B220-FITC (RA3-6B2), a-MHCII-PE-Cy7 (M5 / 114.15.2), a-CD4-V450

(GK1.5), a-CD8-PerCP (53-6,7; BD), a-CD3-PE- Cy7 (145-2C11; BD), e a-Gr-1-V450 (RB6-8C5). Células não viáveis foram excluídas usando corante de viabilidade eFluor 780 (eBioscience). Os dados foram adquiridos utilizando um citômetro de fluxo FACS LSR II (BD Biosciences) e analisados utilizando software FlowJo versão X (TreeStar). A Figura 3 demonstra o fluxograma dos experimentos *in vivo* realizados na McGill University utilizando duas cepas de *C. neoformans* polimórficas (IAL3071 e IAL3700) e cepa padrão de virulência H99.

Análise estatística

Mortalidade, tempo médio de sobrevivência e carga fúngica foram comparados entre os grupos infectados e seus respectivos grupos controles. Os dados de mortalidade e UFC foram comparados entre os grupos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). A significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$.



Figura 3. Desenho do estudo experimental *in vivo* com a linhagem BALB/c; dpi, dias pós infecção; UFC, unidades formadoras de colônia; BAL, lavado broncoalveolar

3.3.2.2 Definição de linhagem murina para estudo de cepas tolerantes à anfotericina B e cepas heterorresistentes a fluconazol

Linhagens de murinos

Os experimentos com as linhagens A/Sn e BALB/c foram realizados no Biotério de Experimentação Animal do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. Todos os protocolos experimentais foram revistos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Adolfo Lutz/Pasteur. Para este estudo, foram empregados camundongos machos, com 8-9 semanas de idade, isogênicos de duas linhagens murinas: A/Sn e BALB/c, mantidos com alimento e água *ad libitum*.

Inoculação intranasal de C. neoformans e C. gattii

Todos os animais foram submetidos à instilação intranasal com a cepa *C. neoformans* H99 e com a cepa *C. gattii* R265. Para tanto, os camundongos foram anestesiados com 10 mg/kg quetamina (Syntec, Br) e 125 mg/kg xilasina (Syntec, Br) intraperitoneal, colocados em posição vertical em uma placa cirúrgica e 50 µL das suspensões de *C. neoformans* ou *C. gattii* foram introduzidas nas narinas por pipetagem. Os camundongos foram, a seguir, monitorados diariamente após a instilação, para observação do evento morte ou procedimentos de eutanásia.

A linhagem que apresentou menor sobrevida e maior carga fúngica foi selecionada para os ensaios com subpopulações tolerantes e subpopulações heterorresistentes ao fluconazol, em comparação com as respectivas cepas parentais.

Estudo de sobrevivência e dose letal 50%

Os camundongos, de ambas as linhagens A/Sn e BALB/c, foram agrupados em 6 grupos de 10 animais para o ensaio de sobrevivência e DL50%. Cada grupo foi inoculado com uma dose distinta (1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 UFC/mL) de *C. neoformans H99*. Os camundongos foram monitorizados diariamente após a instilação e o evento morte foi registrado. Foram retirados os órgãos de dois animais por grupo experimental após a morte para análise histopatológica da *causa mortis*. Um grupo controle de 10 animais, sem inoculação, foi mantido durante todo o experimento.

Quantificação de carga fúngica

Outros grupos de 5 animais cada foram selecionados para inoculação de suspensão fúngica na concentração da DL50% (dose letal para 50% dos camundongos) de *C. neoformans H99* e *C. gattii R265*. Aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, os pulmões, cérebro, baço e fígado foram retirados de cada grupo de animal e colocados em tubos separados contendo 4 mL de PBS esterilizado sob gelo. Os órgãos foram, então, homogeneizados usando um homogeneizador mecânico de tecidos (Potter NT-136, Nova Técnica) e plaqueados em ASD em várias concentrações, de modo a permitir contagem das UFC/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 72 h antes da quantificação de *C. neoformans* ou *C. gattii* por órgão.

Análise histopatológica por hematoxilina-eosina

Outros grupos de 5 animais cada foram selecionados para análise histológica e inoculados com suspensão fúngica na concentração da DL50% de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265. Aos 7, 14 e 21 dias, após inoculação, foram eutanasiados e retirados seus órgãos (pulmão, cérebro, baço e fígado), colocados em 25 mL de solução a 10% de acetato de formalina tamponada (Fisher Scientific) e fixados durante uma noite. Os órgãos foram, a seguir, embebidos em parafina, seccionados a 5 µm e corados pelo método clássico H&E. Imagens das lâminas foram adquiridas utilizando um microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus). Um grupo controle de 10 animais, sem inoculação (grupo-controle), foi mantido durante todo o experimento e submetido à análise histológica comparativa.

3.3.2.3 Estudo de cepas tolerantes à anfotericina B

Os estudos foram executados em camundongos machos, com 8-9 semanas de idade, isogênicos da linhagem BALB/c, mantidos com alimento e água *ad libitum*. A inoculação intranasal de *C. neoformans* H99 e de *C. gattii* R265, bem como de suas populações tolerantes à anfotericina B foi executada como descrito, anteriormente conforme página 39. Os seguintes experimentos foram, de acordo, como descrito nos itens anteriores: estudo de sobrevivência, dose letal 50%, quantificação de carga fúngica, análise histopatológica por H&E. Além desses procedimentos, foram realizados os seguintes ensaios:

Análise da resposta imune celular por produção de citocinas por citometria de fluxo

Para o ensaio de citocinas, induzidas pelas subpopulações tolerantes à AmB obtidas de *C. neoformans* H99 bem como de *C. gattii* R265, foram

utilizados grupo de 5 camundongos. Aos 7, 14 e 21 dias os animais foram eutanasiados, como já descrito, e o tecido de ambos os pulmões de cada animal foi excisado e homogeneizado em 5 mL de PBS utilizando um homogeneizador mecânico de tecidos (Potter NT-136, Nova Técnica). Os homogenatos de tecido foram clarificados por centrifugação a 15.000rpm/15 minutos e sobrenadantes foram mantidos sob -80 °C até que fossem analisados (Cheng *et al.*, 2009).

A análise de citocinas dos sobrenadantes não diluídos foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD, EUA) utilizando-se um *kit* comercial desenvolvido para respostas Th1, Th2, Th17 de camundongos (CBA, BD, EUA). O *kit* foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante e foram mensuradas: IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 e TNF- α . As citocinas foram expressos como pg/mL por pulmões. Os dados foram analisados utilizando-se os programa FlowJo *software* (Árvore Star Inc., San Carlos, CA).

Análise da resposta a tratamento com anfotericina B

A eficácia de tratamento das infecções causadas por subpopulações tolerantes foi avaliada segundo sobrevivida e redução da carga fúngica, ao longo de 7, 14 e 21 dias pós inoculação. Para cada cepa (*C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265) e suas subpopulações tolerantes foram desafiados grupos de 15 animais (para cada período de observação). O fármaco AmB foi cedido pelo fabricante (Fungizone, Squibb Industria Farmacêutica S.A., Brasil). AmB foi administrada, uma hora após inoculação fúngica, em dose de 1 mg/kg de peso corporal, por via i.p., uma vez ao dia durante 7 dias (Calvo *et al.*, 2010). Três grupos-controle de 5 camundongos cada, foram assim constituídos: um sem inoculação, um inoculado com solução salina e outro sem inoculação e tratado com AmB, nas mesmas condições experimentais.

3.3.2.4 Estudos com subpopulação heterorresistente a fluconazol

Os estudos sobre heterorresistência foram desenvolvidos com subpopulação heterorresistente obtida de uma cepa clínica (IAL 3066). Para tal finalidade foram executados procedimentos como descrito por Sionov *et al.*, 2009). A subpopulação foi mantida em ágar contendo fluconazol na concentração da adaptação da cepa (32 mg/L). Suspensões de 1×10^5 cel/mL foram inoculadas via intranasal, em 3 grupos de 5 camundongos cada, para determinação de carga fúngica aos 7, 14 e 21 dias pós infecção, como descrito no item 3.2.2.2. Os mesmos procedimentos foram realizados com animais inoculados com cepa parental (IAL 3066).

Grupo de 5 animais foi inoculado com subpopulação heterorresistente adaptado IAL 3066, como descrito em 3.2.2.2 e tratado, diariamente, com doses intraperitoniais (40 mg/kg/dia) de fluconazol (Eurofarma, Br), por período de 7 dias. Outro grupo de 5 camundongos foi infectado com a cepa parental IAL 3066 e tratado do mesmo modo (Mendes *et al.*, 2010). Três grupos-controle de 5 animais cada, foram assim constituídos: um sem inoculação, um inoculado com solução salina e outro sem inoculação e tratado com fluconazol nas mesmas condições experimentais. A eficácia do tratamento foi verificada com base na redução da carga fúngica como descrito em 3.2.2.2.

4. Resultados

4.1 Ensaio *in vitro*

4.1.1 Curvas de morte para obtenção de subpopulação tolerante à anfotericina B

Os testes de curvas de morte realizados com subpopulações tolerantes à AmB, clínicas e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* estão mostrados na Figura 4. Não foi observada morte ($\geq 99,9\%$ de colonias mortas, em relação às colonias não expostas) de nenhuma cepa, dentro das condições experimentais e no tempo máximo analisado de 72h.

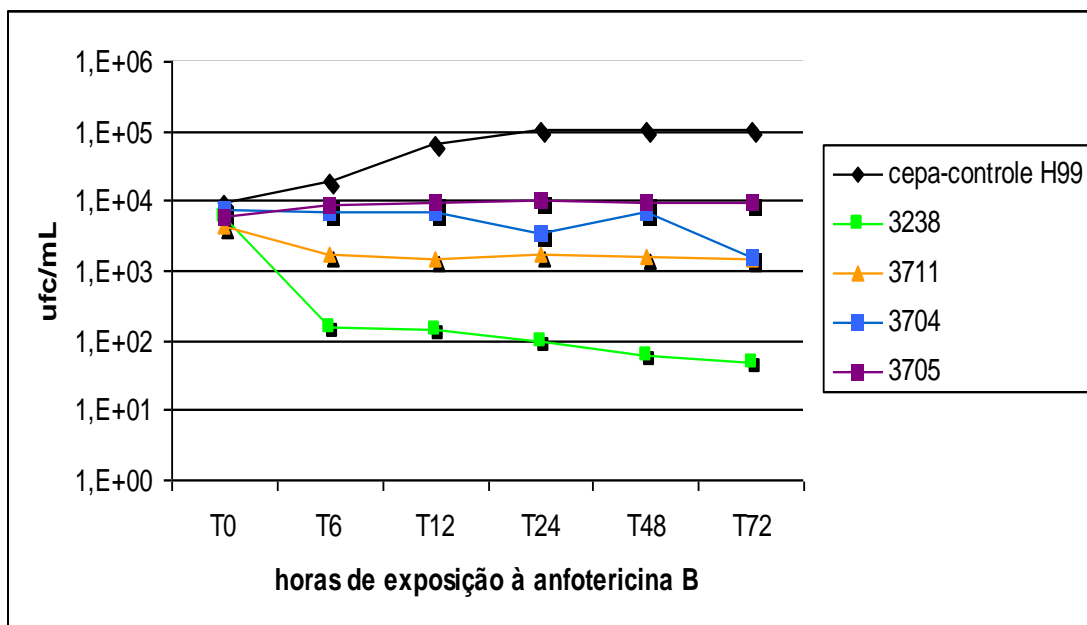


Figura 4. Curvas de morte de subpopulações de *C. neoformans* (IAL3704, IAL3705) e *C. gattii* (IAL3238, IAL3711) tolerantes *in vitro* à anfotericina B

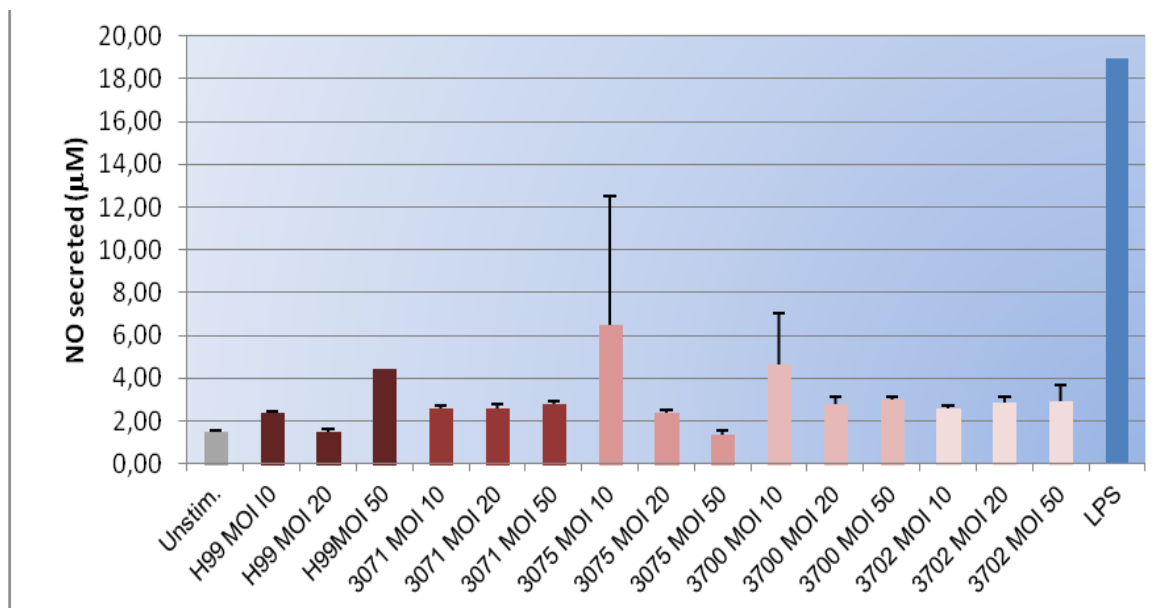
4.1.2 Avaliação de resposta celular *in vitro*

4.1.2.1 Ensaio de seleção de linhagens celulares

Confluência das células foi observada nas linhagens BEAS-2B e MH-S e não na linhagem celular MLE-12 e, portanto, apenas as linhagens que apresentaram confluência celular foram utilizadas neste estudo.

4.1.2.2 Medida da ativação das células MH-S

A linhagem celular de macrófagos MH-S não foi ativada por cepas polimórficas *C. neoformans* (Figura 5).

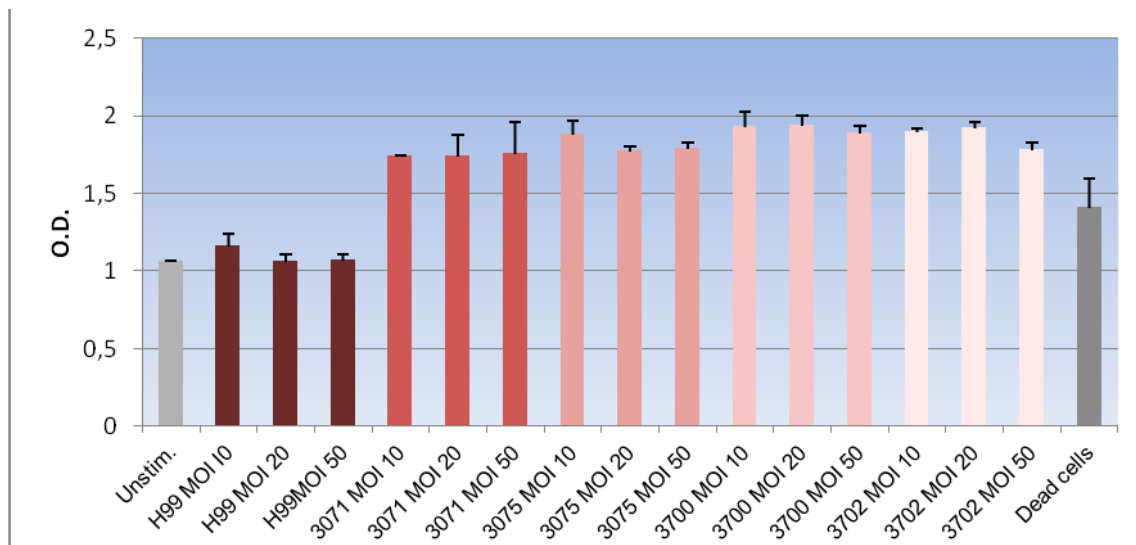


NO secreted, óxido nítrico secretado (µM); Unstim, células não estimuladas; LPS, lipopolissacarídeo (1 ug/mL) usado como controle-positivo

Figura 5. Secreção de óxido nítrico (NO) em cultura de células MH-S estimuladas por 24 h com várias concentrações (MOI 10, 20, 50) de cepas polimórficas de *C. neoformans* (3071,3075,3700,3702) e cepa-padrão de virulência H99.

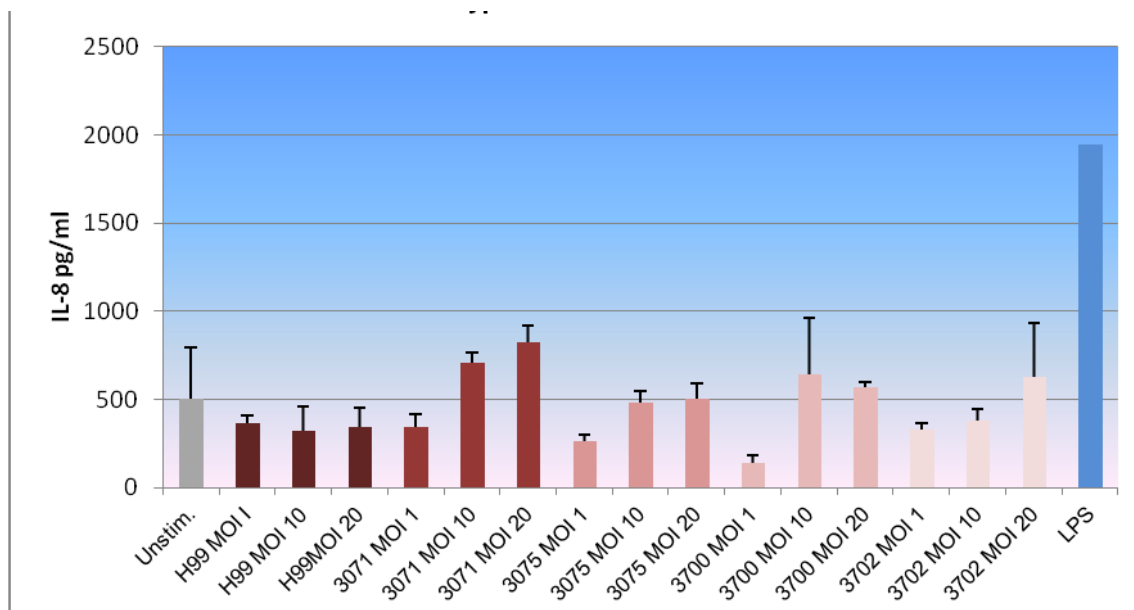
Como ilustrado na Figura 6, as cepas polimórficas (3071, 3075, 3700, 3702) provocaram a liberação de LDH em linhagem de macrófagos MH-S, em valores de d.o. entre 1,5 a 2, enquanto tais resultados para a cepa-padrão de virulência H99 situaram-se em torno de d.o. 1,0.

A secreção de IL8 em células BEAS-2B com exposição às cepas polimórficas ficou em níveis acima daqueles observados nos testes com a cepa-padrão H99. A ativação de IL-8 (pg/mL) com cepa H99 levou à secreção média de 363,1579 em MOI 1, 321,0526 em MOI 10 e de 342,1053 em MOI 20, com a respectivos desvios-padrão (dp) de 45,88315; 138,0513 e 109,898. O valor médio de IL-8 (pg/mL) secretada por linhagem BEAS-2B foi proporcional à concentração de células fúngicas em testes com 2 cepas polimórficas (IAL3071 e IAL3700). A cepa polimórfica IAL3700 apresentou menor secreção de IL-8 em MOI 1 (média 138,5965; dp 47,46579), do que em MOI 10 (média 643,8596; média 318,2942) e em MOI 20 (média 566,6667; dp 32,15843). A secreção média de IL-8 (pg/mL) do isolado IAL3071 foi, como segue: 342,1 em MOI 1, 710,5 em MOI 10 e de 822,8 em MOI 20, com desvios-padrão de 73,68421; 58,60805 e 99,49086, respectivamente. (Figura 7). Nos ensaios de produção de IL-8 por linhagem BEAS-2B foram usadas como controle interno de reação 4 cepas (3066, 3233, 3253, 3688) estudadas, anteriormente.



O.D., densidade ótica; Unstim, células não estimuladas; Dead cells, células mortas usadas como controle negativo.

Figura 6. Secreção de lactato desidrogenase, mensurada em densidade ótica, em cultura de células MH-S estimuladas por 24 h com várias concentrações (MOI 10, 20, 50) de cepas polimórficas de *C. neoformans* (3071,3075,3700,3702) e cepa-padrão de virulência H99.

