

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

**Estudo da interação entre três diferentes reinos: entendendo a
complexidade de co-infecções entre bactérias e o fungo
Cryptococcus gattii em modelo murino**

ELÚZIA CASTRO PERES EMIDIO

BELO HORIZONTE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ELÚZIA CASTRO PERES EMIDIO

**Estudo da interação entre três diferentes reinos: entendendo a
complexidade de co-infecções entre bactérias e o fungo
Cryptococcus gattii em modelo murino**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas com ênfase em Microbiologia.

Orientador:

Professor Dr. Daniel de Assis Santos
(Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG)

Co-orientadora:

Dra. Marliete Carvalho da Costa
(Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG)

BELO HORIZONTE

2020

- 043 Emídio, Elúzia Castro Peres.
Estudo da interação entre três diferentes reinos: entendendo a complexidade de co-infecções entre bactérias e o fungo *Cryptococcus gattii* em modelo murinho [manuscrito] / Elúzia Castro Peres Emídio. – 2020.
173 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Professor Dr. Daniel de Assis. Co-orientadora: Dra. Marliete Carvalho da Costa.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Criptococose. 3. *Cryptococcus gattii*. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. Coinfecção. 6. *Pseudomonas aeruginosa*. I. Assis, Daniel de. II. Costa, Marliete Carvalho da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada por Fabiane C M Reis CRB 6 2680



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE **ELÚZIA CASTRO PERES EMÍDIO**
Nº REGISTRO: 2016711315

Às 14:00 horas do dia 17 de dezembro de 2020, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs.: Carlos Pelleschi Taborda, Kelly Ishida, Rafael Wesley Bastos, Nalu Teixeira de Aguiar Peres e o Prof. Daniel de Assis Santos – Orientador, para julgar o trabalho final “Estudo da interação entre três diferentes reinos: entendendo a complexidade de co-infecções entre bactérias e o fungo *Cryptococcus gattii* em modelo murino”, da aluna **Elúzia Castro Peres Emídio**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2020. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

Profa. Dra. Kelly Ishida

Prof. Dr. Rafael Wesley Bastos

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos (Orientador)

Profa. Betânia Paiva Drumond
Sub-coordenadora

“Nada é tão nosso como os nossos sonhos”.
(Friedrich Nietzsche)

AGRADECIMENTOS

Muito obrigada Senhor, meu Pai Maior! Muito obrigada Querido Amigo e Mestre Jesus! Muito obrigada aos amigos espirituais que me amparam nessa caminhada!

Está finalizando mais uma etapa em minha vida! E hoje, acho que compreendo melhor sobre “as belezas do caminho serem mais interessantes que o alívio da chegada”. Como essa caminhada me fortaleceu... tenho tanto a agradecer, que não sei como traduzir esse sentimento em palavras...

Vou tentar de forma bem mineira! Por partes!

Com profundo amor, respeito e admiração gostaria de agradecer...

Ao meu companheiro de vida, meu marido Gustavo, pelo abrigo de todas as horas. Sem o seu apoio esse sonho não estaria se realizando! Meus filhos Lucas e Camila, meus amores, minhas alegrias, vocês são minha maior motivação!

Muita gratidão ao meu orientador professor Dr. Daniel. A oportunidade de ser sua aluna de doutorado foi um presente de inestimável valor que Deus me concedeu! Fomos amigos de graduação, somos amigos de quase uma vida toda! Acompanhar um pouco da sua trajetória na pesquisa reforçou minha admiração pela sua dedicação e lealdade. Muito obrigada pela paciência, pela generosidade, pelos exemplos, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela confiança e por todo aprendizado!

Aos amigos do laboratório de micologia, profissionais e pessoas excepcionais, a convivência com vocês durante esse tempo foi muito enriquecedora e alegre! Agradeço de forma muito especial aos amigos que colaboraram diretamente, abraçando a execução dos experimentos com muita força de vontade e dedicação! Esse trabalho não existiria sem vocês!

Ao querido amigo Gustavo Freitas (Guga!), muito obrigada pelo apoio e companheirismo! As queridas amigas Noelly Queiroz, Lívia Silva e Ludmila Gouveia, pelo apoio e grande disponibilidade em ajudar sempre! Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis! Dra Marliete Carvalho, minha co-orientadora, pelos ensinamentos e bons momentos que passamos juntas! Aos

queridos professores: Dra Maria Aparecida Stoianoff, Cida!, Dr. Douglas Boniek, Dra Nalu Peres e Dr. Ary Côrrea.