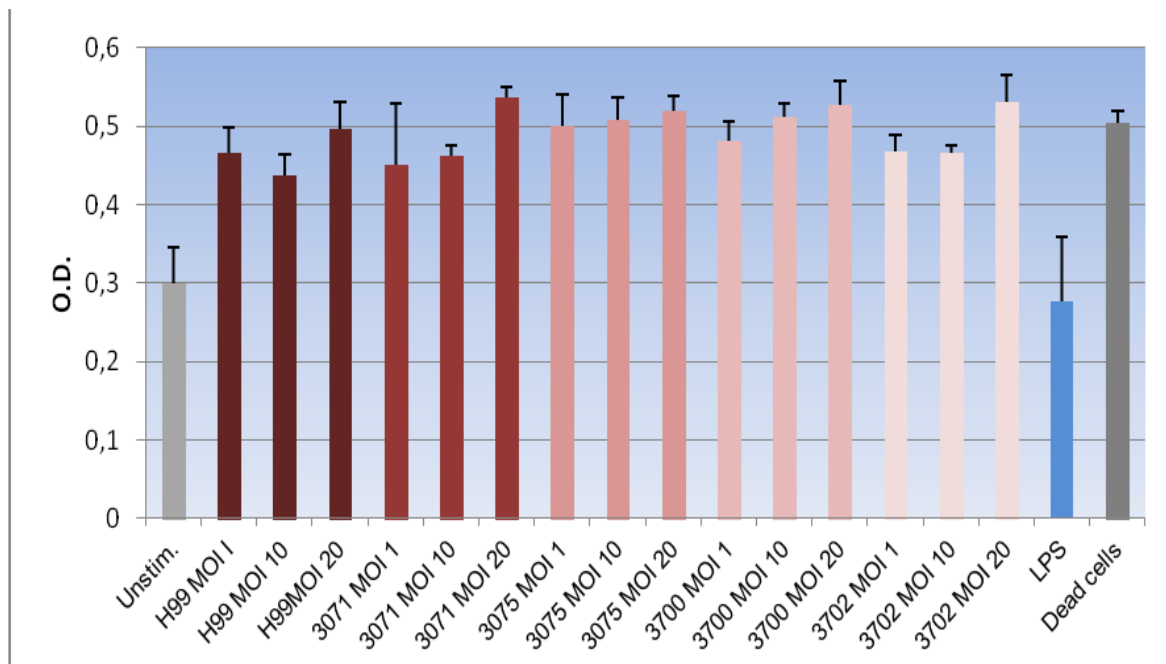


IL-8, interleucina 8 (pg/mL); Unstim, células não estimuladas; LPS, lipopolissacarídeo (1 ug/mL) usado como controle-positivo

Figura 7. Secreção de interleucina 8 em cultura de células BEAS-2B estimuladas por 24 h com várias concentrações (MOI 1, 10, 20) de cepas polimórficas de *C. neoformans* (3071,3075,3700,3702) e cepa-padrão de virulência H99.

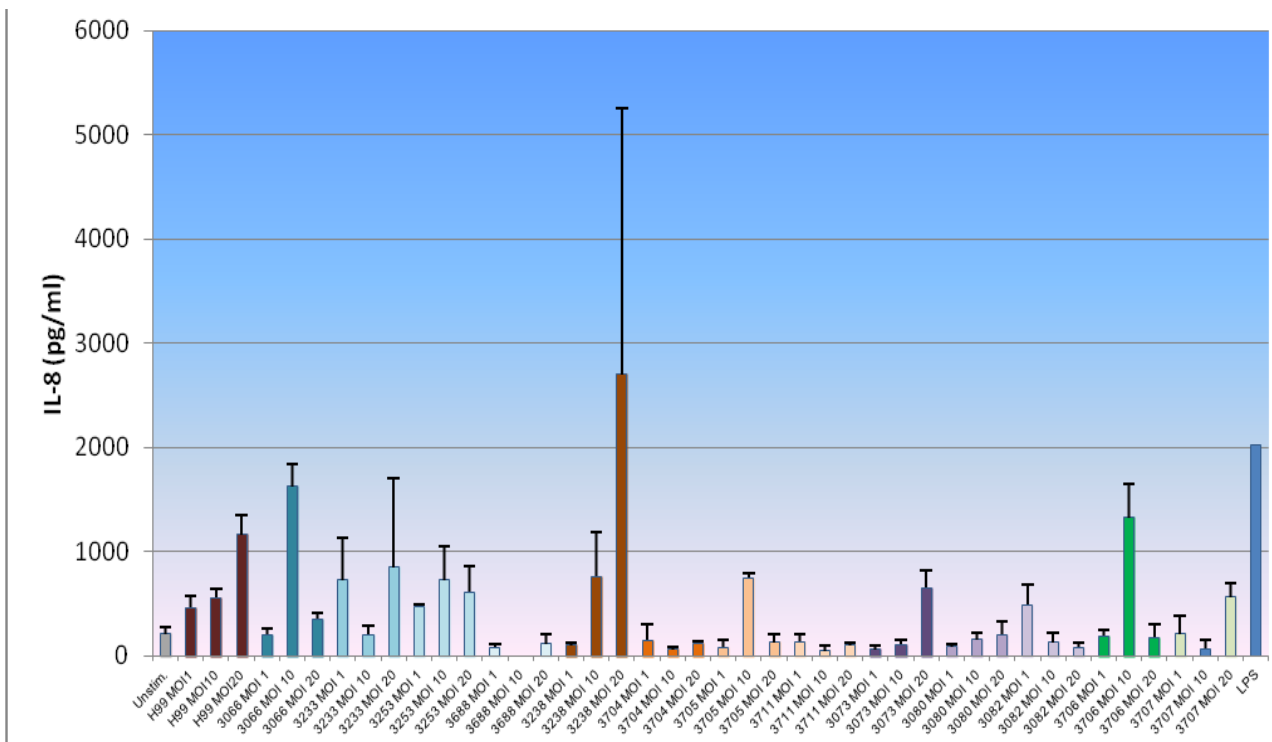
A liberação de LDH por células BEAS-2B incubadas com células polimórficas (3071, 3075, 3700, 3702) resultou em d.o. de 0,5 e para a cepa-padrão H99 a d.o. ficou abaixo de 0,5 (Figura 8).

Verifica-se nessa análise que nos testes com as cepas ambientais e naqueles com a maioria das subpopulações tolerantes à anfotericina B (IAL3704, IAL3705, IAL3711) o aumento da concentração não foi proporcional ao aumento da produção da interleucina em questão, com exceção da cepa IAL3238 (Figura 9)



O.D.,densidade ótica; Unstim, células não estimuladas; Dead cells,células mortas usadas como controle negativo

Figura 8. Secreção de lactato desidrogenase, mensurada em densidade ótica, em cultura de células BEAS-2B estimuladas por 24 h com várias concentrações (MOI 1, 10, 52) de cepas polimórficas de *C. neoformans* (3071,3075,3700,3702) e cepa-padrão de virulência H99.



IL-8, interleucina 8 (pg/mL); Unstim, células não estimuladas; LPS, lipopolissacarídeo (1 ug/mL) usado como controle-positivo

Figura 9. Secreção de interleucina 8 em cultura de células BEAS-2B estimuladas por 24 h com várias concentrações (MOI 1, 10, 20) de cepas polimórficas de *C. neoformans* (IAL3071, IAL3075, IAL3700, IAL3702), tolerantes à anfotericina B de *C. neoformans* e *C. gattii* (IAL3238, IAL3704, IAL3705, IAL3711), cepas ambientais de *C. neoformans* (IAL 3706, IAL3707) e cepa-padrão de virulência H99. Cepas de controle interno: IAL3066, IAL3233, IAL3253, IAL3688.

4.2 Resultados *in vivo*

4.2.1 Experimentos com modelos alternativos

Apis mellifera

A via oral de inoculação das larvas foi efetiva e a via cutânea não resultou em infecção. A incubação em placas de Petri resultou em menor sobrevivência, em relação às placas de microtitulação, em larvas de grupo-controle. O instar larval três permitiu manipulação adequada sem ação deletéria dos animais, enquanto o instar larval 4 apresentou 100% de mortalidade no grupo controle relacionada à degeneração da cutícula.

Determinação de sobrevivência e DL50%

Análise estatística demonstrou valor de DL50% de 1×10^5 cel/mL, conforme pode ser observado na análise de Probit (Figura 10). A recuperação de colônias de *C. neoformans* a partir de tecido animal foi realizada e permitiu estudo da compatibilidade de sua identidade com a cepa injetada. Análise de bandas geradas com o *primer* M13 pela técnica PCR-*fingerprinting* indicou que os isolados de *C. neoformans* obtidos das larvas após a inoculação apresentaram o perfil de bandas idêntico ao do isolado inicial (Figura 11).

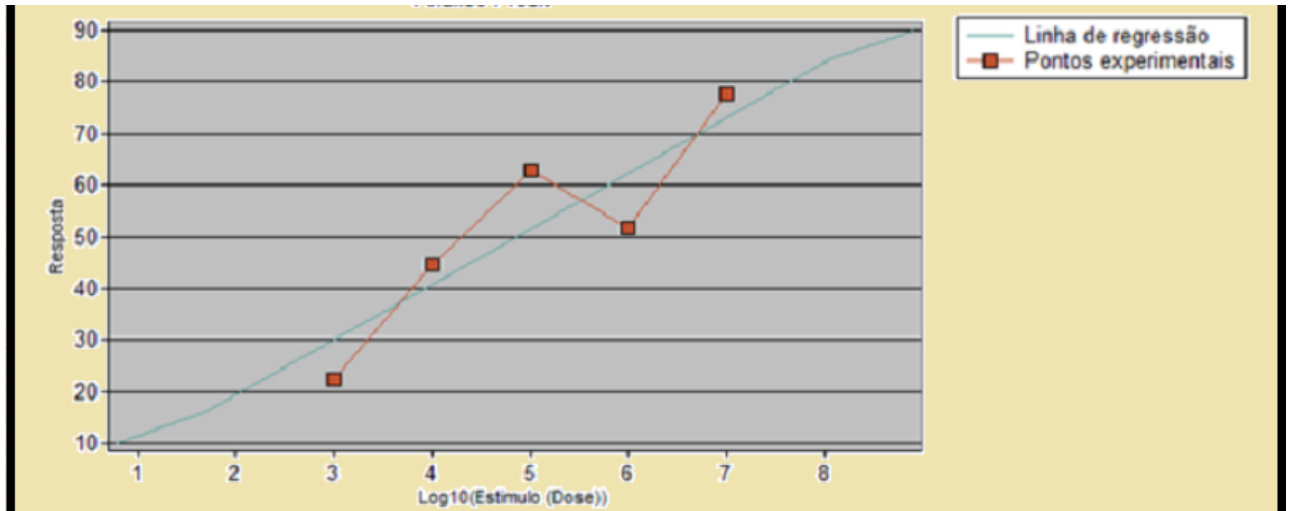


Figura 10. Curva dose-resposta para determinação de dose letal 50% em larvas de *Apis mellifera*

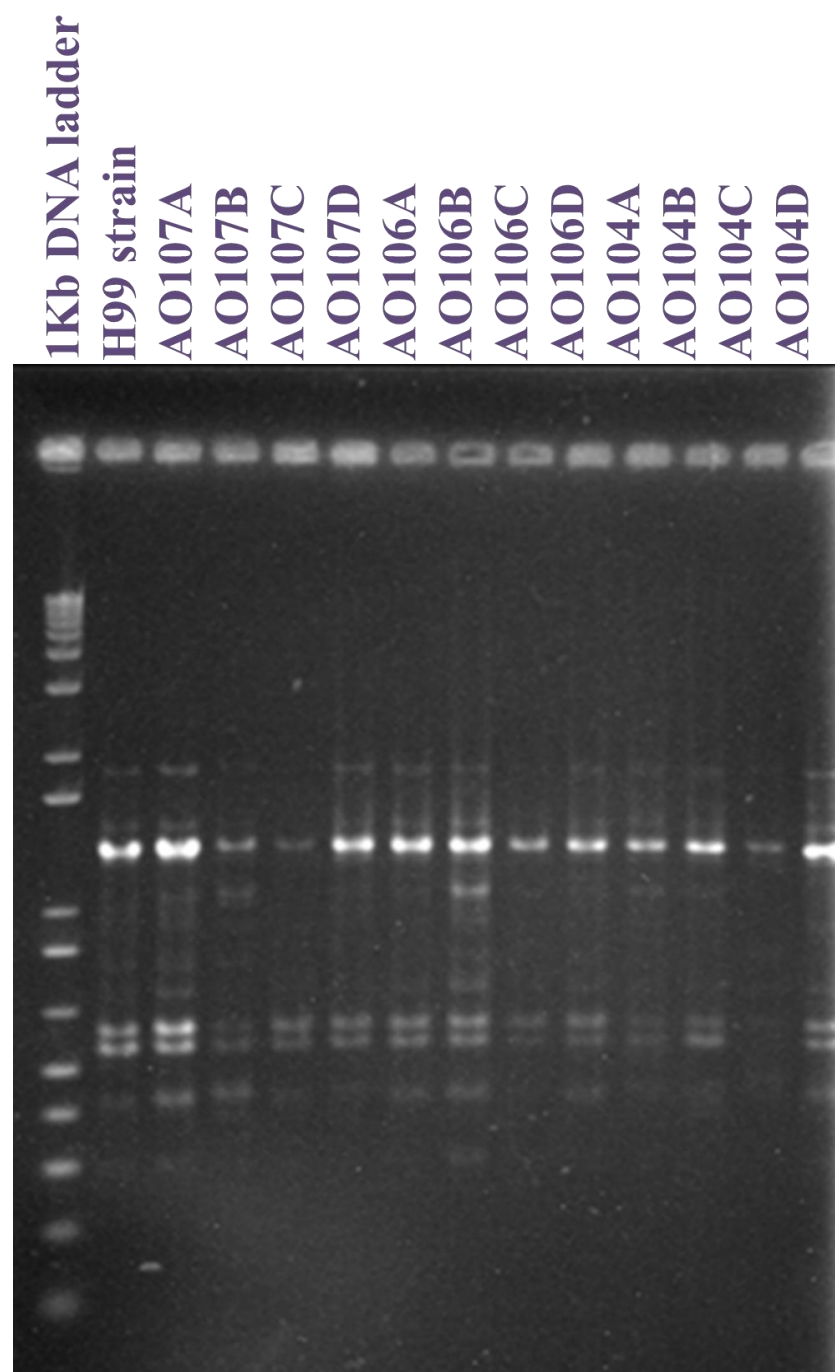


Figura 11. Eletroforese PCR- *fingerprinting* com *primer* M13 de colônias de *C. neoformans* obtidas após infecção de larvas de *Apis mellifera*. 1 Kb DNA ladder, padrão de peso molecular; H99 strain, cepa-padrão H99 antes da inoculação; demais bandas: isolados recuperados após infecção enumerados de AO107A a AO104D

Zophobas morio

As larvas com peso médio de 0,84g apresentaram maior viabilidade e facilidade de manutenção após infecção experimental via injetável. Os grupos inoculados em doses de 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 UFC/mL (DL50%) apresentaram desenvolvimento biológico normal e 100% de sobrevivência até o final do experimento (Figura 12). Análise de bandas geradas com o primer M13 pela técnica PCR- fingerprinting demonstrou que os isolados de *C. neoformans* após a inoculação apresentaram perfil de bandas idêntico ao isolado inicial (Figura 13). Diante do achado de um modelo animal resistente à infecção criptocócica houve forte motivação para desenvolvimento de um novo estudo dentro da área de biotecnologia no qual estudará ação *in vitro* e *in vivo* contra vários modelos animais, além da investigação da formação, citotoxicidade, índice de seletividade, biocinética e biodinâmica da (s) molécula (s) bioativas contra cepas de *Cryptococcus*. As larvas de *Zophobas morio* não puderam ser processadas para estudo histológico, desde que, não foi possível a obtenção de cortes com qualidade para tal ensaio



Figura 12. Ilustração de fases do ciclo de vida de *Zophobas morio* inoculado com *C. neoformans*

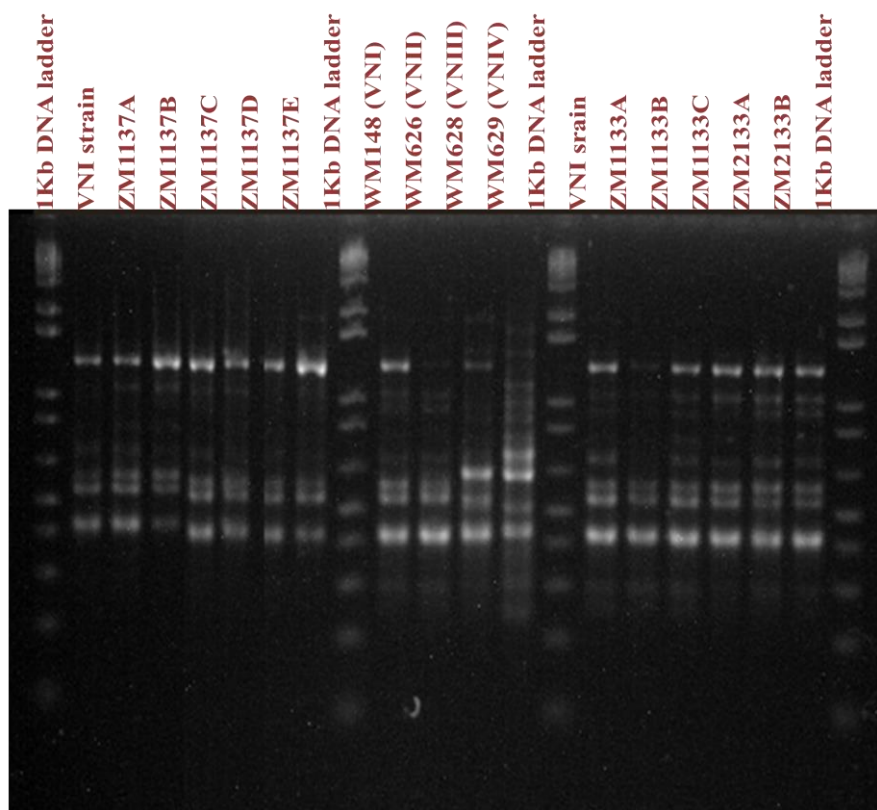


Figura 13. Gel de eletroforese PCR- *fingerprinting* com *primer* M13. 1 Kb DNA ladder, padrão de peso molecular; bandas identificadas com WM, cepas-padrão de tipos moleculares; bandas identificadas como ZM, isolados recuperados de animais inoculados

4.2.2 Experimentos com modelos tradicionais murinos

4.2.2.1 Seleção da linhagens de murinos

Para as curvas de sobrevida, 2 linhagens murinas foram inoculadas com 3 doses (1×10^4 UFC/mL, 1×10^5 UFC/mL, 1×10^6 UFC/mL) com resultados distintos de dose letal 50% para camundongos A/Sn e BALB/c, frente à *C. neoformans* cepa H99 (Figura 14). A suscetibilidade à infecção de cada uma dessas 2 linhagens foi variada, sendo maior resistência ($p < 0,05$) em

A/Sn na concentração de 1×10^5 UFC/mL. No entanto, quando se aumentou a concentração do inóculo para 1×10^6 UFC/mL a linhagem A/Sn foi mais suscetível ($p < 0,001$), com morte ao 15 dias após infecção. Logo, a suscetibilidade das linhagens estudadas frente à infecção por *C. neoformans* H99 dependeu da concentração do inóculo.

Frente a esses resultados optou-se por utilizar inóculo de 1×10^5 UFC/mL para os demais experimentos, de modo a permitir acompanhamento da progressão da criptococose, em ambas as linhagens (A/Sn e BALB/c) e durante períodos pré-determinados de 7, 14 e 21 dias após a infecção. A comparação da carga fúngica pulmonar nas 2 linhagens murinas, mostrou diferença estatística apenas aos 7 dias após a infecção, sendo maior e indicando maior virulência de *C. neoformans* cepa H99 em BALB/c do que camundongos da linhagem A/Sn (Figura 15). Em relação ao perfil histopatológico dos pulmões, verificou-se menor infiltrado inflamatório em camundongos A/Sn (Figura 16).

Os experimentos com a cepa de *C. gattii* R265, avaliada para as 2 linhagens murinas, mostraram que a virulência foi maior ($p < 0,001$) em BALB/c de acordo com a carga fúngica em pulmões após 7 dias de infecção (Figura 17).

Os resultados de virulência das espécies *C. neoformans* (cepa H99) e *C. gattii* (R265) nas duas linhagens murinas demonstram que camundongos BALB/c são mais suscetíveis à infecção quando comparada à linhagem A/Sn.

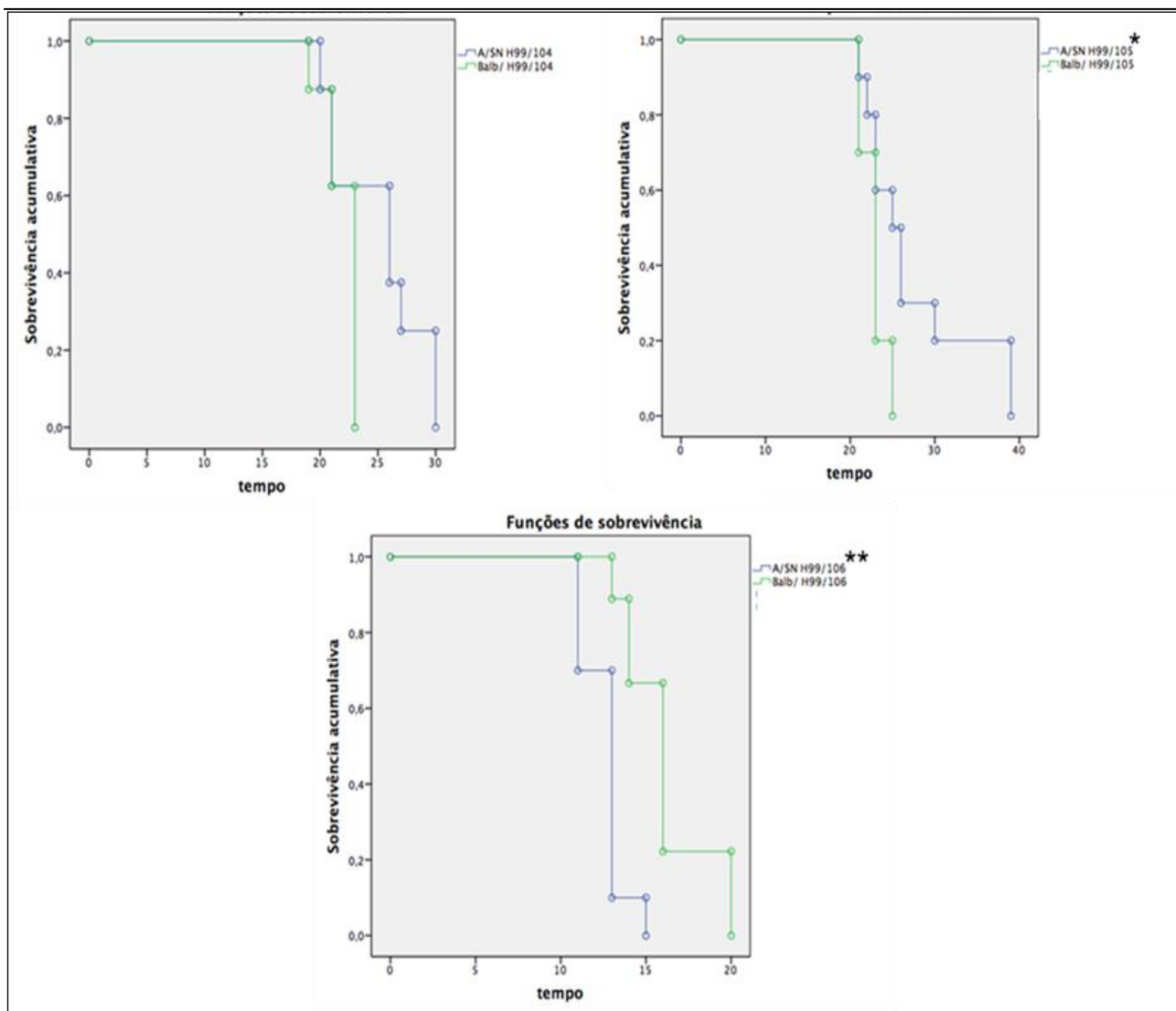


Figura 14. Curvas de sobrevida (tempo em dias) de 2 linhagens de camundongos (A/Sn e BALB/c) inoculados com *C. neoformans* H99, segundo 3 concentrações de inóculo (104=10⁴ UFC/mL, 105=10⁵ UFC/mL, 106=10⁶ UFC/mL). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox) em que asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

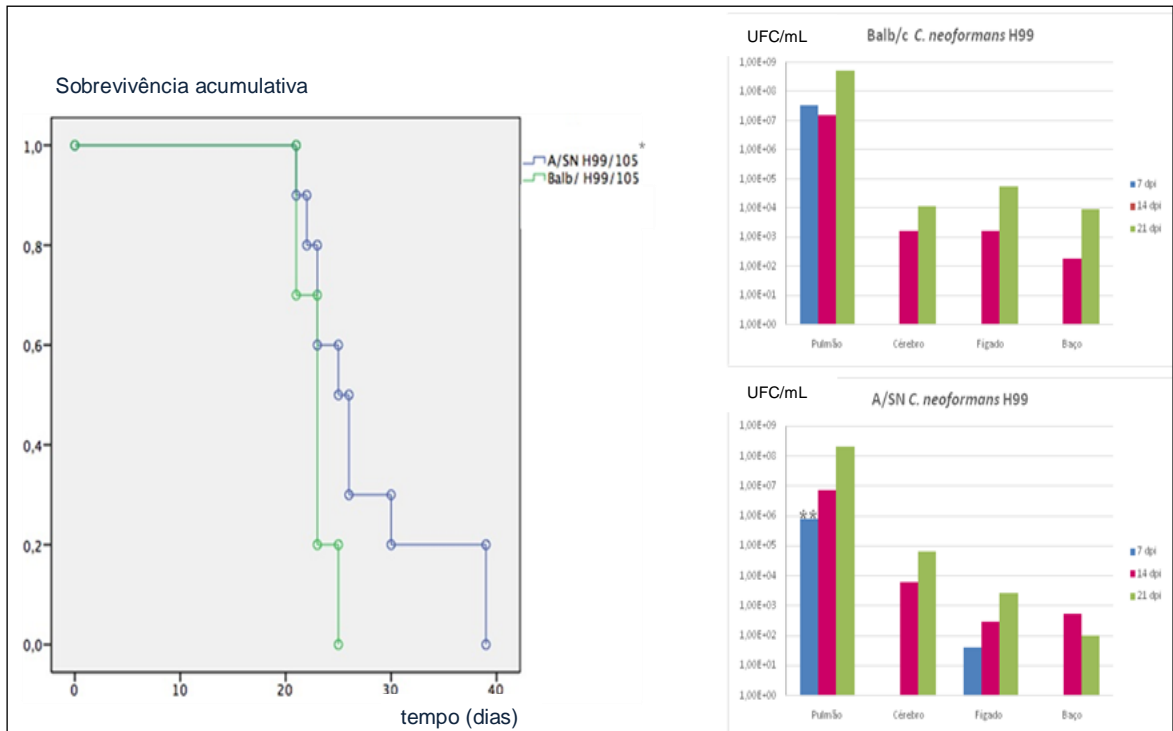


Figura 15. Curvas de sobrevida e carga fúngica em 2 linhagens de camundongos infectados com *C. neoformans* H99 (105=10⁵ UFC/mL). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox), histogramas representam média de resultados para 5 animais, asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ (test-t)

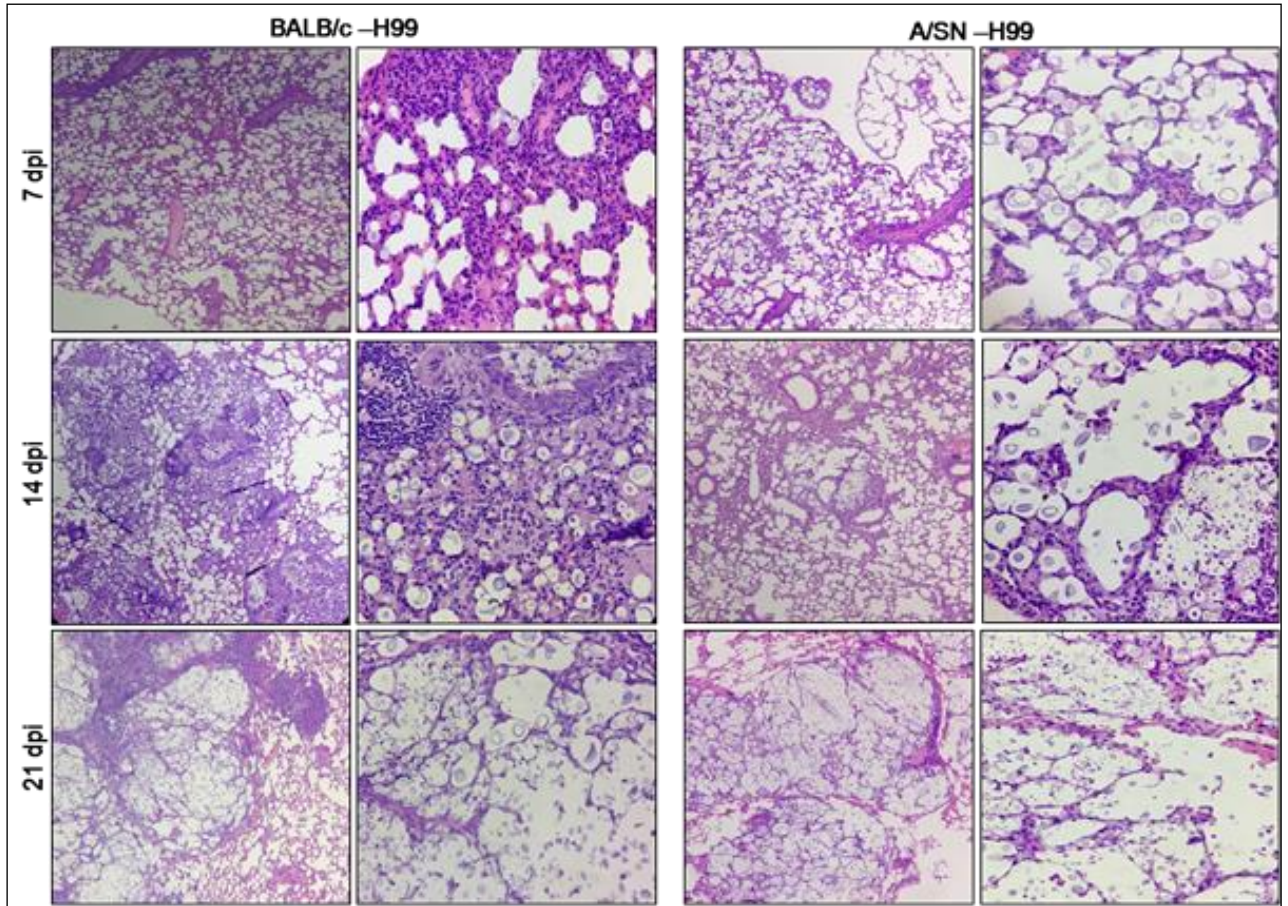


Figura 16. Cortes histológicos de pulmões de BALB/c e A/Sn após 7, 14 e 21 dias de infecção (dpi), com cepa *C. neoformans* H99, coloração HE (10x esquerda, 40x direita)

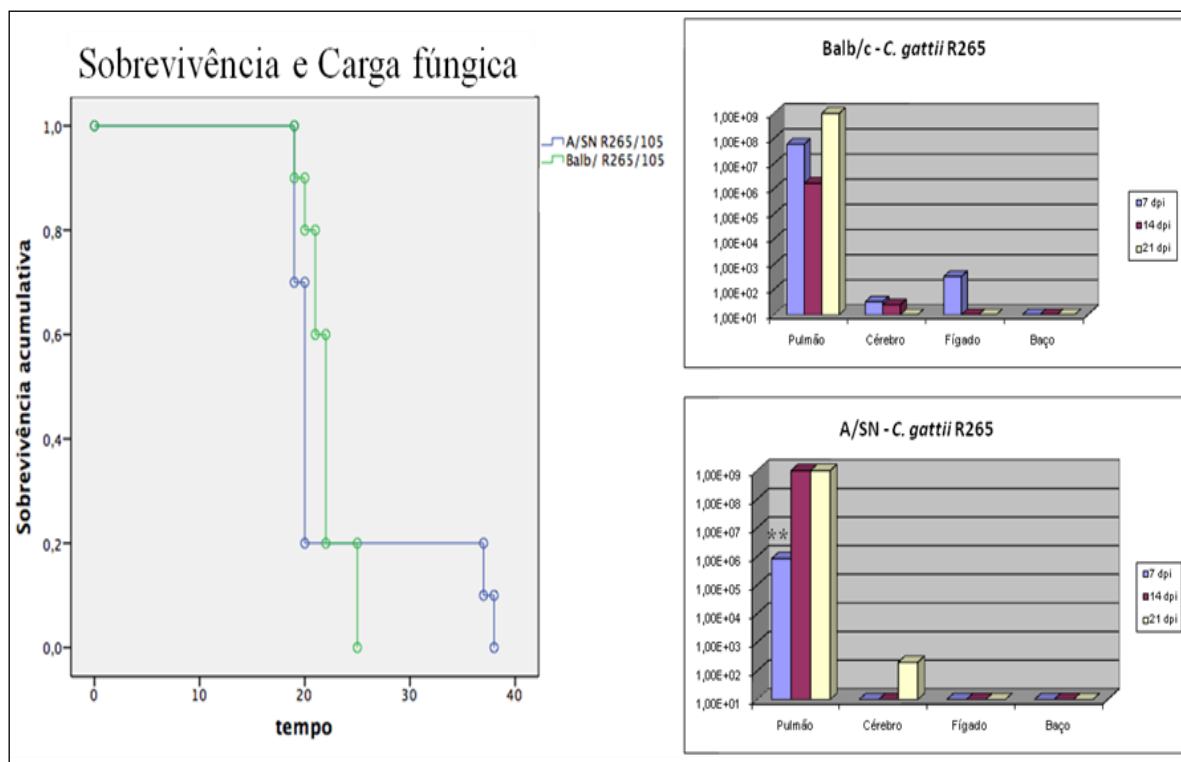


Figura 17. Curvas de sobrevivência (tempo em dias pós infecção, dpi) e carga fúngica em 2 linhagens de camundongos infectados com *C. gattii* R265 (1×10^5 UFC/mL). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox), histogramas representam média de resultados para 5 animais, asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos $**p < 0,01$ (test-*t*)

4.2.2.2 Comparação entre virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*

Diante do fato de que animais BALB/c foram mais suscetível à criptococose experimental, comparou-se a virulência de ambas as espécies (*C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265) nessa linhagem, observando-se que a cepa R265 apresentou maior carga fúngica pulmonar aos 7 e 21 dias, enquanto a cepa H99 induziu mais colônias nesses órgãos aos 14 dias após infecção (Figura 18). Quanto à disseminação extra-pulmonar da doença, verificou-se que camundongos infectados com *C. neoformans* H99 apresentaram disseminação, tanto para o cérebro, quanto fígado e baço,

ainda que somente após 14 dias de infecção; de outro modo, *C. gattii* R265 limitou-se mais aos pulmões.

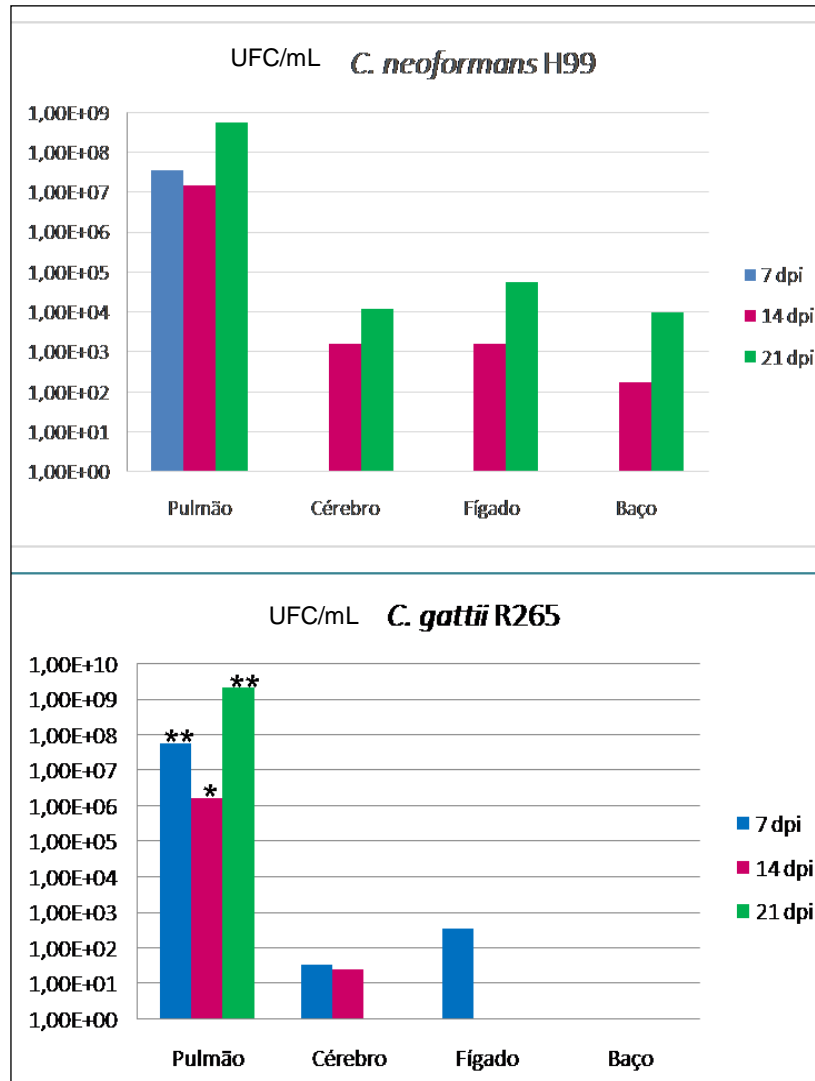


Figura 18. Carga fúngica em camundongos BALB/c infectados (1×10^5 UFC/mL) com *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265. Os histogramas representam média de resultados de 5 animais, asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (test-*t*)

4.2.2.3 Avaliação de produção de células titans em modelo murino

Células titans de *Cryptococcus* foram observadas após inoculação em modelo murino (Figura 19). O diâmetro *in vitro* das células, tanto da cepa-padrão H99, quando das cepas IAL3700 e IAL3071, atingiu valor máximo de 10 µm e *in vivo* chegou a 100 µm.

A proporção de células titans, no pulmão de murinos infectados, nas distintas cepas variou de 3 % a 72% , sendo nas cepas padrão H99 de 72%, na IAL3071 de 68,6% e na IAL3700 de 3,0% conforme pode ser observado na figura 24.

Carga fúngica de cepas polimórficas em tecidos murinos

A carga fúngica em pulmões de modelo murino da linhagem BALB/c infectado com a cepa-padrão H99, cepa IAL3071 e com cepa IAL3700 foi de 9×10^6 UFC/mL, 9×10^6 UFC/mL e 2×10^6 UFC/mL, respectivamente, aos 14 dpi; aos 21 dpi esse valor foi de 5×10^8 UFC/mL, 9×10^7 UFC/ml e 1×10^6 UFC/mL, respectivamente. No cérebro, a contagem foi realizada apenas aos 21 dpi e correspondeu à 3×10^8 UFC/mL, 9×10^7 UFC/mL e 9×10^6 UFC/mL nesse conjunto de cepas (H99, IAL3071 e IAL3700). Esses dados estão ilustrados na Figura 20.

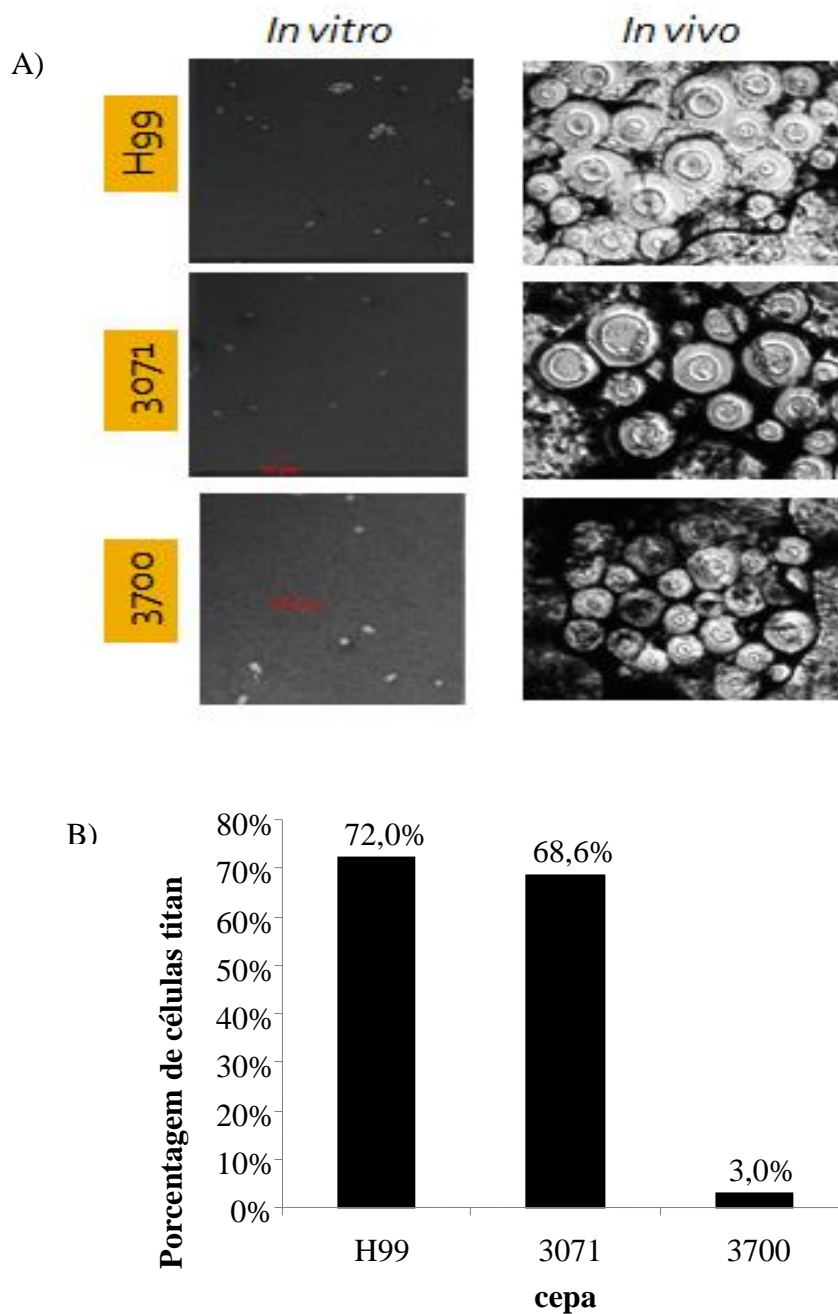


Figura 19. Camundongos BALB/c infectados via intranasal com 1×10^4 células de *C. neoformans*, H99 ($n=2$), 3071 ($n=4$) e 3700 ($n=4$). 14 dias pós inoculação, foi retirado lavado broncoalveolar e contado cerca de 300 células por animal. (A) Células titans (diâmetro, $>10 \mu\text{m}$) corada com tinta da China quantificada por microscopia (40x). (B) Porcentagem de células titans por cepa inoculada **, $P < 0.000$.