Aos professores colaboradores Dra Danielle Souza, Dr Caio Fagundes, Dra Tatiane Paixão, Dra Alessandra Saliba, muito obrigada pela colaboração e disponibilidade!

Aos colegas da pós-graduação, em especial, Camila Brito e Raquel Arifa pela imensa colaboração!

Gostaria também de lembrar de alguns professores que foram muito importantes na minha formação profissional e na minha vida! Dr. Vicente Toledo, Dra Tânia Mara Dabés, Dr Carlos Taborda, Dra Raquel Vilela, Dra Simone Martins Gonçalves, Dr Euripedes Alvarenga, Dra Rossimiriam Freitas. Esses grandes mestres passaram pela minha vida e deixaram uma luz muito intensa!

Muita gratidão ao meu pai, José Galvão, partiu tão cedo, nos faz tanta falta, “és, parte ainda, do que me faz forte”! Minha mãe Elúzia, sempre ao meu lado, muito obrigada por tudo mãe! Meus irmãos Bruno e Renata, Sabrina e Renato, meus grandes amigos! À tia Zilda, meus sobrinhos, tios, primos, cunhados, aos queridos Lalado e Wanda, a todos, minha gratidão pela família que formamos, pelas oportunidades de crescimento.

Muita gratidão aos meus amigos! Minha família da Casa Espírita Simão Pedro, que me sustentam na caminhada! Amigos são bálsamos! Pedacos de nossos corações! Alguns não poderia deixar de citar! A turma dos arianos, elite do AE!, minhas meninas Raquel e Flávia, minha Bela, Lê minha comadre, Wdielly minha irmã! Aos queridos Dr Gino Freddy Quinteros e Dra Jaqueline Costa, por sempre me acolherem com tanto amor e me colocarem no eixo! Pelo menos tentam! A todos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim! Muito obrigada de todo meu coração!

Aos professores da banca examinadora por gentilmente aceitarem o convite! Dr. Carlos Taborda, Dr. Rafael Bastos, Dra Kelly Ishida, Dra Nalu Peres e Dra Ludmila Baltazar.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A criptococose é uma micose causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, considerada mundialmente como a quinta doença infecciosa mais letal. Pode ocorrer concomitantemente com outros patógenos, caracterizando uma coinfeção. *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) e *Staphylococcus aureus* (Sa) são patógenos oportunistas, causadores de pneumonias. Neste trabalho foi avaliada a progressão da criptococose murina causada por *C. gattii* (Cg) durante coinfeção com Pa e coinfeção com Sa. Análises *in vitro* mostraram que produtos secretados por diferentes cepas de Pa apresentaram uma atividade inibitória sobre o crescimento de Cg, o mesmo não ocorreu quando Sa foi testado. Análises *in vivo*, avaliando o perfil de morbimortalidade de animais coinfectados com Pa X Cg e Sa X Cg, mostraram um atraso na letalidade dos animais previamente infectados com uma das bactérias (grupos Pa+Cg ou Sa+Cg) quando comparados com os animais infectados somente com Cg. Essas alterações podem ser explicadas pela redução da carga fúngica nos pulmões observadas nos grupos Pa+Cg ou Sa+Cg, o que levou a um atraso na translocação de Cg para o SNC. Na coinfeção com Pa, esses achados foram associados ao aumento no recrutamento de macrófagos e neutrófilos produtores de iNOS no pulmão, além de mediadores como IL-1 β , CXCL-1 e IL-10, resultando em maior atividade fungicida de macrófagos. O papel da enzima iNOS no processo foi confirmado quando o fenótipo protetivo de Pa foi revertido nos animais tratados com um inibidor da enzima. Na coinfeção com Sa, também foi observado alteração no perfil de recrutamento celular nos pulmões. Esses dados revelaram que a alteração do ambiente de instalação inicial de Cg, dificultou a disseminação e a transmigração do fungo para o SNC.