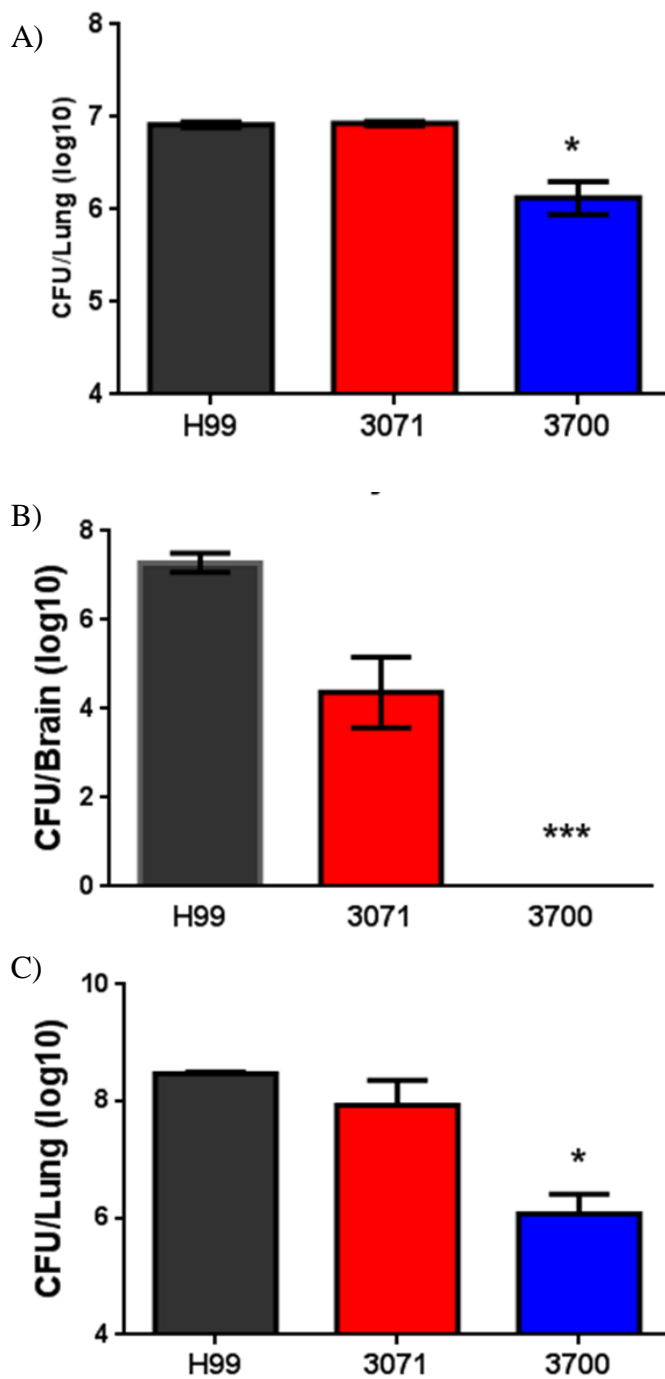


Figura 20. Carga fúngica em tecidos de camundongos BALB/c infectados (10^4 UFC/mL) com 2 cepas polimórficas (IAL3071, IAL3700) e cepa-padrão H99. A) pulmão aos 14 dias pós infecção (dpi); B) cérebro aos 21 dpi; C) pulmão aos 21 dpi. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Análise histopatológica de infecção por cepas polimórficas

Análise histopatológica pela coloração H&E de pulmões infectados com *C. neoformans*, permitiu a observação de que ambas as cepas H99, IAL3071 e IAL3700 desenvolveram pneumonia intersticial subaguda multifocal. Porém no caso de infecção causada pelas cepas H99 e IAL3071 observamos que a pneumonia foi de moderada a marcante, associada à presença de estruturas fúngicas no interior dos alvéolos em ambas as cepas, e na cepa H99 notou-se na coloração PAS células fúngicas também em bronquíolos. Associada a pneumonia, foi possível visualizar alta quantidade de células titans produzida pelas cepas H99 e IAL3071. Diferentemente, a infecção causada pela cepa IAL3700 levou a pneumonia discreta associada à discreta quantidade de estruturas fúngicas e não visualização de células titans como pode ser observado na Figura 21.

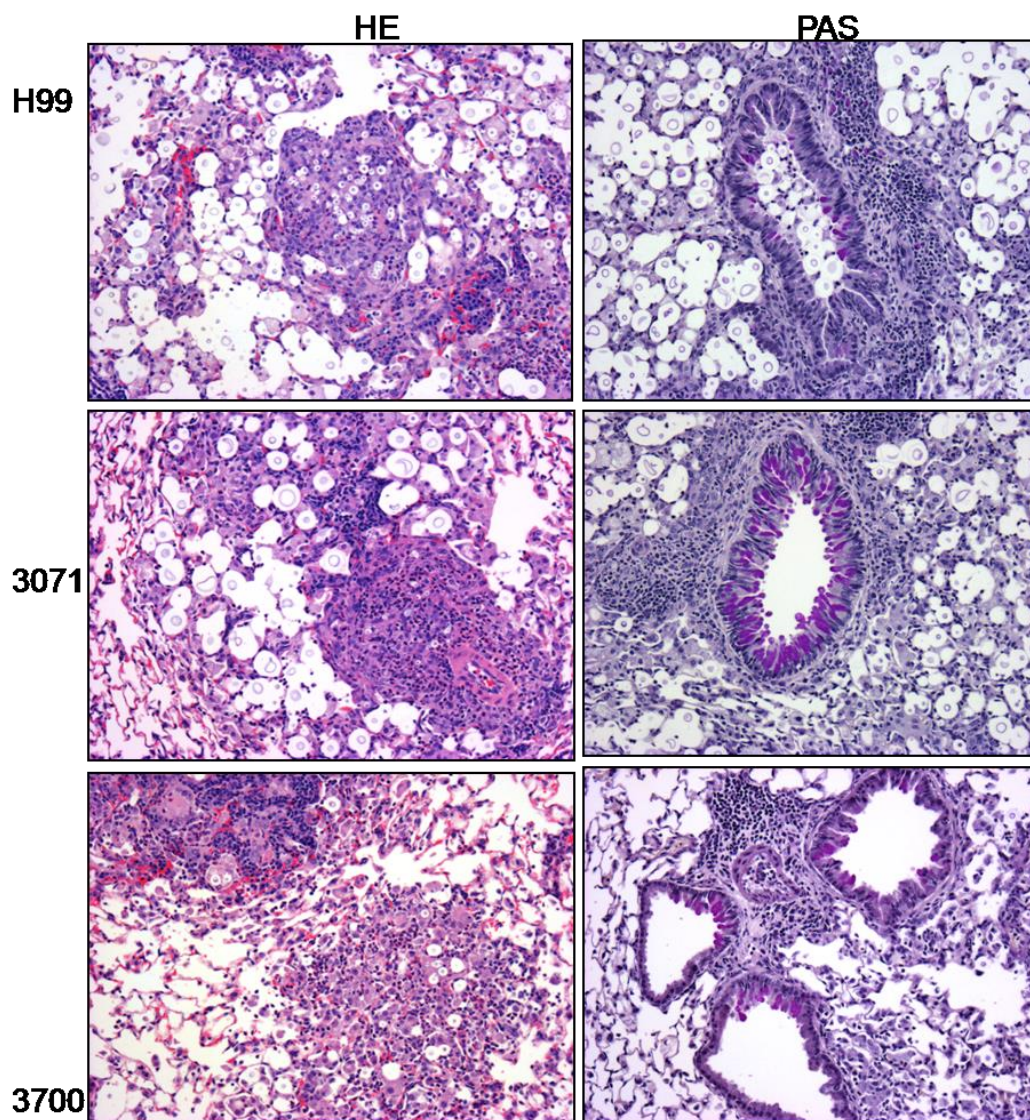


Figura 21. Histopatológico de pulmão de BALB/c após 14 dias de infecção, colorações HE e PAS. (10x)

Análise da resposta imune celular induzida por cepas polimórficas

O recrutamento celular nos pulmões infectados com cepas de *C. neoformans* foi quantificado por citometria de fluxo para células T (CD4⁺ e CD8⁺) e também eosinófilos, como ilustrado na Figura 22.

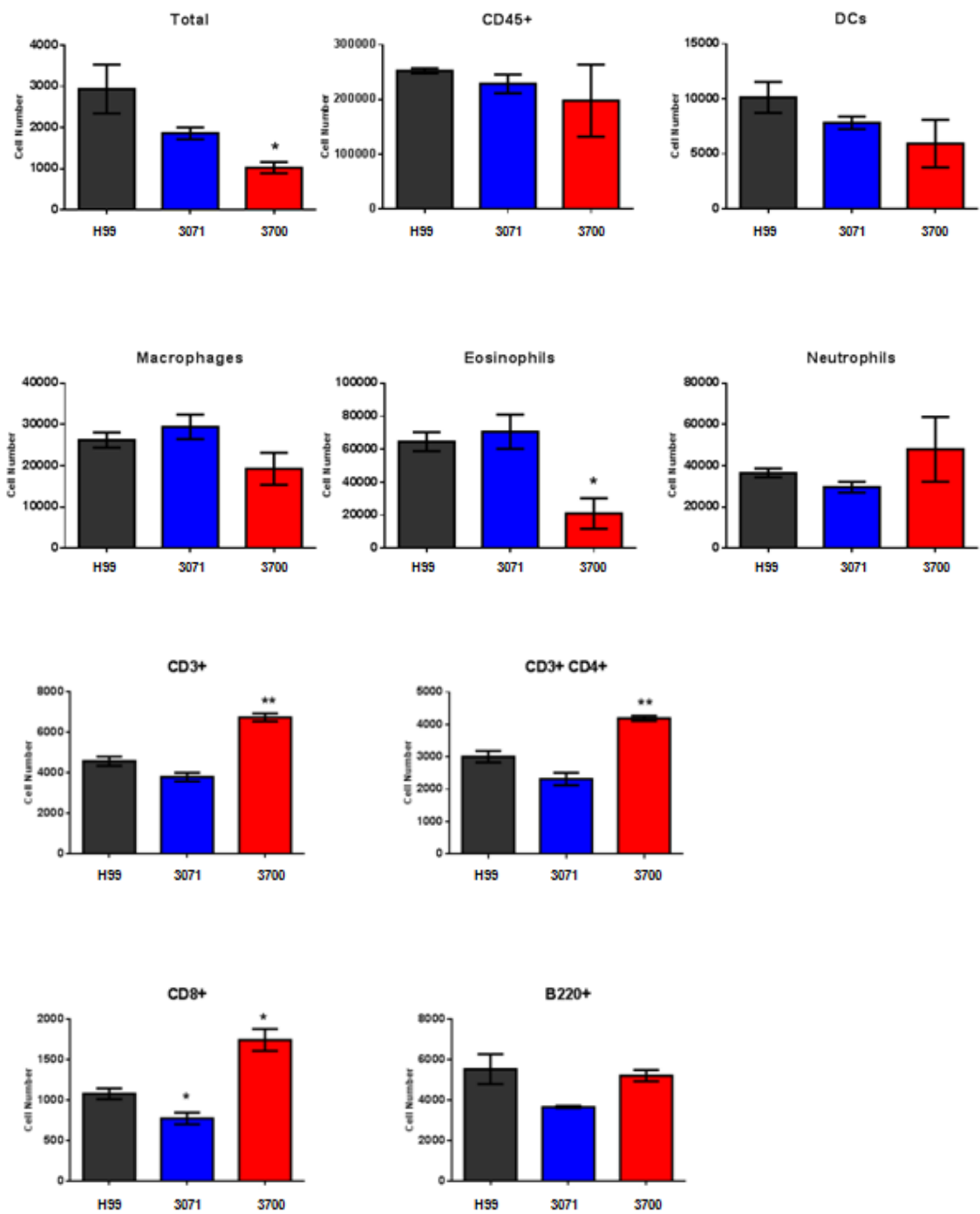


Figura 22. Resposta inflamatória pulmonar (14 dias) em camundongos BALB/c infectados com cepas de *C. neoformans* IAL3071, IAL3700 ou cepa-padrão H99; DCS células dendríticas * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

4.2.2.4 Análise de subpopulações tolerantes à AmB em modelo murino

Ensaio com C. neoformans cepa H99 e sua subpopulação tolerante H99T72

Para avaliar virulência das subpopulações de H99 e R265 e compará-la à de suas respectivas parentais foram compilados os resultados dos experimentos de sobrevivência, carga fúngica em pulmões, disseminação da criptococose para sítios extra-pulmonares (cérebro, fígado e baço) e perfil histopatológico nos pulmões

A análise dos aspectos morfológicos, assim como, de virulência mostrou diferenças entre a subpopulação tolerante (após exposição por 72 h à AmB) e sua parental *C. neoformans* cepa H99.

As células da subpopulação tolerante de H99 apresentaram tamanho menor e com mais vacúolos em meio líquido, ainda que sem significância estatística, em comparação à cepa parental (Figura 23). Em relação à sobrevivência em modelo murino, não houve diferença com significância estatística entre a subpopulação e a cepa parental, bem como na disseminação da doença extra-pulmonar. A carga fúngica pulmonar foi maior ($p < 0,05$), aos 14 dias pós infecção em murinos BALB/c infectados com subpopulação tolerante, quando comparados à carga em animais inoculados com cepa parental H99 (Figura 24).

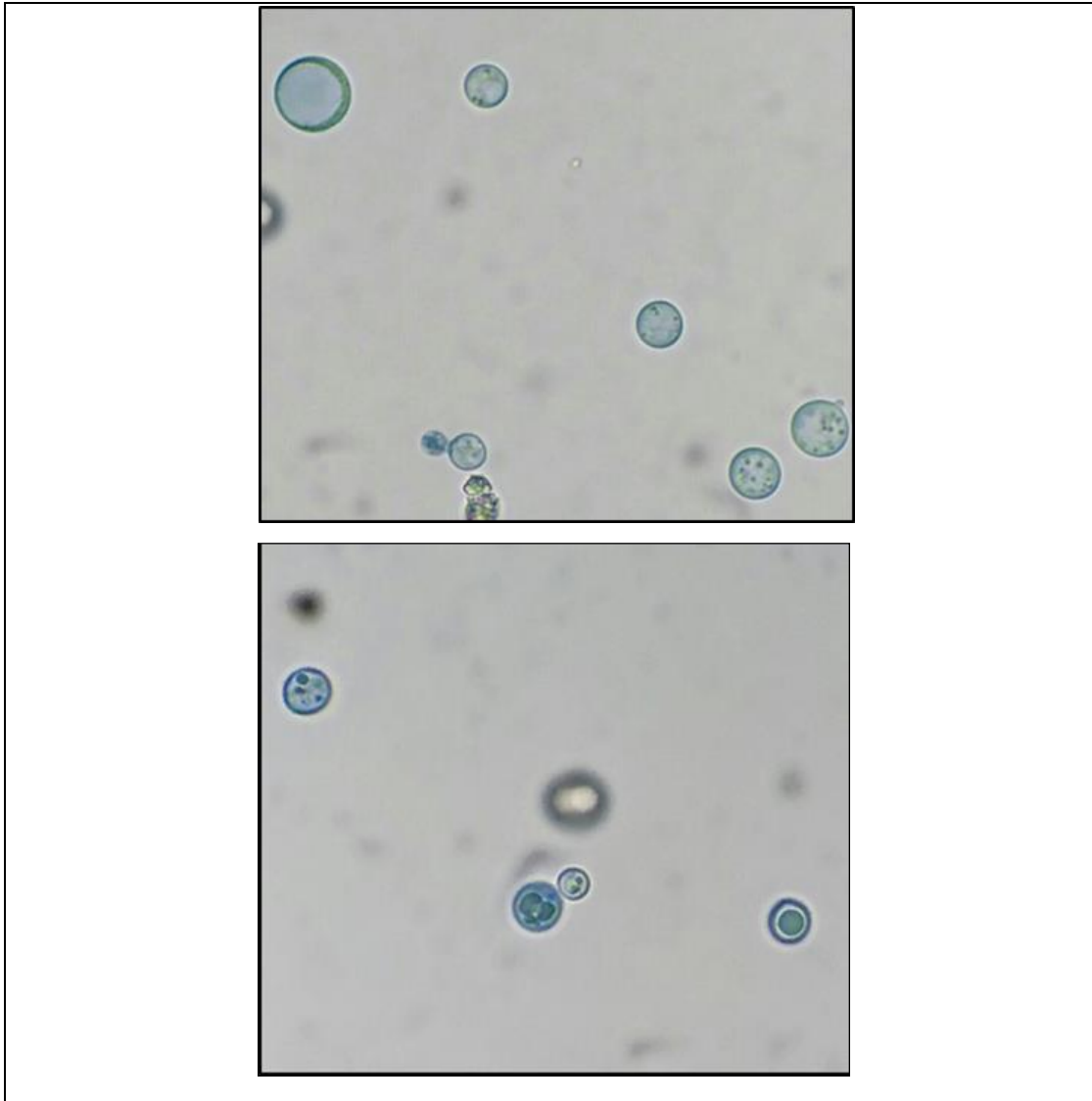


Figura 23. Células da cepa *C. neoformans* H99 acima e de sua subpopulação tolerante abaixo, obtida após exposição por 72 horas à 1 mg de anfotericina B (coloração por azul de lactofenol, 40x).

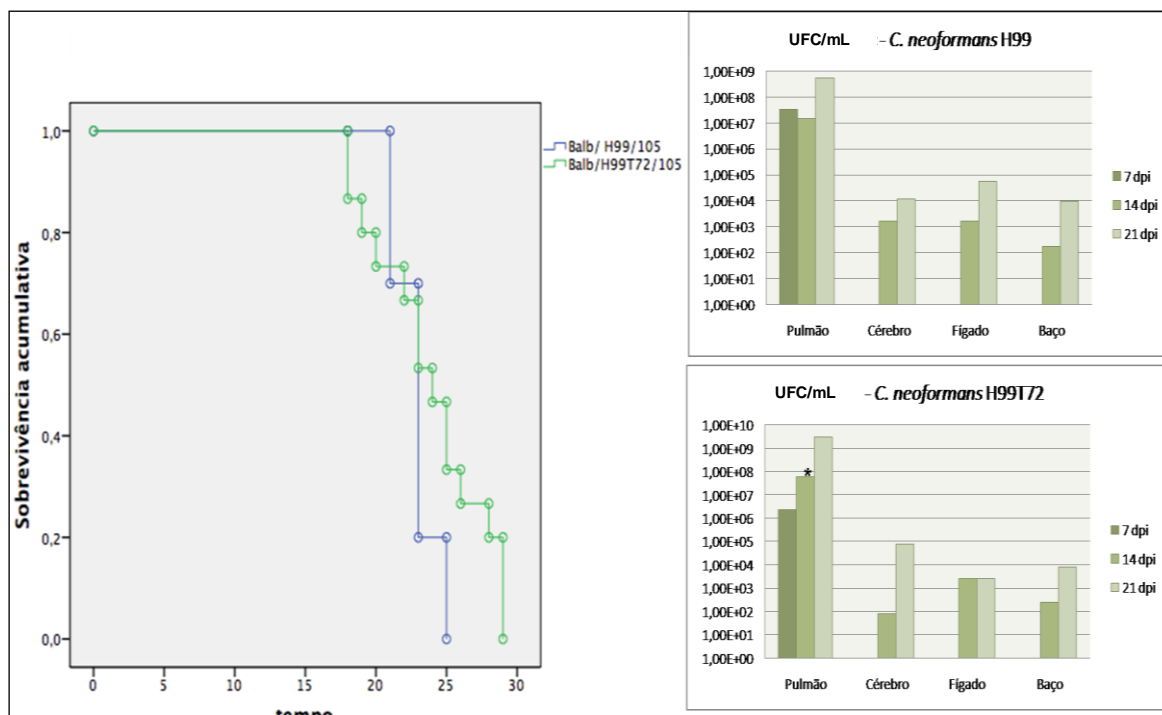


Figura 24. Curvas de sobrevida e carga fúngica (em dias pós infecção, dpi) em camundongos BALB/c infectados (1×10^5 UFC/mL) com subpopulação tolerante de *C. neoformans* (H99T72) e cepa parental H99. Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox), histogramas representam média de 5 animais; asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos $*p < 0,05$ (test- t)

Ensaio com *C. gattii* cepa R265 e sua subpopulação tolerante R265T72

Camundongos BALB/c infectados com subpopulação tolerante (72 h de exposição à AmB), em comparação com aqueles inoculados com cepa parental R265, não apresentaram diferença estatística nas curvas de sobrevida e disseminação extra-pulmonar; porém a carga fúngica pulmonar induzida pela subpopulação tolerante foi maior, aos 14 e 21 dias pós infecção, em relação aquela produzida pela cepa parental (Figura 25).

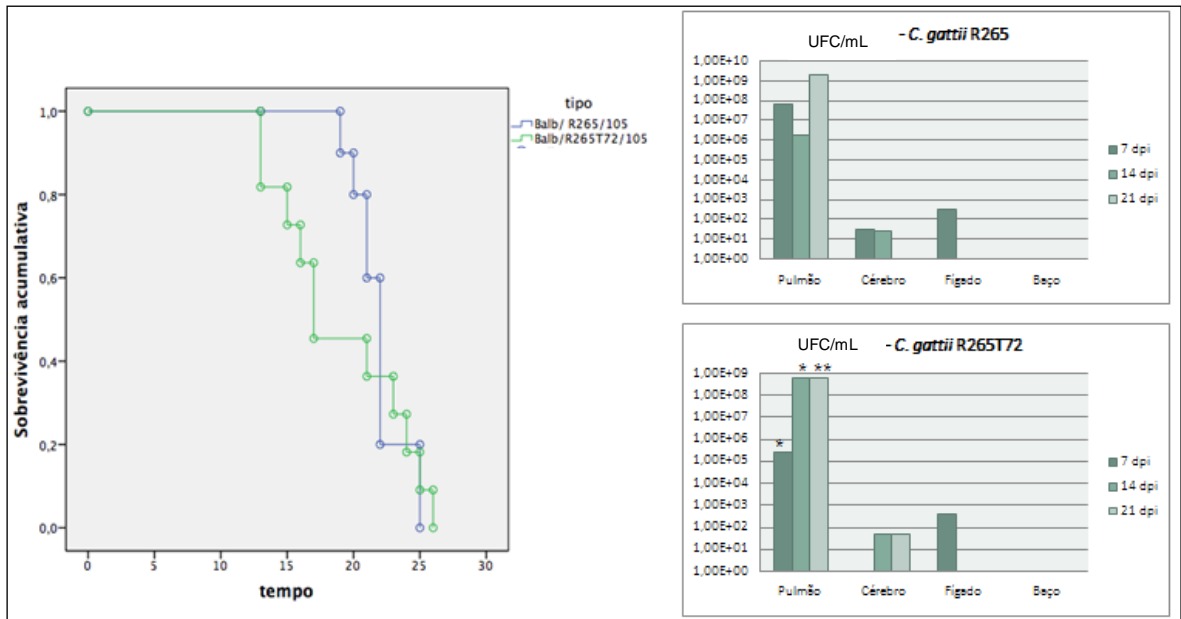


Figura 25. Curvas de sobrevida (tempo em dias pós infecção, dpi) e carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com subpopulação tolerante de *C. gattii* R265T72 ou cepa parental R265 (1×10^5 UFC/mL). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox), histogramas representam média de resultados de 5 animais; asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ (test-t)

Avaliação de resposta a tratamento com AmB em infecção experimental com subpopulações tolerantes e cepas parentais

A terapia com AmB (1 mg/kg/dia), realizada via intraperitoneal por 7 dias em camundongos da linhagem BALB/c, levou à maior sobrevida de animais com infecção experimental por supopulação tolerante H99T72 de *C. neoformans*, ainda que tenha havido maior disseminação cerebral e esplênica, em relação ao grupo inoculado com cepa parental H99 (Figuras 26 e 27). Não foi observada diferença estatística significativa entre as taxas de redução da carga fúngica dos animais tratados após inoculados com a

subpopulação e aqueles tratados após inoculação com a respectiva cepa parental H99 (Figura 28).

Camundongos infectados com subpopulação tolerante R265T72 de *C. gattii* e tratados com AmB responderam melhor à terapia, do que aqueles infectados com a respectiva cepa parental, por terem maior sobrevida (Figura 29).

A Figura 30 ilustra a carga fúngica pulmonar e extra pulmonar entre os grupos tratados e não tratados. Diferença estatística indica menor carga fúngica pulmonar, aos 7 dias pós infecção, em camundongos infectados com subpopulação tolerante R265T72, em relação aqueles infectados com a respectiva cepa parental R265, mas apenas para os grupos sem tratamento. Foi observada diminuição similar na carga fúngica dos pulmões, após tratamento com AmB, tanto em animais infectados com subpopulação tolerante, quanto naqueles com a cepa parental R265 (Figura 31).

A terapia com AmB em murinos inoculados com subpopulação tolerante, levou à redução de infiltrado inflamatório, como exemplificado na Figura 31.

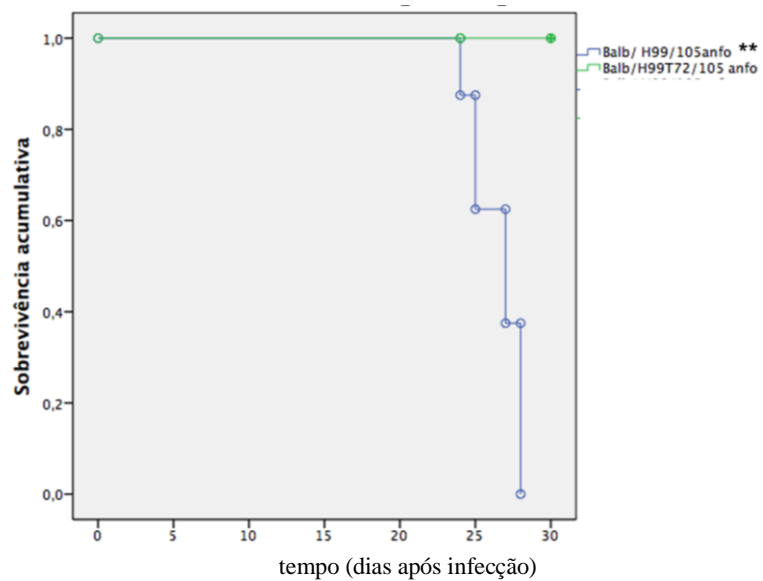


Figura 26. Curvas de sobrevivência de BALB/c infectados com subpopulação tolerante H99T72 ou cepa parental de *C. neoformans* H99 e tratados com AmB (1mg/kg/dia). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox); diferença estatística entre os grupos ** $p < 0,001$ (test- t)

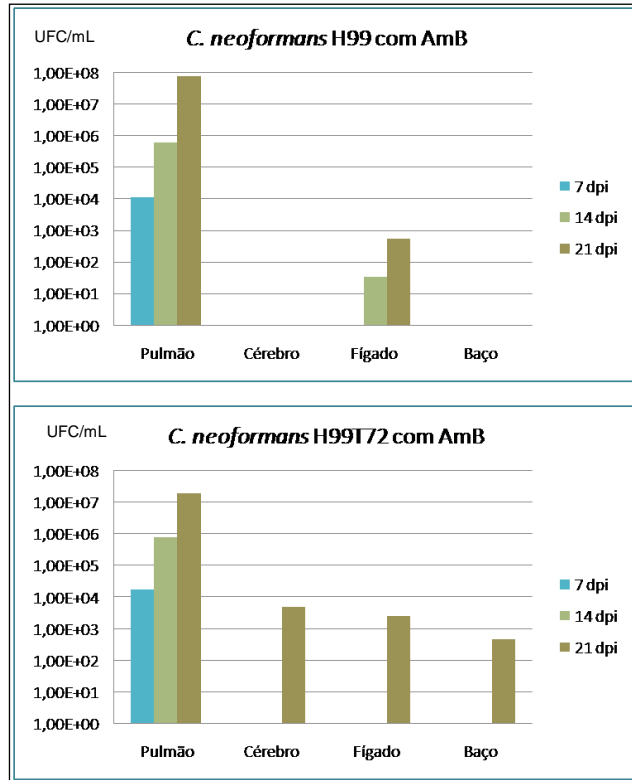


Figura 27. Carga fúngica em camundongos BALB/c infectados (1×10^5 UFC/mL) com subpopulação tolerante H99T72 ou cepa parental de *C. neoformans* H99 e tratados com AmB (1mg/kg/dia). Histogramas representam média de resultados de 5 animais, após 7, 14 e 21 dias pós infecção-dpi

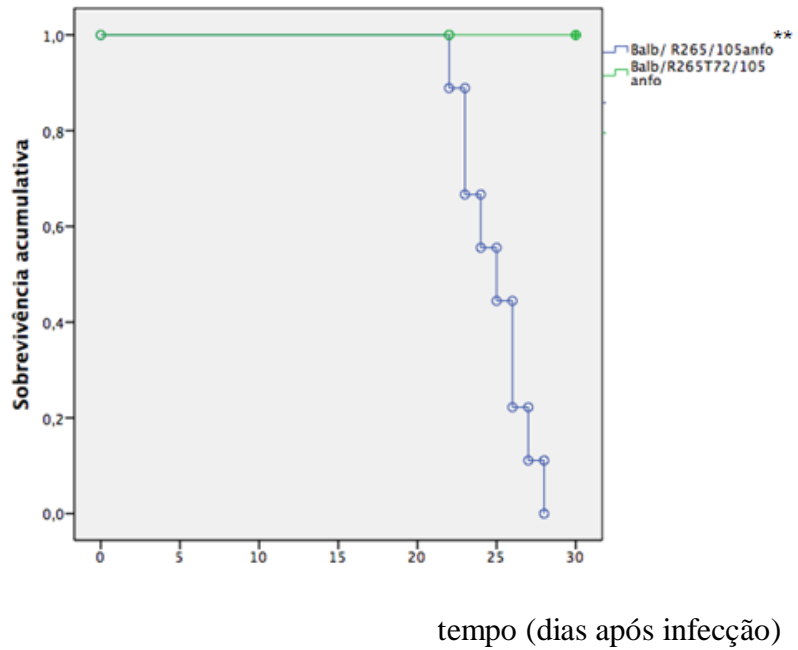


Figura 28. Curvas de sobrevida e carga fúngica em camundongos BALB/c infectados subpopulação tolerante R265T72 ou cepa parental de *C. gattii* R265, tratados com AmB (1mg/kg/dia). Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência para os diferentes níveis de tipo Log Rank (Mantel-Cox) ** $p < 0,001$

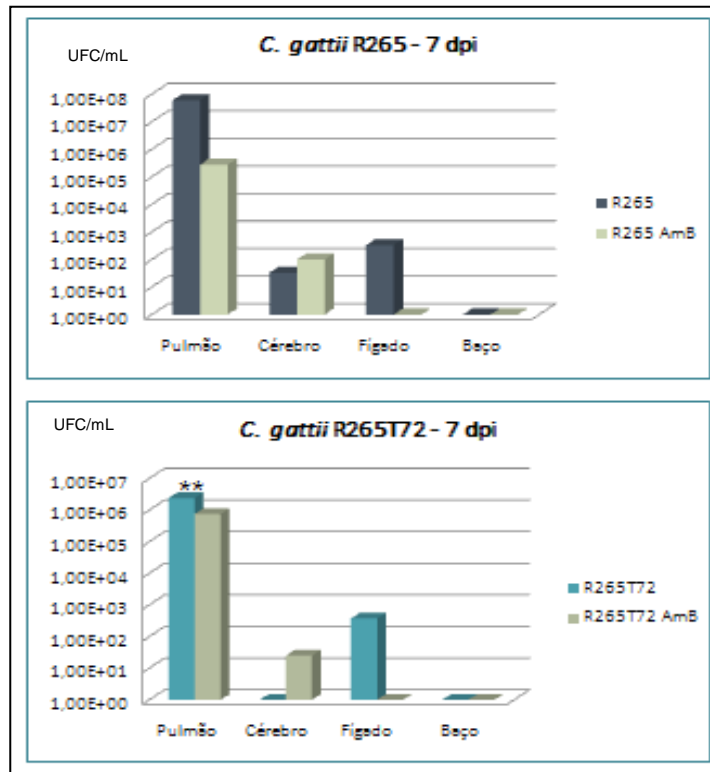


Figura 29. Carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com subpopulação tolerante R265T72 ou cepa parental de *C. gattii* R265, tratados (AmB) e não tratados. Histogramas representam média de resultados de 5 animais, após 7, 14 e 21 dias pós infecção-dpi; asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos sem tratamento $**p < 0,001$ (test-*t*)

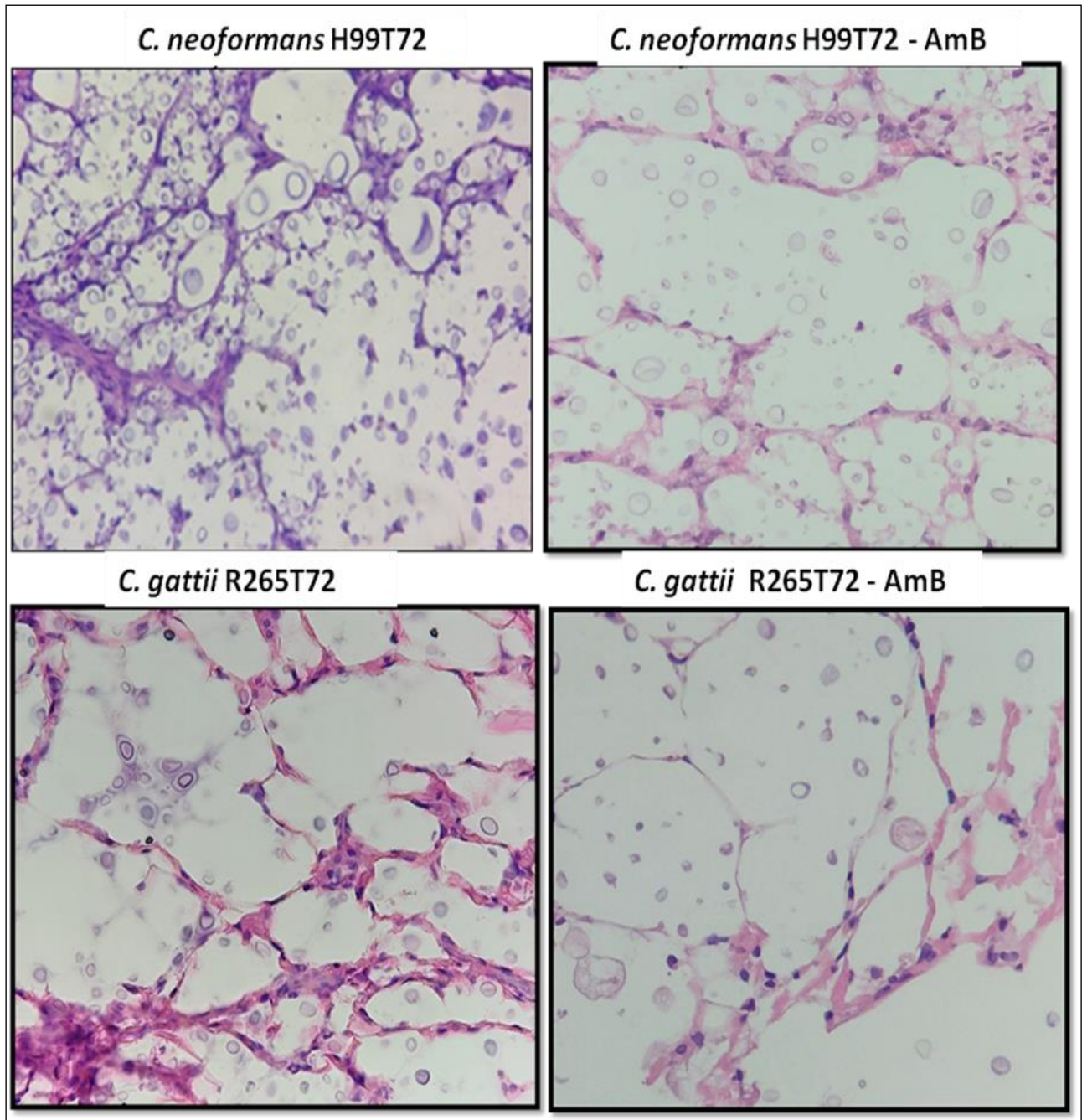


Figura 30. Histopatológico de pulmões de camundongos BALB/c infectados com subpopulações tolerantes à AmB (acima H99T72 e abaixo R265T72), sem tratamento (esquerda) e com tratamento (direita) com AmB (1mg/kg/dia), coloração HE (40x)

Avaliação da resposta imunológica adaptativa

A avaliação de resposta imune adaptativa foi realizada a partir da dosagem de citocinas presentes nos pulmões e cérebro relacionadas às respostas celulares tipo Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12), tipo Th2 (IL4, IL10) e tipo Th17. A análise de citocinas presentes nos pulmões foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a infecção e no cérebro aos 21 dias.

A infecção com cepa H99 em camundongos BALB/c provocou a produção de citocinas Th2 e reguladoras (Figura 31), tais como IL-4 e IL-10 (significância estatística aos 14 dpi). Nos camundongos A/Sn a resposta Th2 e Th1 foi menor, ainda assim, observou-se produção de citocinas Th1 como TNF- α (significância estatística aos 21 dpi) e IL-6.

A infecção com cepa R265 em camundongos BALB/c provocou a produção de citocinas Th2 e reguladoras (Figura 32), tais como IL-4 (significância estatística aos 21 dpi) e IL-10. Nos camundongos A/Sn a resposta Th2 e Th1 foi menor, ainda assim observou-se produção de citocinas Th1 como TNF- α e IL-6 (significância estatística aos 21 dpi).

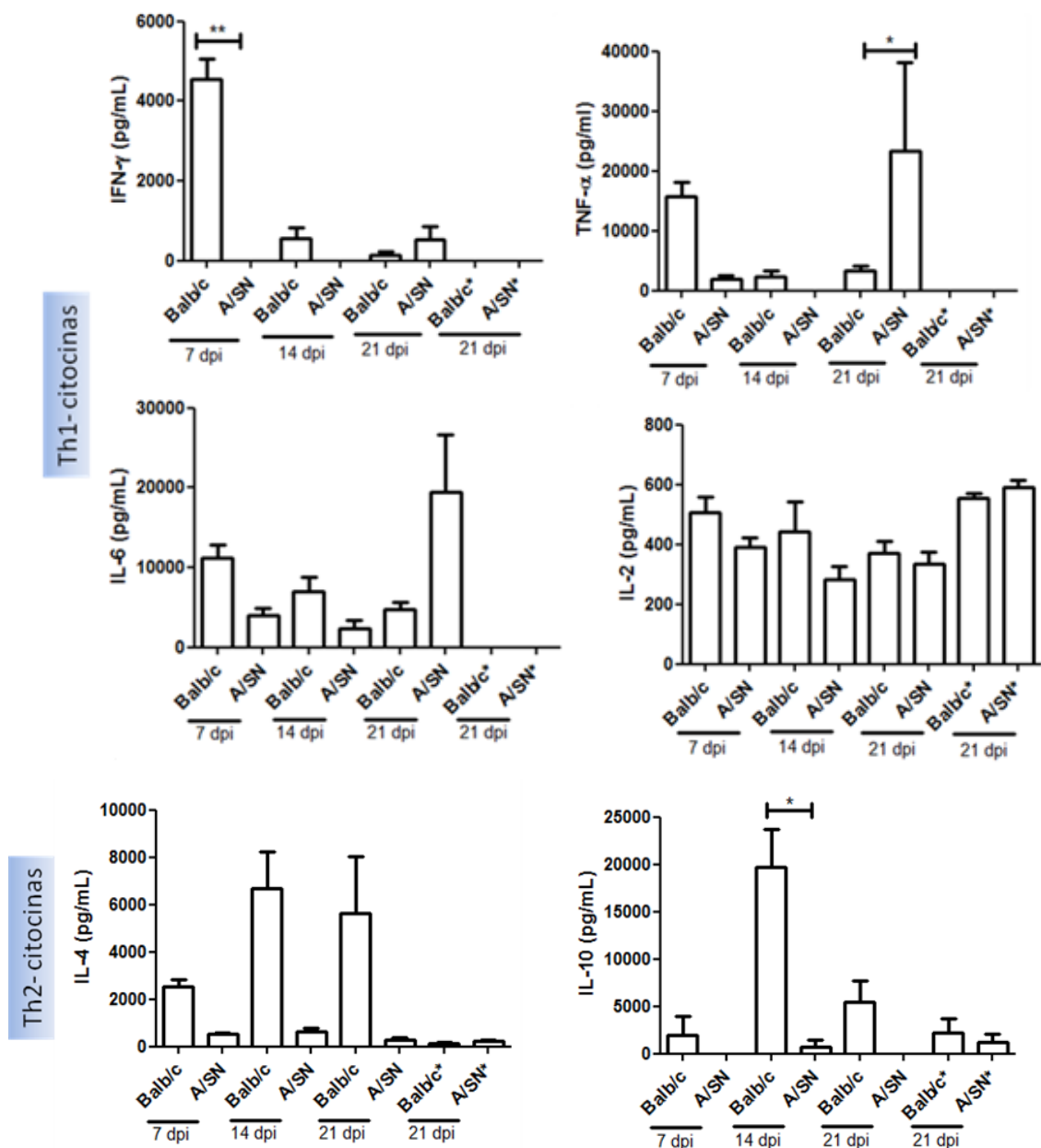


Figura 31. Concentração de citocinas em camundongos BALB/c e A/Sn infectados com *C. neoformans* H99. A concentração das citocinas foi determinada em pulmões macerados aos 7, 14 e 21 dias pós infecção (dpi) ou cérebro macerado aos 21 dpi (*). Os histogramas representam média e o desvio padrão de resultados de 5 animais em cada período analisado. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2-way com *post-test* Dunnett) * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

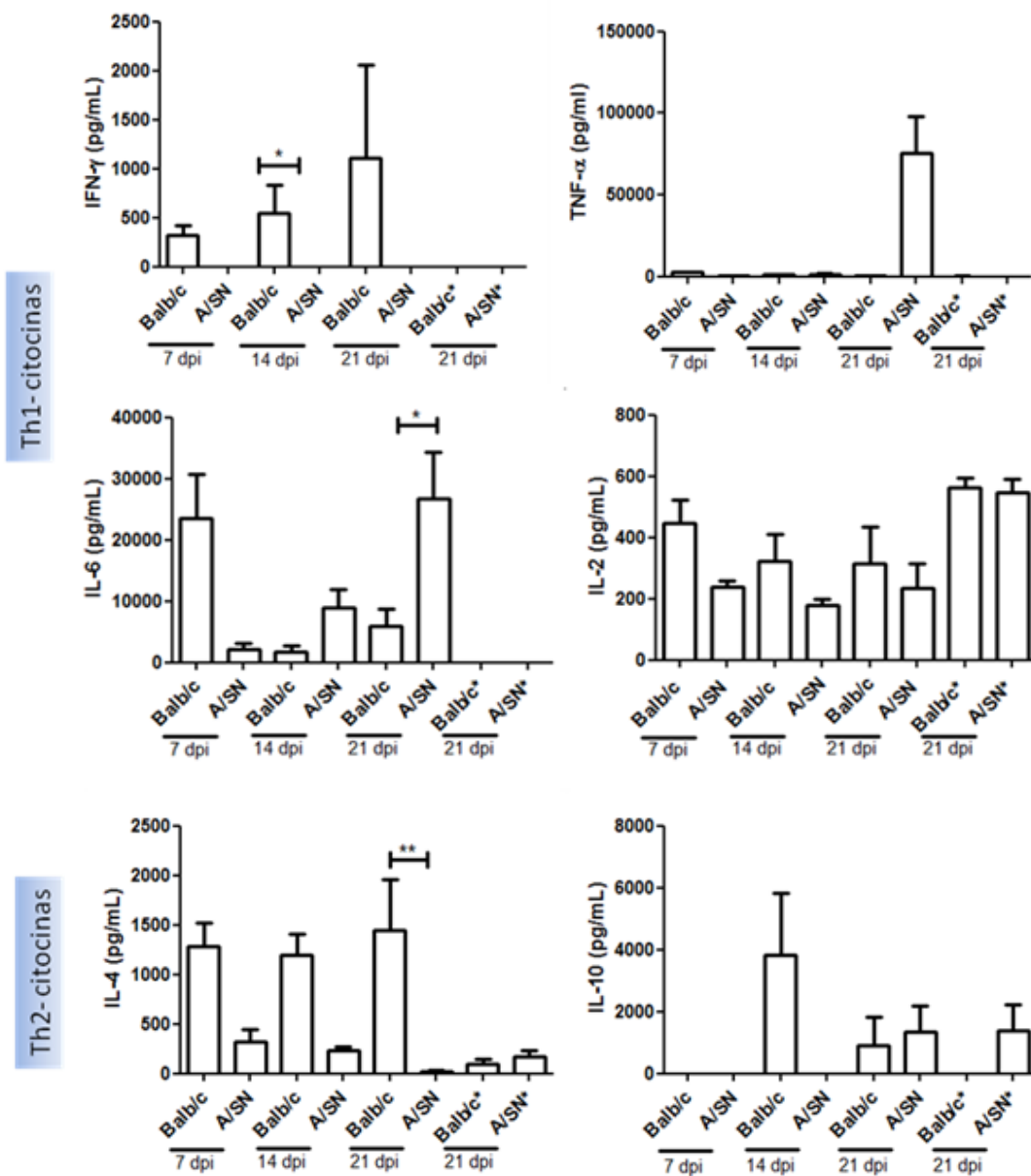


Figura 32. Concentração de citocinas em camundongos BALB/c e A/Sn infectados com *C. gattii* R265. A concentração das citocinas foi determinada em pulmões macerados aos 7, 14 e 21 dias pós infecção (dpi) ou cérebro macerado aos 21 dpi(*). Os histogramas representam média e o desvio padrão de resultados de 5 animais em cada período analisado. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2-way com post-test Dunnett) * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

A infecção com cepa H99 em camundongos BALB/c provocou a produção de citocinas Th2 e reguladoras em comparação com cepa R265 (Figura 33), tais como IL-4 e IL-10, indicando que H99 induz a uma resposta menos protetora em relação à R265. Nos camundongos infectados com cepa R265 notou-se produção de citocina Th1 – IL-6 somente no início da infecção aos 7 dpi e com excessão da IL-2, observou-se que infecção por R265 parece suprimir a resposta Th1 do hospedeiro.

A infecção com cepa H99 em camundongos A/Sn provocou maior produção de citocinas Th2 em comparação com cepa R265 (Figura 34), tais como IL-4 (aos 7 e 14 dpi) e IL-10. Nos camundongos infectados com cepa R265 notou-se produção de citocinas Th1 tais como TNF- α (21 dpi) e IL-6 (14 e 21 dpi).

A produção de citocinas em camundongos BALB/c infectados com subpopulação tolerante de *C. neoformans*, em relação à sua cepa parental, não apresentou diferença com significância estatística aos 7 dpi (Figura 35).

A produção de citocinas em camundongos BALB/c infectados com subpopulação tolerante de *C. gattii* R265 foi menor, de modo significativo, para aquelas de resposta Th1, tais como IFN- γ e TNF- α aos 7 dpi em relação a cepa parental (Figura 36).

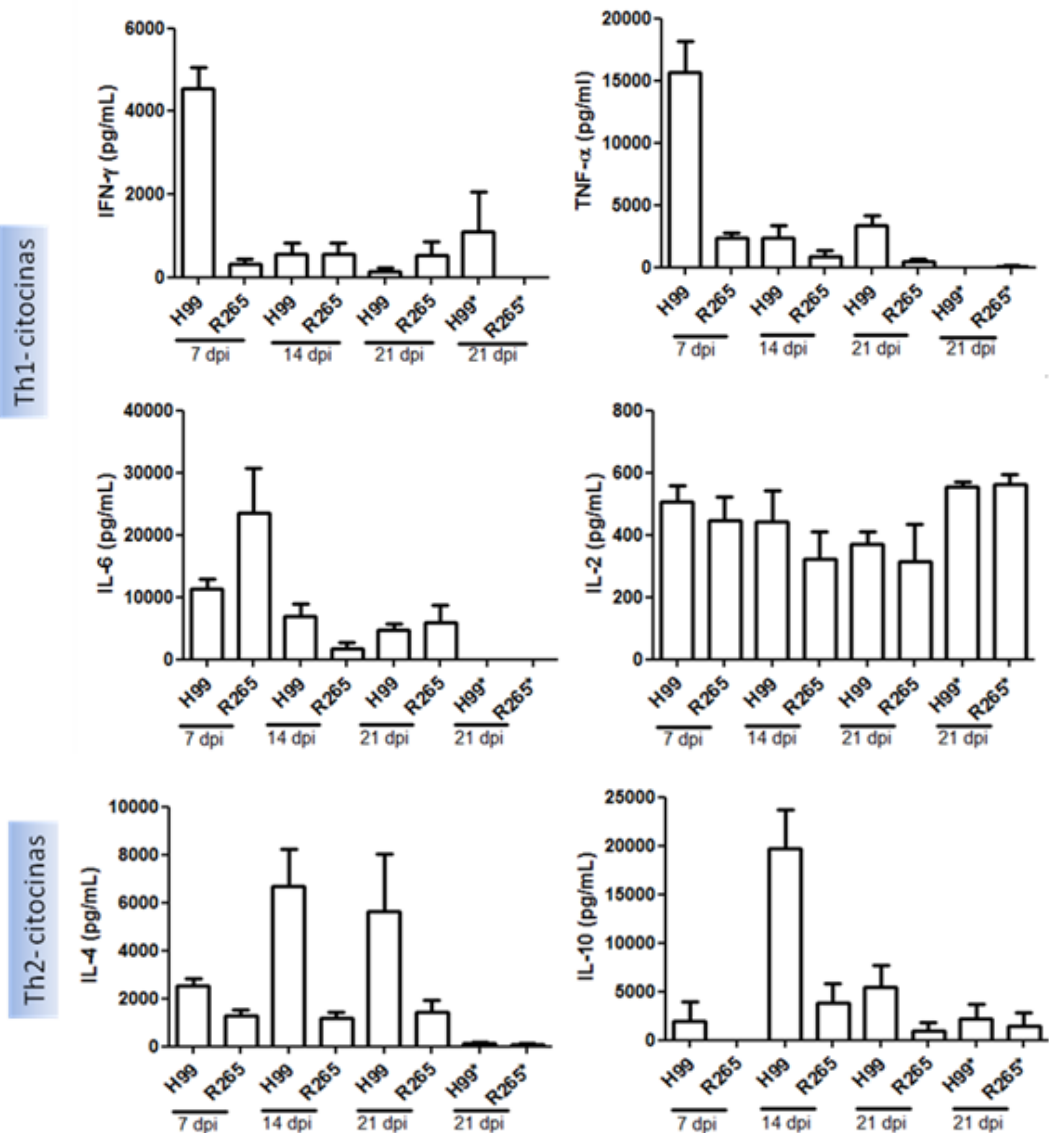


Figura 33. Concentração de citocinas em camundongos BALB/c infectados com *C. neoformans* H99 ou *C. gattii* R265. A concentração das citocinas foi determinada em pulmões macerados aos 7, 14 e 21 dias pós infecção (dpi) ou cérebro macerado aos 21 dpi (*). Os histogramas representam média e o desvio padrão de cinco diferentes animais em cada período analisado. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2-way com post-test Dunnett) * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

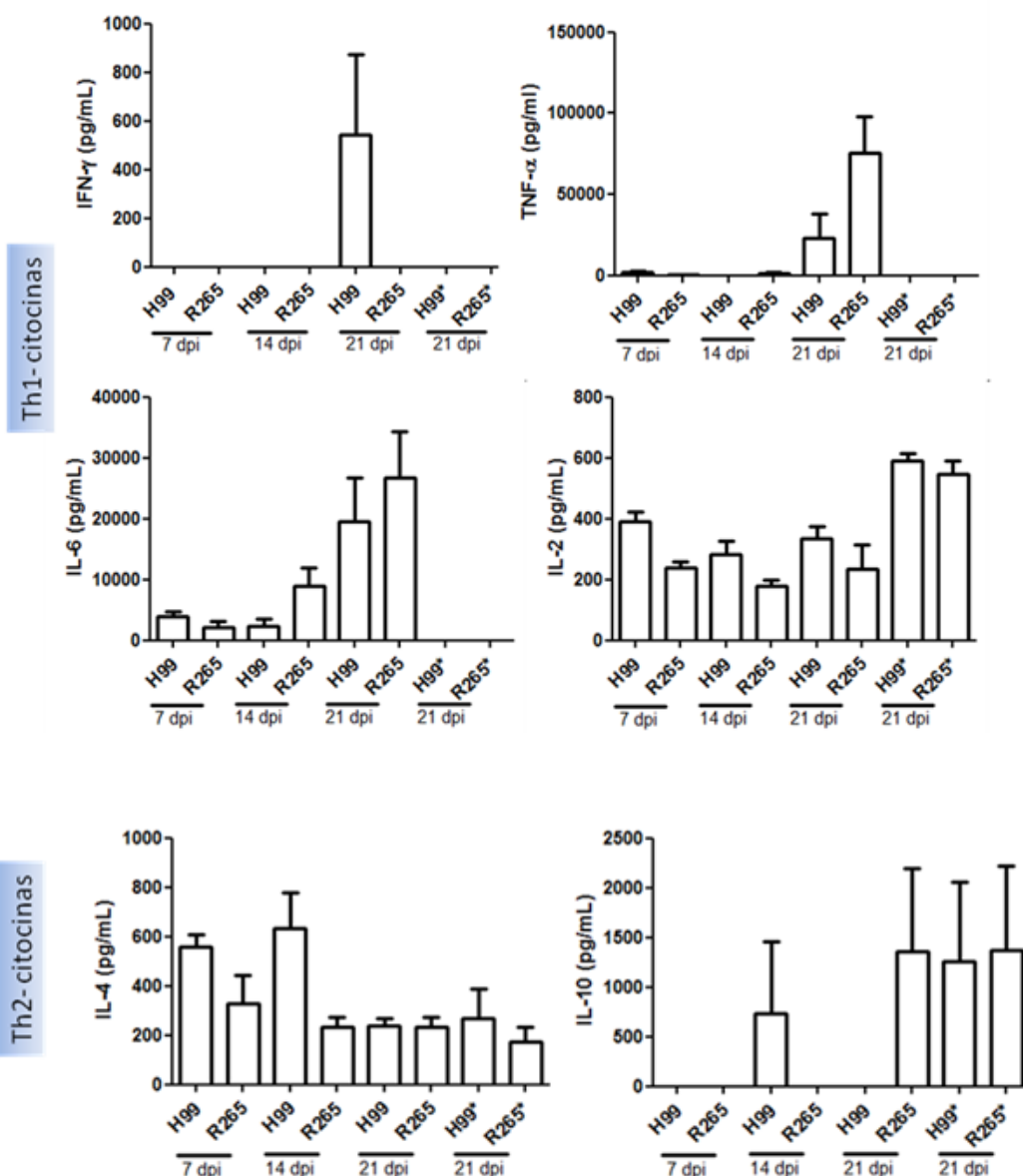


Figura 34. Concentração de citocinas em camundongos A/Sn infectados com *C. neoformans* H99 ou *C. gattii* R265. A concentração das citocinas foi determinada em pulmões macerados aos 7, 14 e 21 dias pós infecção (dpi) ou cérebro macerado aos 21 dpi (*). Os histogramas representam média e o desvio padrão de resultados de 5 animais em cada período analisado. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA 2-way com post-test Dunnett) * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

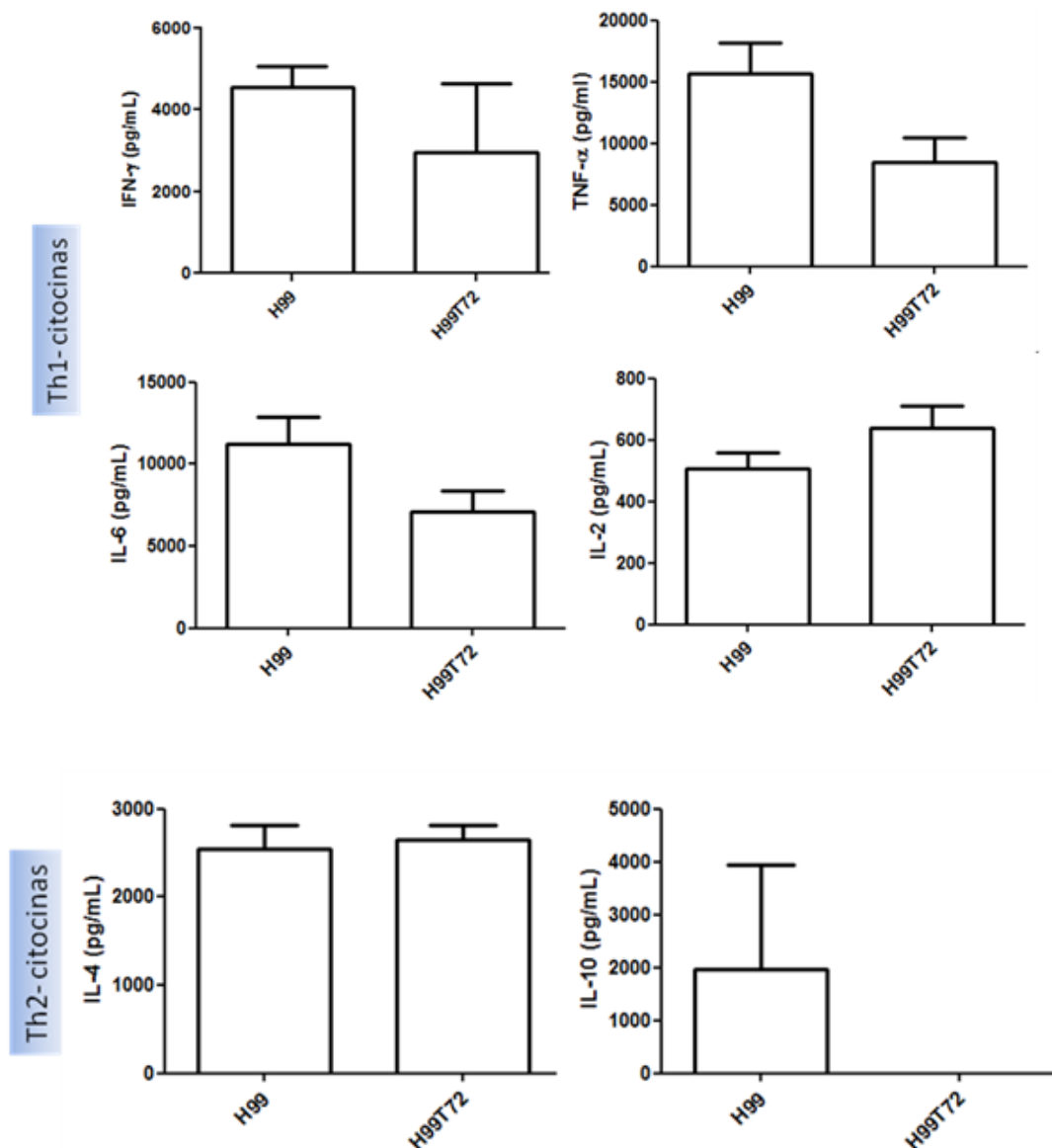


Figura 35. Concentração de citocinas em camundongos BALB/c infectados com *C. neoformans* subpopulação tolerante à AmB (H99T72) ou cepa parental H99. A concentração das citocinas foi determinada em pulmões macerados aos 7 dias pós infecção. Os histogramas representam média e o desvio padrão de resultados para 5 diferentes animais do período analisado.

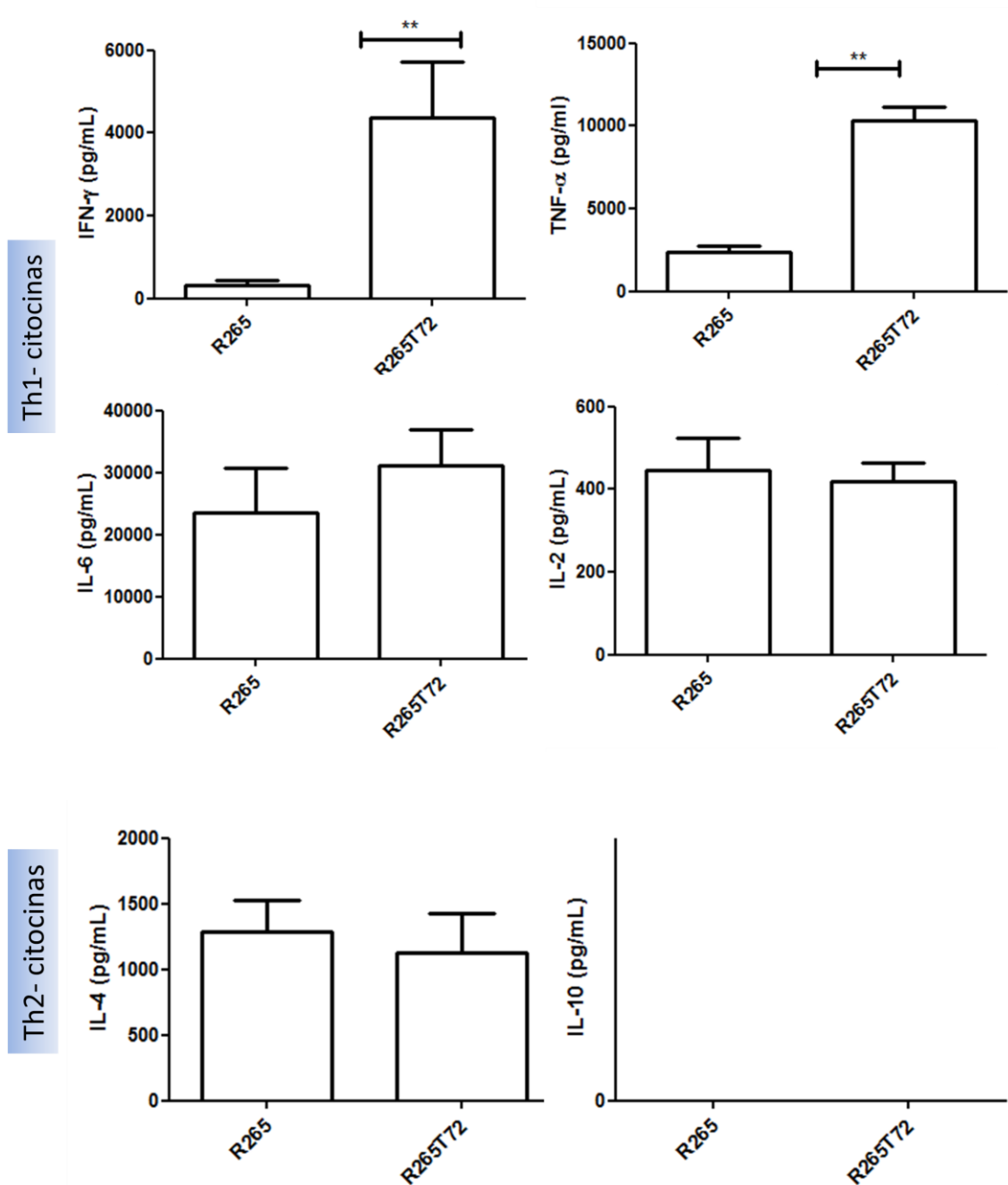


Figura 36. Concentração de citocinas em camundongos BALB/c infectados com *C. gattii* subpopulação tolerante à AmB (R265T72) ou cepa parental R265. A concentração das citocinas foi determinada em pulmões macerados aos 7 dias pós infecção. Os histogramas representam média e o desvio padrão de resultados de 5 diferentes animais do período analisado. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos ** $p < 0,001$ (test-*t*)

4.2.2.5 Avaliação de virulência e resposta a tratamento com fluconazol em infecção experimental com subpopulações heterorresistentes e cepas parentais

A subpopulação heterorresistente a fluconazol de cepa de *C. neoformans* (IAL 3066 adaptada ou heterorresistente) induziu menor carga fúngica pulmonar ($p < 0,01$), em camundongos da linhagem BALB, do que a respectiva cepa parental IAL 3066; disseminação para todos os órgãos estudados foi encontrada em camundongos infectados com cepa parental; contudo, a terapia com FLU, na concentração de 40 mg/kg/dia via intraperitonal por 7 dias consecutivos, reduziu a carga fúngica em ambas as infecções, por subpopulação tolerante ou por cepa-parental, sem diferença com significância estatística (Figura 37).

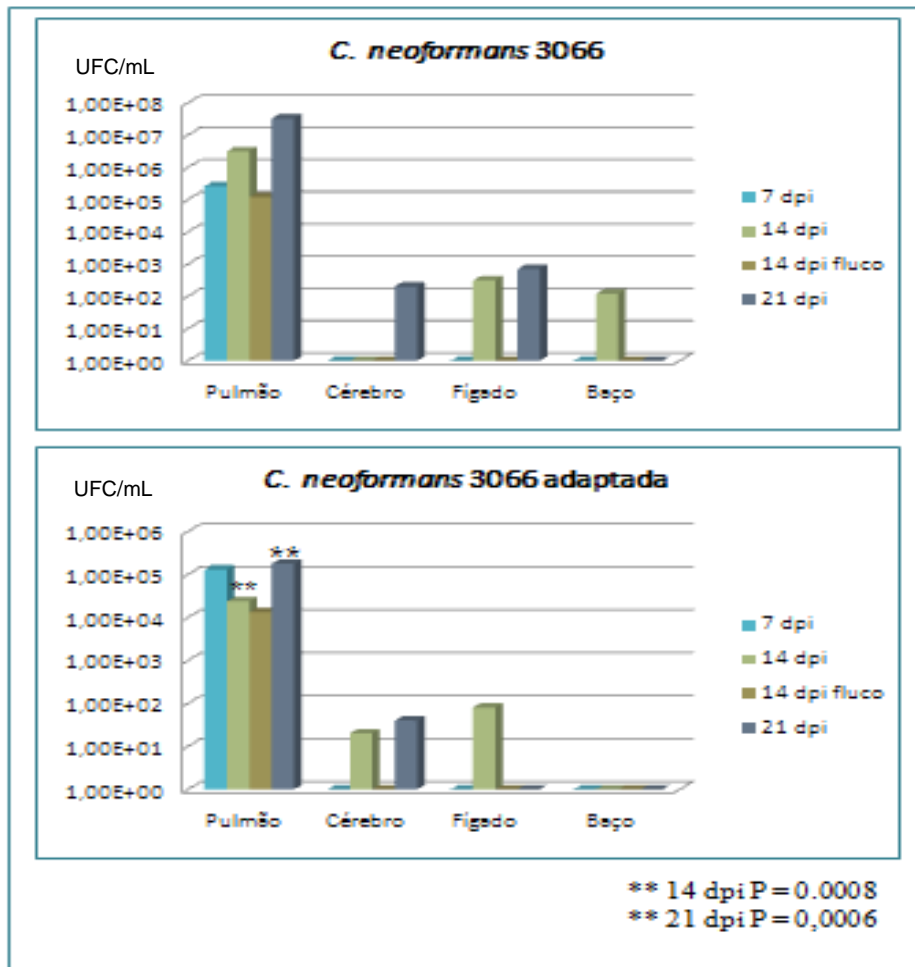


Figura 37. Carga fúngica em camundongos BALB/c infectados com subpopulação heterorresistente de *C. neoformans* (IAL 3066 adaptada) ou cepa parental 3066 (1×10^5 UFC/mL) tratados com fluconazol (40 mg/kg/dia). Os histogramas representam média de resultados de 5 animais; asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos $**p < 0,001$ (test-*t*)

5. Discussão

Esporos infecciosos de *C. neoformans* quando inalados pelo hospedeiro podem estabelecer infecção nas vias aéreas e pulmões (Lin e Heitman, 2006). Em tais locais, eles podem replicar e sobreviver quer extracelularmente, onde estão permanentemente em contato com o epitélio respiratório, ou intracelularmente, onde são absorvidos por fagócitos tais como os macrófagos alveolares (Bulmer e Tacher, 1975), células dendríticas (Syme *et al.*, 2002) e neutrófilos (Dong e Murphy, 1997). Existem muitos fatores que podem contribuir para a sobrevivência de *Cryptococcus* no pulmão, tais como a presença de cápsula, melanização e a capacidade de se comportar como um agente patogênico intracelular facultativo. A indução de múltiplas formas fenotípicas é outra característica que contribui para a evasão imunológica e sobrevivência fúngica. Neste sentido, a formação de células titans é uma característica que confere várias vantagens para a levedura.

O papel específico do epitélio respiratório durante infecção por *C. neoformans* contendo células titans não foi bem estabelecido. No entanto, os estudos mostraram que a linhagem celular epitelial bronquial humana (BEAS-2B) libera IL-8, um quimioatratador de neutrófilos, em resposta ao desafio por *C. neoformans*. No presente estudo, observamos diferenças na indução da secreção de IL-8 depende da cepa de *C. neoformans*. Altos níveis de secreção de IL-8 ocorreu na cepa *C. neoformans* contendo células titans IAL3071, mais do que na cepa altamente virulenta H99 após a estimulação das células BEAS-2B. A IL-8 foi secretada e é um importante mediador da resposta imune inata. Em adição, as culturas da cepa *C. neoformans* contendo células titans foram capazes de induzir lesões em células epiteliais brônquicas demonstrada por medição da enzima intracelular LDH em sobrenadantes de células após a incubação de células BEAS-2B, durante 24 horas. A LDH foi maior para cepas clínicas contendo células titans em comparação com a cepa H99.

Os experimentos para avaliação de ativação de macrófagos mostraram resultados interessantes. O acúmulo de nitrito nos sobrenadantes celulares foi utilizado como indicador de produção de óxido nítrico. Cepas contendo células titans de *C. neoformans* não foram capazes de ativar macrófagos da linhagem de macrófagos alveolares (MH-S) para produção significativa de óxido nítrico, após 24 horas de incubação. Óxido nítrico é uma molécula efetora com papel importante na eliminação de patógenos intracelulares (Naderer e McConville, 2008). Por outro lado, nos ensaios para determinação da capacidade de induzir morte celular de MH-S, a liberação da enzima intracelular LDH medida após incubação com *C. neoformans* durante 24 horas mostrou que tais cepas apresentam essa característica. Mais importante é notar que essas cepas foram capazes de induzir morte de macrófagos alveolares em maior proporção do que a cepa-padrão de virulência H99, empregada no estudo, confirmando a alta virulência dessa população.

Entre as cepas tolerantes à AmB, os testes com uma cepa (IAL3238) mostraram correlação positiva entre produção de IL-8 na linhagem BEAS-2B e concentração ensaiada, mas o resultado da MOI-20 mostrou desvio padrão muito alto, o que é considerado um resultado não-significativo. No que diz respeito às 2 cepas ambientais analisadas, de modo geral, estas não foram capazes de promover a liberação da interleucina proporcional à MOI utilizada.

Uma das limitações no estudo de titans é que não existem procedimentos padronizados *in vitro* para indução de formação de tais células e, desta maneira, estudos experimentais *in vivo* são obrigatórios. As larvas de insetos têm sido usadas para estudos de virulência de espécies de fungos patogênicos e representam um bom modelo de infecção pela facilidade de inoculação (Kavanagh e Fallon, 2010). Esses modelos têm sido utilizados para avaliar a virulência e/ou a atividade antifúngica. Algumas larvas de inseto servem para modelo de doenças que se disseminam através da corrente sanguínea, como *C. neoformans* levando à morte do

hospedeiro, apesar da eficácia da fagocitose (Kavanagh e Fallon 2010; Mylonakis *et al.*, 2005).

No presente estudo avaliamos infecção por *C. neoformans*, de forma inédita, duas novas larvas de insetos *Apis mellifera* e *Zophobas morio*. Após a padronização experimental em larvas de *Apis mellifera* foram realizados ensaios para avaliação da sobrevivência. A dose letal 50% foi definida 1×10^5 UFC/mL segundo estatística, curiosamente, esta dose é a mesma utilizada para testes com modelo murino de criptococose. Em adição o ensaio demonstrou que larvas de *Apis mellifera* são suscetíveis à infecção por *C. neoformans* H99. A recuperação de colônias de *C. neoformans* a partir de tecido animal foi realizada e as culturas foram mantidas em laboratório para estudo da compatibilidade com a cepa injetada, havendo total compatibilidade do perfil genético das colônias por técnica de PCR-*fingerprinting* com o primer M13.

De modo diferente do que ocorreu com larvas de *Apis mellifera* larvas *Zophobas morio* demonstraram resistência a infecção por *C. neoformans*, larvas inoculadas com alta concentração fúngica (1×10^7 UFC/mL) passaram pela metamorfose completando seu ciclo biológico de vida e não morreram. A recuperação de colônias de *C. neoformans* a partir de tecido animal foi realizada e as culturas mostraram identidade, pelo perfil em PCR-*fingerprintig*, com a cepa injetada. Este achado indica que a infecção ocorreu, porém foi debelada pelas defesas naturais do animal. Formulamos, então, a hipótese da presença de alguma substância, ou conjunto de substâncias, com poder fungicida ou fungistático. Nossos dados suportam a idéia de que larvas de *Zophobas morio* podem produzir peptídeos anti-*Cryptococcus* que levam a sobrevivência das larvas.

Galleria mellonella modelo alternativo de larvas de inseto bastante empregado em estudos de virulência na criptococose (Mylonakis *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2010; García-Rodas *et al.*, 2011). Os dados obtidos neste estudo com larvas de *Apis mellifera* indicaram correspondência com *Galleria mellonella* em relação à dose definida pelo ensaio de DL50% e também pela

sobrevida dessas larvas quando inoculadas com *C. neoformans*, ainda que a via de inoculação tenha sido distinta. Neste estudo padronizamos em larvas de *Apis mellifera* a via de inoculação oral que possui vantagens, em relação à via injetável empregada em *Galleria mellonella*. Essa via de inoculação permitiu controle da inoculação, desde que o volume de alimento inoculado foi passível de manejo, e as larvas se alimentaram de todo alimento oferecido. A via injetável pode causar trauma com a perfuração da cutícula que levaria à mortalidade. Outra vantagem de infecção em *Apis mellifera* é a incubação das larvas individuais em placas de 96 poços que facilita o manejo e incubação. A desvantagem é que larvas de *Apis mellifera* possuem alta sensibilidade à variação de temperatura, logo os ensaios com esta larva deve ser realizado nos meses quentes levando-se em conta que a temperatura da colméia é em torno de 35 °C a temperatura externa deve ser muito próxima a essa temperatura para retirada do favo e transporte até o laboratório de inoculação.

Analisou-se a morfologia das células de *C. neoformans* em lavado broncoalveolar murino pós infecção experimental. Utilizou-se para definição de "células titans" o tamanho celular delimitado pela parede de células de *C. neoformans* maior do que 10 microns (Okagaki *et al.*, 2010). Células de *C. neoformans* variam, em regra, entre 4-8 µm e, neste estudo, foram encontradas células titans após infecção murina. O presente estudo investigou cepas clínicas de *C. neoformans* produtoras de células titans durante infecção murina e sua relação com a resposta imune. O tamanho da célula de *C. neoformans* em camundongos infectados com a cepa-padrão H99, como também observado nas cepas polimórficas IAL3700 e IAL3071, foi maior do que o tamanho observado quando as cepas foram cultivadas *in vitro* em meio enriquecido. O nível de produção de células titans *in vivo* variou dependendo da cepa. Portanto, a inoculação com as cepas H99 e IAL3071 resultou em formação de células titans. Em contraste, a inoculação com a cepa IAL3700 resultou menor quantidade de formação de células titans no mesmo modelo murino.

Células titans possuem tamanho grande para serem fagocitadas nos pulmões pelas células imunitárias do hospedeiro e a produção de células titans reduz a fagocitose de células criptocócicas de tamanho normal (Okagaki e Nielsen, 2012). Células titans tem uma vantagem de sobrevivência à altos níveis de fluconazol e são resistentes ao estress oxidativo e nitrosativo semelhantes aos utilizados pelos fagócitos para matar agentes patogênicos (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). Interessante, a diversidade genômica de progênie de células titans também promove a adaptação às condições de alta-tensão (Gershtein *et al.*, 2015). Tomados em conjunto, estes dados mostram que as células titans têm características que podem promover a sobrevivência *in vivo*.

Além disso, reforçamos que o encontro de diferença na proporção de formação de células titans depende da carga fúngica nos pulmões, conforme anteriormente observado por Zaragoza e colaboradores (2010). A carga fúngica no pulmão aos 14 e 21 dias após a infecção foi significativamente maior na infecção causada pelas cepas H99 e IAL3071 do que na infecção pela cepa IAL3700. Além disso, a cepa IAL3700 não se disseminou para o cérebro.

O aumento progressivo de carga fúngica nos pulmões e disseminação para o cérebro aos 21 dias após a inoculação resultou na morte de camundongos inoculados com as cepas H99 e IAL3071, ao passo que a infecção com a cepa IAL3700 levou a uma diminuição gradual da carga fúngica pulmonar. Em adição, no grupo de camundongos infectados com *C. neoformans* cepa IAL3700, não encontramos células de levedura no cérebro 21 dias após a infecção, indicando que células de *C. neoformans* não foram capazes de disseminar para o cérebro.

A proporção de eosinófilos foi diferente nas cepas de *C. neoformans*. Foi detectada diminuição significativa na porcentagem de eosinófilos na infecção produzida pela cepa IAL3700 ($P < 0,05$) em comparação com as cepas H99 e IAL3071, fortemente indutoras de eosinofilia. Nos experimentos de Crabtree e colaboradores (2012) foi verificado que a infecção com cepas

foi associada com eosinofilia no tecido pulmonar, fato que está em acordo com os achados deste estudo (Crabtree *et al.*, 2012).

Estudos anteriores demonstraram que a depuração de *C. neoformans* depende das respostas do hospedeiro mediadas por células T CD4⁺ e CD8⁺ (Buchanan e Doyle, 2000; Huffnagle *et al.*, 1994; Moddy *et al.*, 1994; Moody *et al.*, 1990). Resposta imune do tipo Th1 em modelos de infecção de *C. neoformans* são caracterizadas por recrutamento de células T CD4⁺ e CD8⁺, a produção de citocinas Th1 [factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e interleucina-12 (IL-12)], e a formação de granulomas contendo macrófagos classicamente ativados, seguida pela depuração da infecção e resolução (Arora *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Milam *et al.*, 2007; Stenzel *et al.*, 2009). Em contraste, as respostas imunitárias do tipo Th2 é não protetora em casos de infecções por *C. neoformans*, e é caracterizada pela produção de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), eosinofilia pulmonar, ativação alternativa de macrófagos, elevação de níveis séricos da imunoglobulina E (IgE), e infecção crônica com patologia pulmonar grave (Arora *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Hernandez *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2009).

No presente estudo esses subconjuntos de linfócitos foram enumerados por citometria de fluxo. Ambos os grupos de camundongos infectados (cepas contendo células polimórficas e H99) continham números elevados de células TCD3⁺ CD4⁺. Além disso, os camundongos infectados com a cepa IAL3700 (menor quantidade de formação de células titans) mostraram aumento significativo de células TCD3⁺ CD4⁺, em comparação com os outros camundongos infectados, correlacionado com a diminuição de formação de células titans e redução significativa de UFC pulmonares. Além disso, os camundongos infectados com a cepa IAL3700 apresentaram maior produção de células TCD8⁺, em contraste camundongos infectados com a cepa IAL3071 que tinham menos células TCD8⁺, em comparação com camundongos infectados com a cepa H99. O recrutamento de células TCD4⁺ e CD8⁺ em camundongos é caracterizado com a resposta imune protetoras Th1, como ocorreu em camundongos infectados com a cepa IAL3700. A

relação entre a proporção de células titans produzidas pela cepa H99, como também demonstrado em camundongos infectados com a cepa IAL3071 correlaciona-se com as respostas imunitárias não protetora Th2. Recentemente, foi referido que a formação de células titans em *C. neoformans* depende da linhagem de camundongo e está correlacionada com a indução de respostas de tipo Th2 (Zaragoza *et al.*, 2015). Nossos resultados são consistentes de que o alargamento do corpo da célula está, diretamente, envolvido na resistência microbiana aos mecanismos celulares de defesa do hospedeiro.

Criptococose é associada com múltiplas alterações no hospedeiro, no presente estudo as alterações não ocorreram da mesma forma nas duas linhagens de camundongos estudadas BALB/c e A/Sn. Camundongos BALB/c inoculados com cepa H99 tiveram maior sobrevida do que A/Sn, ainda que, com significativa maior carga fúngica nos pulmões. Nossos dados suportam a idéia de que BALB/c é mais suscetível à infecção por cepas altamente virulentas *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 do que A/Sn. Em adição A/Sn produziu citocinas do tipo Th1 nos pulmões tais como TNF- α e IL-6 com significância estatística em comparação com BALB/c.

Em relação à *C. neoformans*, *C. gattii* causa mais frequentemente infecção pulmonar, e cepas de *C. gattii* VGII especialmente apresentam menos neurotropismo (Kwon-Chung *et al.*, 2000; Sorrel *et al.*, 2010). Esta observação clínica foi confirmada pelos nossos experimentos em modelo animal. Camundongos infectados via pulmonar com cepa *C. neoformans* H99 apresentaram morte por infecção no cérebro, enquanto aqueles infectados com *C. gattii* R265 morreram por infecção nos pulmões, em ambas linhagens estudadas BALB/c e A/Sn. Este achado também foi reportado em outra linhagem de camundongo C57BL/6 por Ngamskulrunroj e colaboradores 2012. Interessantemente, enquanto R265 apresentou disseminação extrapulmonar inferior à H99, o crescimento intrapulmonar em comparação com H99 foi superior, confirmando os achados de Cheng e colaboradores que relatam que o órgão alvo de *C. gattii* é diferente do *C. neoformans* (Cheng *et al.*, 2009).

Cheng e colaboradores 2009 reportaram que cepas de *C. gattii*, incluindo a cepa R265, induziram uma resposta inflamatória menos protetora em camundongos C57BL/6 pela supressão da migração de neutrófilos para o sítio da infecção. No mesmo trabalho Cheng relataram que cepas de *C. gattii* falham em produzir citocinas protetoras como TNF- α em comparação com *C. neoformans* H99. No presente estudo infecção por *C. neoformans* levou a um aumento na produção de citocinas Th2 em comparação com infecção por *C. gattii*, tanto em camundongos da linhagem BALB/c quanto em A/Sn. Em conjunto, nossos resultados fornecem importantes dados sobre virulência de *Cryptococcus* e ajuda a focar a atenção para a influência específica de cada espécie no recrutamento de leucócitos e na indução de resposta protetora de citocina.

Neste estudo inédito com subpopulações tolerantes à AmB foi verificado que a morte *in vitro* ($\geq 99.9\%$ de colônias mortas) não foi obtido nas 72 horas avaliadas. As células viáveis foram notadas até mesmo às 72 horas de exposição à AmB indicando ausência de ação fungicida, mensurada em tempo de morte (*time kill*, TK). Três das quatro subpopulações tolerantes à AmB sofreram uma ação fungicida moderada, no entanto o polieno foi ineficaz para promover a morte dessas subpopulações. Notou-se que uma subpopulação manteve a concentração de células estável durante todo o experimento, indicando ter maior capacidade de tolerância. A dose utilizada de AmB deoxicolato de 0,7-1,0 mg/kg/dia em apenas uma dose a concentração sérica na primeira hora após a infusão é de 1-2 mg/L e meia vida da formulação é estimada em 24-48 horas (Martinez, 2006).

No presente estudo avaliamos a virulência de subpopulação tolerante à AmB (*C. neoformans* H99T72 e *C. gattii* R265T72) em relação à cepa parental (H99 e R265). Infecção por *C. neoformans* resultou em disseminação para todos os órgãos estudados, e maior carga fúngica aos 14 dpi na subpopulação tolerante. Diferentemente, infecção por *C. gattii* resultou em maior tropismo por pulmão, indicando que o tropismo para infecção pulmonar depende da espécie e não da tolerância à AmB.

Subpopulação tolerante de ambas espécies quando tratadas levam à um aumento na sobrevivência dos animais, indicando que a virulência é atenuada quando os camundongos foram tratados, isso se deve possivelmente devido à um maior gasto de energia dessa subpopulação para sobrevivência em contato com a AmB. Nossos achados indicam que sob exposição à AmB a subpopulação tolerante parece atingir o SNC com maior facilidade em relação à sua cepa parental, aos 21 dpi em *C. neoformans* e aos 7 dpi em *C. gattii*. Esse dado sugere que se a infecção atinge o SNC e não leva a morte de camundongos aos 30 dpi a virulência da subpopulação é baixa. Esse dado é corroborado pela significância estatística na produção de citocinas do tipo Th1 tais como IFN- γ e TNF- α aos 7 dpi em camundongos infectados com *C. gattii* R265T72.

Futuros estudos poderão elucidar mecanismos de escape de *Cryptococcus* contra ação deletéria desse potente fármaco. Mesmo o modo de ação da AmB ainda é muito discutido e novos conhecimentos são adquiridos com o passar dos anos. Zaragoza e colaboradores (2005) examinaram o efeito da AmB na morfologia de *C. neoformans*, durante infecção em camundongos, observando redução da cápsula polissacarídica, bem como, diminuição sérica do antígeno polissacarídico, o que sugere um novo mecanismo de ação para esse antifúngico (Zaragoza *et al.*, 2005). No presente estudo observamos diferenças nas células de *C. neoformans* expostas a 72 horas de AmB, que pode ter influência importante na virulência dessa subpopulação.

Fluconazol é comumente usado para tratamento da criptococose, mas o encontro de cepas menos suscetível a este azol é um problema global e também dados sobre a influência do fluconazol na virulência de *C. neoformans* são escassos (Sanguinetti *et al.*, 2006; Sionov *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2014). Neste estudo avaliamos a influência de subpopulação adaptada ao fluconazol (IAL3066 adaptada) em relação à cepa parental (IAL3066) na criptococose experimental com camundongos BALB/c. Santos e colaboradores relataram que o clone adaptado ao fluconazol apresentou menor virulência em relação à cepa parental, neste estudo encontramos

menor carga fúngica nos pulmões de camundongos infectados com subpopulação adaptada ao fluconazol aos 14 e 21 dpi com significância estatística confirmando os achados de Santos e colaboradores. Em adição após terapia com 40 mg/Kg/dia por 7 dpi consecutivos não foi observada disseminação para outros órgãos 14 dpi.

Nossos resultados tem importante implicação clínica para determinar a suscetibilidade de diferentes animais para a infecção por *Cryptococcus* e prever a eficácia da terapia antifúngica. Este estudo pode contribuir para o planejamento de futuras terapias baseadas na medicina individualizada que pode contribuir para desfecho do tratamento antifúngico.

6. Conclusões

1. Larvas dos insetos *Apis mellifera* e *Zophobas morio* foram, respectivamente, suscetíveis e resistentes à infecção pela espécie mais frequente na criptococose (*C. neoformans*) podendo se constituir em modelos alternativos invertebrados para estudos de virulência, entre outros;
2. O fenômeno de tolerância *in vitro* à anfotericina B, o fármaco mais potente disponível no mercado farmacêutico atual, foi encontrado em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, sugerindo que a falha clínica na fase de indução em que se administra o polieno, ou recidivas, podem estar associadas à seleção de subpopulações resistentes de ambas as espécies dos agentes da criptococose;
3. Os ensaios *in vitro* mostraram correlação positiva, cepa-dependente, entre aumento do diâmetro celular e resposta do tipo Th2, indicando resposta não-protetiva na presença de alta formação de células titans; sugere-se que células titans sejam avaliadas em estudo clínico, como marcador de mau prognóstico em pacientes com criptococose; as subpopulações tolerantes à anfotericina B ativaram células BEAS-2B, ainda que, em diferentes níveis para citocina IL-8, indicando resposta imune não protetora e passível de disseminação, podendo ser essa formação um fator relacionado à evolução clínica;
4. A linhagem de murinos BALB/c, se comparada à A/Sn, apresentou a maior infiltrado inflamatório, menor sobrevida e maior carga fúngica, mostrando-se mais suscetível à infecção experimental, por ambas as cepas de reconhecida virulência (*C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265). Conclui-se, em vista desses dados, BALB/c para estudos de virulência e resposta do hospedeiro na criptococose experimental;
5. Em relação à *C. neoformans*, *C. gattii* causou mais, frequentemente, infecção pulmonar reforçando os diferentes aspectos de patogênese nessas espécies, com implicações no manejo clínico;

6. A formação de células titans *in vivo* provocou aumento significativo de células T CD3⁺ CD4⁺ e CD8⁺ em pulmões murinos, em relação à cepa-padrão H99, sugerindo ocorrência de ativação de resposta imune adaptativa, cuja intensidade foi modulada pela cepa infectante; a virulência, em algumas cepas contendo células titans foi similar à cepa-padrão H99, infectando com alta carga fúngica, pulmões e cérebro murino, reforçando a proposta desse fator como marcador de mau prognóstico;
7. A produção de citocinas infectados com subpopulação tolerante de *C. neoformans* H99, em relação à respectiva cepa parental H99 não apresentou significância estatística aos 7 dpi; de outro modo, a subpopulação tolerante de *C. gattii* R265 induziu menos, de modo significativo, citocinas de resposta Th1, tais como IFN- γ e TNF- α , aos 7 dpi, em relação à sua cepa parental. Estes achados indicam que o fenômeno de tolerância à anfotericina B modula a resposta imune adaptativa em infecções por *C. gattii*;
8. Os ensaios de virulência revelaram que a sobrevivência de modelos murinos infectados com a subpopulação tolerante de H99 não diferiu daquela de animais infectados com a respectiva cepa parental H99; no entanto, a carga fúngica pulmonar de murinos infectados com a subpopulação foi maior, aos 14 dpi, quando comparada àquela de animais com a cepa parental H99; o mesmo fato foi observado para murinos inoculados com subpopulação tolerante de cepa R265 e sua cepa parental R265. Este fato pode implicar em necessidade de doses terapêuticas maiores na ocorrência de cepas com capacidade de formação de subpopulações tolerantes;
9. O fenômeno de heterorresistência ao fluconazol, em cepa de *C. neoformans*, não parece estar relacionado à maior virulência em modelo murino, desde que, induziu significativa menor carga fúngica pulmonar, aos 14 e 21 dpi, em relação à carga observada na infecção provocada pela respectiva cepa parental. Além disso, esse processo não parece ter relevância na resposta terapêutica, desde que, houve

redução da carga fúngica após administração de fluconazol aos animais infectados com heterorresistente a esse fármaco, de modo semelhante como ocorreu no grupo inoculado com a correspondente cepa parental;

10. Animais infectados com subpopulações tolerantes à anfotericina B, de ambas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, quando tratados com essa medicação têm maior sobrevivência e menor carga fúngica, do que aqueles animais inoculados com as respectivas cepas parentais, indicando que o processo de tolerância não parece diminuir a eficácia do tratamento terapia com AmB em murinos inoculados com subpopulação tolerante. Outros fatores como diminuição de virulência das subpopulações e efeito da anfotericina B sobre o infiltrado inflamatório, como observado, podem explicar a melhor resposta ao tratamento. O fato do tratamento ter tido pouco impacto na redução da carga fúngica cerebral, em ambos os grupos de animais, deve ser melhor investigado.

7. Referências Bibliográficas

Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia* 2006; 161:83-91.

Abruzzo GK, Flattery AM, Gill CJ, Kong L, Smith JG, Pikounis VB *et al.* (1997) Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2333-8

Apidianakis Y, Rahme LG, Heitman J, Ausubel FM, Calderwood SB, *et al.* (2004) Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryot Cell* 3: 413–9.

Bicanic T, Wood R, Bekker LG, Darder M, Meintjes G, Harrison TS. (2005) Antiretroviral rollout, antifungal roll-back: access to treatment for cryptococcal meningitis. *Lancet Infect Dis*; 5:530.

Blasi E, Barluzzi R, Mazzolla R, Mosci P, Bistoni F. (1992) Experimental model of intracerebral infection with *Cryptococcus neoformans*: roles of phagocytes and opsonization. *Infect Immun.* 60: 3682–8.

Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, *et al.* (2001) Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 147:891–907.

Brandt, ME, Pfaller MA, Hajjeh RA, Hamill RJ, Pappas PG, Reingold AR, Rimland D, Warnock D. (2001) Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3065- 9.

Byrnes EJ III, Li W, Lewit Y, Perfect JR, Carter DA, *et al.* (2009) First Reported Case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: Implications for Travel-Associated Acquisition of an Emerging Pathogen. *PLoS ONE* 4(6): e5851.

Calvo E, Pastor FJ, Mar Rodríguez M, Pujol I and Guarro J. (2010) Antifungal Therapy in a Murine Model of Disseminated Infection by *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4074-77.

Casadevall A, Perfect JR. (1998) *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: ASM press.

Casali, AK *et al.* (2003) Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Research*, Amsterdam 3:405-15.

Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, and Kontoyianni DP. (2007) Role of mini-host models in the study of medically important fungi, *Lancet Infectious Diseases* 7:42–55.

Chen SCA, Wright LC, Golding JC, and Sorrell TC. (2000) Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* *Biochemical Journal* 347:431–9.

Cheng PY, Sham A, Kromstad JW. (2009) *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77:4284-94.

Chowdhary A, Randhawa HS, Sundar G, Kathuria S, Prakash A, Khan Z, *et al.* (2011) *In vitro* antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north western India. *J Med Microbiol* 60:961–67.

Clemons KV, Azzi R, Stevens DA. (1996) Experimental systemic cryptococcosis in scid mice. *J Med Vet Mycol* 34:331–5.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008) Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, Approved standard. Third Edition. M27-A3;28:1-25.

Cox GM, Harrison TS, McDade HC, Taborda CRP, Casadevall A and Heinrich JG. (2003) Superoxide Dismutase Influences the Virulence of

Cryptococcus neoformans by Affecting Growth within Macrophages Infect. Immun 71:173-80.

Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skags BA, Mellado E, Warnock DW *et al.* (2002) Comparative evaluation of NCCLS M27 A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother.46(11):3644-7.

De Bedout C, Ordoñez N, Gomez BL, Rodriguez MC, Arango M, Restrepo A and Castañeda E. (1999) In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *gattii*. Rev. Iberoam. Micol. 16: 36-9.

Diamond DM, Bauer M, Daniel BE, Leal MAE, Johnson D, *et al.*, (1998) Amphotericin B Colloidal Dispersion Combined with Flucytosine with or without Fluconazole for Treatment of Murine Cryptococcal Meningitis. Antimicrob Agents Chemother 42:528–33.

Dias ALT, Matsumoto FE, Melhem MSC, Silva EG, Auler ME, Siqueira AM, *et al.* (2006) Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates. Journal of Medical Microbiology 55:1693-9.

Ding JC, Bauer M, Diamond M, *et al.* (1997) Effect of severity of Meningitis on Fungicidal Activity of Flucytosine Combined with Fluconazole in a Murine Model of Cryptococcal Meningitis. Ant Agent Chemotherapy 15:89-93.

Ellis D, Marriott D, Haijeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R (2000) Epidemiology: surveillance of fungal infections. Med Mycol 38: 173–82.

Ernest E, Klepser ME, Pfaller MA. (2000) Postantifungal effects of echinocandin, azole and polyene antifungal agents *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 44:1108-11.

Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E (2006) Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity

and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. FEMS Yeast Res 6:625–35.

Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE. (2005) Comparison of Visual 24-Hour and Spectrophotometric 48-Hour MICs to CLSI Reference Microdilution MICs of Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole for *Candida* spp.: a Collaborative Study. J Clin Microbiol 43:4535-40.

Fan W, Kraus R, Boily MJ, and Heitman J. (2005) *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection Eukaryotic Cell 4:1420–33.

Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A (2001) Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. Microbiology 147: 2355–65.

Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P and Casadevall A. (2000) *Cryptococcus neoformans* Is a Facultative Intracellular Pathogen in Murine Pulmonary Infection. Infect. Immun. 68:4225-37

Feng X, Yao Z, Ren D, Liao W, Wu J. (2008) Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. FEMS Yeast Res 8:930–38.

Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, *et al.*, (2005) Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak Nature 437:1360-64.

Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E (2010) Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence 1: 475–482.

Galanis E and MacDougall L. (2010) Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. Emerging Infectious Diseases 16:251-7.

García-Rodas R, Casadevall A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O (2011) *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement and

Cellular Gigantism during *Galleria mellonella* Infection. PLoS ONE 6(9): e24485.

Goldman D, Lee SC, Casadevall A. (1994) Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat. Infect Immun. 62:4755–61.

Goldman DL, Fries BC, Franzot SP, Montella L, Casadevall A (1998) Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 14967–72.

Gomez-Lopez A, Zaragoza O, Martins MA, Melhem MC, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. (2008) In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. Clin Microbiol Infect 14:727–30.

Graybill JR, Mitchell L and Levine HB. (1978) Treatment of Experimental Murine Cryptococcosis: a Comparison of Miconazole and Amphotericin B. J Antimicrob Chemother. 13:277-83.

Graybill JR, Najvar LK, Gonzalez GM, Hernandez S, Bocanegra R. (2003) Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. J Antimicrob Chemother. 51:1373–6.

Hagen F, Illnait-Zaragozi MT, Bartlett KH, Swinne D, Geertsen E, Klaassen CH, *et al.* (2010) In vitro antifungal susceptibilities and AFLP genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. Antimicrob Agents Chemother 54:5139-45.

Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, and Casadevall A. (2011) *Cryptococcus*: From Human Pathogen to Model Yeast. Washington, D.C., ASM Press,.620pp

Huffnagle GB, Yates JL, Lipscomb MF. (1991) T cell-mediated immunity in the lung: a cryptococcus neoformans pulmonary infection model using scid and athymic nude mice. Infect Immun. 59:1423–33.

Iqbal N, Debess EE, Wohrle R, Sun B, Nett RJ, Ahlquist AM, *et al.* (2010) Correlation of genotype and in vitro susceptibilities of *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest of the United States. J Clin Microbiol 48:539-44.

Johnson E, Espinel-Ingroff A, Szekely A, Hockey H, Troke P. (2008) Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 32:511-4.

Kavanagh K. and Fallon JP. (2010) *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biology Reviews* 24:79–83.

Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Zhang T, Kinjo Y, Yara S, *et al.* (2002) Anti-CD11 b monoclonal antibody suppresses brain dissemination of *Cryptococcus neoformans* in mice. *Microbiol Immunol.* 46:181–6.

Khan ZU, Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Chandy R. (2007) Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India. *J Antimicrob Chemother* 60:312–16.

Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W (2004) A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17258–63.

Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaller MA. (1997) Growth medium effect on the antifungal activity of LY 303366. *Diag Microbiol Infect Dis* 29:227-31.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. (1998) Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1207-12.

Krockenberger MB, Malik R, Ngamskulrungraj P, Trilles L, Escandon P, *et al.*, (2010) Pathogenesis of Pulmonary *Cryptococcus gattii* Infection: A Rat Model *Mycopathologia* 170:315–30.

Rajesh K, Choe U, Harris JR, Lockhart SR, Greene JN (2013) *Cryptococcus gattii*, Florida, USA, 2011. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 19, No. 3

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. (1984) Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 120: 123–30.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. (1992) Cryptococcosis. In Kwong-Chung KJ & Bennett JE (eds.), *Medical Mycology* 1:392-446.

Kwon-Chung KJ, Sorrell TC, Dromer F, Fung E, Levitz SM. (2000) Cryptococcosis: clinical and biological aspects. *Med. Mycol.* 38 (Suppl.1):205–213.

Larsen RA, Leal ME, Chan LS. (1990) Fluconazole compared with amphotericin B plus flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in AIDS: a randomized trial. *Ann Intern Med* 113:183-7.

Lim TS, Murphy JW, Cauley LK. (1980) Host-etiological agent interactions in intranasally and intraperitoneally induced Cryptococcosis in mice. *Infect Immun.* 29:633–41.

Lima C, Vital JP. (1994) Olfactory mucosa response in guinea pigs following intranasal instillation with *Cryptococcus neoformans*. A histological and immunocytochemical study. *Mycopathologia.* 126:65–73.

MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, Kronstad JW, Morshed MG, Bartlett KH (2007) Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Infect Dis* 13:42–50.

Marriott, DJE, Hardiman R, Chen S, Harkness JL, and Pennry R. (1996) The development of amphotericin B resistant *Cryptococcus neoformans* during treatment in an Australian HIV-infected patient, abstr. 3.21. *In* 3rd International Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis.

Martins MA, Pappalardo M, Melhem MSC, Pereira-Chiocola VL. (2007) Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:777–83.

Martinez R. (2006) An update on the use of antifungal agents *J Bras Pneumol* 2006; 32:449-60

Mendes F ES, Oliveira LVN, Faria ES, Alvarenga DG, Pinto MR, Taborda CP, *et al.*, (2010) Correlation of the in vitro antifungal drug susceptibility with the in vivo activity of fluconazole in a murine model of

cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 29:1525–32.

Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda AE, Melhem MSC. (2003) IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis. 9: 189-95.

Meyer W, Trilles L. (2010) Genotyping of the *Cryptococcus neoformans* /*C. gattii* species complex. Aust Biochem 41:11-15.

Mitchel TG, Perfect JR. (1995) Cryptococcosis in the era of AIDS: 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev Washington, DC. 8:515-48.

Mody CH, Toews GB, Lipscomb MF. (1988) Cyclosporin A inhibits the growth of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. Infect Immun. 56:7–12.

Moretti ML, *et al.* (2008) Consenso em Criptococose. Relatório Técnico. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41:524-44.

Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, and Calderwood SB. (2002) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:15675–80.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, *et al.* (2005) *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. Infect Immun 73: 3842–50.

Naderer T, McConville MJ. The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol. 2008 Feb;10(2):301-8

Nemecek JC, Wuthrich M, and Klein BS. (2006) Global control of dimorphism and virulence in fungi Science 312:583–8.

Ngamskulrungrroj P, Serena C, Gilgado F, Malik R and Meyer W. (2011) Clin Microbiol Infect 17: 251–8.

Ngamskulrungrroj P, Chang Y, Sionov E and Kwon-Chung K J. (2012) The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of

Cryptococcus neoformans in a murine model. *mBio* 3(3):e00103-12. doi:10.1128/mBio.00103-12.

Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chretien F, Heitman J, *et al.*, (2010)

Pappalardo MCSM, Melhem MSC. (2003) Cryptococcosis: a review of the brasilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*;45(6):299-305.

Papparlado MCS, Szeszs MW, Martins MA, Baceti LB, Bonfietti LX, Purisco SU, *et al.* (2009) Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time–kill methodology. *Diag Microbiol Infec Dis* 64:146–51.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23(4), 525–30.

Pedroso RS, Ferreira JC, Lavrador MAS, Maffei CML, Candido RG. (2009) Evaluation of the Experimental Inoculation of *Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus laurentii* in Normal Mice: Virulence Factors and Molecular Profile Before and After Animal Passage. *Mycopathologia* 168:59–72.

Perceval AK. (1965) Experimental Cryptococcosis: hypersensitivity and immunity. *J Pathol Bacteriol.* 89:645–55.

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, *et al.* (2010) Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 50:291–322.

Perfect JR, Selwyn MD, Lang DR, Fracp MB and Durack DT, DPhil MDA. (1980) New Experimental Model in Rabbits. *Am J Pathol* 101:177-94.

Perkins A, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, and Cuenca-Estrella M. (2005) Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 1144-7.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, *et al.* (2005) Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *J Clin Microbiol* 43:2163–7.

Powderly WG, Keath EJ, Sokol-Anderson M, Robinson K, Kitz D, Little JR, and Kobayashi G. (1992). Amphotericin B-resistant *Cryptococcus neoformans* in a patient with AIDS. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 1:314–16

Powderly WG. (2000) Cryptococcal meningitis in HIV-infected patients. *Curr Infect Dis Rep.* 2:352–7.

Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. (2009) Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104:513–21.

Pukkila-Worley R, Holson E, Wagner F, and Mylonakis E. (2009) Antifungal drug discovery through the study of invertebrate model hosts *Current Medicinal Chemistry* 16:1588–95.

Rex JH, Cooper CR, Merz JR, Galgiani JN, Anaissie EJ. (1995) Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth based system. *Antimicrob Agents Chemother* 39:906-9.

Rodero L, Córdoba S, Cahn P, Hochenfellner F, Davel G, Canteros SC, Kaufman S, Guelfand L. (2000) In vitro susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with no clinical response to amphotericin B therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45:239-42.

Rodríguez-Tudela JL, Almirante B, Rodríguez-Pardo D, Laguna F, Donnelly PJ, Mouton JW, Pahissas A, *et al.* (2007) Correlation of the MIC and Dose/MIC ratio of fluconazole to the therapeutic response of patients with mucosal candidiasis and candidemia. *Agents Antimicrobiol Chemother* 51:3599-604.

Saag MS, Powderly WG, Cloud GA, Robinson P, Grieco MH, Sharkey PK, *et al.* (1992) Comparacion of amphotericin B with fluconazol in the treatment of acute AIDS- associated cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and the AIDS Clinical Trials Group. *Eng J Med* 326: 83-9

Sabiiti W, May RC, and Pursall ER. (2012) Experimental Models of Cryptococcosis. *International Journal of Microbiology* 2012: 1-10.

Sanguinetti M, Posteraro B, La Sorda M, Torelli R, Fiori B, *et al.* (2006) Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the *in vivo* response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 74:1352–1359.

Santos JRA, Holanda RA, Frases S, Bravim M, Araujo GdS, *et al.* (2014) Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. *PLoS ONE* 9(11): e112669. doi:10.1371/journal.pone.0112669

Sar B, Monchy D, Vann M, Keo C, Sarthou JL, Buisson Y. (2004) Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *cryptococcus neoformans* cambodian isolates: April 2000–March 2002. *J Antimicrob Chemother.* 54:563–5.

Schwarz P, Dromer F, Lortholary O and Dannaoui E. (2006) Efficacy of Amphotericin B in Combination with Flucytosine against Flucytosine-Susceptible or Flucytosine-Resistant Isolates of *Cryptococcus neoformans* during Disseminated Murine Cryptococcosis. *Antimicrobiol Agents Chemother* 50:113-20.

Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ (2009) Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2804–2815.

Silva DC, Martins MA, Szeszs MW, Bonfietti LX, Matos D, Melhem MSC. (2012) Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. *Diag Microb and Infec Disease* 72:332–9.

Silva EG, Baroni FA, Viani FC, Ruiz LS, Granda RF, *et al.*, (2006) Virulence profile of strains of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* evaluated by experimental infection in BALB/c mice and correlation with exoenzyme activity. *Journal of Medical Microbiology* 55:139–42.

Silva EG, Paula CR, Dias ALT, Chang M R, Ruiz LS, Gambale V, *et al.* (2011) Combination Efficacy of Voriconazole and Amphotericin B in the

Experimental Disease in Immunodeficient Mice Caused by Fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 171:261–6.

Sionov E, Chang YC, Garraffo HM and Kwon-Chung KJ. (2009) Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Is Intrinsic and Associated with Virulence. *Antimicrobiol Agents Chemother* 53:2804–15.

Sorrell TC, Chen SCA, Phillips P, Marr KA. (2010) Clinical perspectives on *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: implications for diagnosis and management, p 595–606. In Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A (ed), *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM Press, Washington, DC.

Smith NH, Graviss EA, Hashmey R, Lozano-Chiu M, Rex JH, Hamill R, and Greenberg S. (1997) Multi-drug-resistant cryptococcal meningitis in an AIDS patient, abstr. 529. In 35th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America.

Sorrell, TC. (2001) *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 39:155-68.

Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, and Casadevall A. (2003) *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infection and Immunity* 9:4862– 72.

Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A (2004) Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 72: 3478–3488.

Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15245–50.

Swanson MS and Hammer BK. (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages *Annual Review of Microbiology* 54:567–613.

Tay ST, Tanty HT, Ng KP, Rohani MY, Hamimah H (2006) In vitro susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. *Mycoses* 49:324–30.

Thompson GR, Fothergill AW, Wiederhold NP, Vallor AC, Wickes BL, and Patterson TF. (2009). Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 309-311.

Thompson GR, Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra R, Kirkpatrick WR. (2012) A murine model of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. *J Antimicrob Chemother* 60:1-7.

Trilles L, Lazera M, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, *et al.* (2008) Regional pattern of the molecular type of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 5:455–62.

Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazera M. (2011) Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex [published online ahead of print 23 Aug] *Med Mycol.*

Varma A, Kwon-Chung KJ. (2010) Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 54 : 2303 – 11.

Vu K. and Gelli A. (2010) Astemizole and an analogue promote fungicidal activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*. *Medical Mycology* 48: 255–62.

Wiles S, William PH, Frankel G, Robertson B. (2006) Modelling infectious diseases-time to think outside the box? *Nat. Rev. Microbiol.* 4:307-12.

Zak O, O' Reilly T. (1993) Animal infections models and ethics-the perfect infection models *J. Antimicro. Chemother New York* V. 31 193-205.

Zaragoza O, Garcia-Rodas R, Nosanchuk J, Cuenca-Estrella M, Luis J, *et al.*, (2010) Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. *PLoS Pathog* 6(6): e1000945.

Zaragoza O, Alvarez M, Telzak A, Rivera J, and Casadevall A. (2007) The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus*

neoformans infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. *Infection and Immunity* 75:2729–39.

Zaragoza O, Mesa-Arango AC, Gómez-Lopez A, Bernal-Martínez L, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. (2011) Process Analysis of Variables for Standardization of Antifungal Susceptibility Testing of Non-Fermentative Yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:1563-70.

Zaragoza O, Mihu C, Casadevall A, Nosanchuk JD. (2005) Effect of amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection. *Antimicrob. Agents Chemother* 49:4358-61.

Anexo 1



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ / INSTITUTO PASTEUR
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



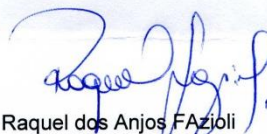
São Paulo, 04 de outubro de 2013.

Parecer Projeto 03/2013 – CEUA IAL/Pasteur

Vimos pelo presente informar que o projeto de pesquisa “**Avaliação de isolados polimórficos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* tolerantes a anfotericina B em modelos de camundongos e alternativo**”, sob coordenação da Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, Pesquisadora Científica do Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz - Central e CLR Rio Claro, foi considerado **APROVADO**, e poderá ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários e permitindo também a elaboração de relatórios anuais que são realizados por esta CEUA e que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,


Raquel dos Anjos FAZÍOLI
Coordenadora
CEUA-IAL

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 355
11º Andar – Salas 1102 – Cerqueira César
São Paulo – SP – CEP: 01246-902
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br