Palavras-chave: Criptococose; Coinfeção; *Cryptococcus gattii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a mycosis caused by yeasts of the genus *Cryptococcus*, Considered worldwide as the fifth most lethal infectious disease. It can occur concurrently with other pathogens, characterizing co-infection. *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) and *Staphylococcus aureus* (Sa) are opportunistic pathogens, causing pneumonia. In this work, the progression of murine cryptococcosis caused by *C. gattii* (Cg) was evaluated during co-infection with Pa and co-infection with Sa. In vitro analyzes showed that products secreted by different strains of Pa showed an inhibitory activity on the growth of Cg, the same did not occur when Sa was tested. In vivo analyzes, evaluating the morbidity and mortality profile of animals co-infected with Pa X Cg and Sa X Cg, showed a delay in the lethality of animals previously infected with one of the bacteria (Pa + Cg or Sa + Cg groups) when compared with infected animals only with Cg. These changes can be explained by the reduction of the fungal load in the lungs observed in the Pa + Cg or Sa + Cg groups, which led to a delay in the translocation of Cg to the CNS. In co-infection with Pa, these findings were associated with increased recruitment of macrophages and neutrophils producing iNOS in the lung, in addition to mediators such as IL-1 β , CXCL-1 and IL-10, resulting in greater macrophage fungicidal activity. The role of the iNOS enzyme in the process was confirmed when the protective phenotype of Pa was reversed in animals treated with an enzyme inhibitor. In Sa co-infection, changes in the cellular recruitment profile in the lungs were also observed. These data revealed that the alteration of the initial Cg installation environment, hindered the spread and transmigration of the fungus to the CNS.

Keywords: Cryptococcosis; Coinfection; *Cryptococcus gattii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg- Microgramas

µl- Microlitros

µm- Micrômetro

µM- Micromolar

AIDS- Sigla do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

ANOVA- Análise de variância

ASD- Agar Sabouraud Dextrose

BBB- Sigla do inglês, *blood-brain barrier* – barreira hematoencefálica

BMDMs- Sigla do inglês, *Bone marrow derived macrophages*

BSA- Sigla do inglês, *Bovine Serum Albumin*

cm- Centímetro

Cg- *Cryptococcus gattii*

Cn- *Cryptococcus neoformans*

CO₂- Dióxido de Carbono

CXCL-1- Sigla do inglês, *C-X-C motif ligand 1*

DCs Sigla do inglês, Dendritic cells

DMSO- Dimetilsulfóxido

DMEM- Sigla do inglês, *Dulbeccos completa Modified Eagle Médium*

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA- ácido egtazico

ELISA- Sigla do inglês, *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

EUA- Estados Unidos da América

GalXM- Galactoxilomanana

GXM- Glucuronoxilomanana

HE- Hematoxilina-Eosina

HBEC- Células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (hCMEC/D3)

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

IFN- Interferon

IL- Interleucina

Kg- Quilograma

KOH- Hidróxido de potássio

LBA- Lavado Broncoalvelar

mg- Miligramas

mL- Mililitros

MPO- Mieloperoxidase

MOI- Sigla do inglês, *multiplicity of infection*

NAG- Sigla do inglês, N-acetylglucosaminidase

NK- Sigla do inglês, *Natural Killer cells*

NO- Sigla do inglês, *Nitric oxide*

PBS- Sigla do inglês, *Phosphate buffered saline*

PER- Peroxidases

pH- Potencial hidrogeniônico

PRN- Peroxinitrito

ROS- Sigla do inglês, *Reactive Oxygen Species*

RPMI- Sigla do inglês, *Roswell Park Memorial Institute médium*

SHIRPA- *SmithKline Beecham Pharmaceuticals/ Harwell MRC Mouse Genome Centre/ ImperialCollege/ Royal London Hospital/ Phenotype Assessment*

SNC- Sistema nervoso central

SOD1- Superóxido dismutase

Th- Sigla do inglês, *T helper*

TLR- Sigla do inglês, *Toll Like Receptor*

TNF- α - Sigla do inglês, *Tumor Necrosis Factor-alpha*

UFC- Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de infecção de <i>Cryptococcus</i>	26
Figura 2: Principais fatores de virulência envolvidos no processo da patogênese de <i>Cryptococcus</i>	31
Figura 3: Mecanismos de transmigração de <i>Cryptococcus</i> para o SNC.	33
Figura 4: Principais fatores de virulência, produzidos por <i>P. aeruginosa</i> , envolvidos nos mecanismos de patogênese.....	51
Figura 5: Aderência de <i>S. aureus</i> a <i>C. neoformans</i>	56
Figura 6: Principais fatores de virulência, produzidos por <i>S. aureus</i>	63
Figura 7: Esquema do ensaio de fagocitose realizado <i>in vitro</i> com macrófagos (BMDMs)	77
Figura 8: Ensaio realizado <i>in vitro</i> com macrófagos (BMDMs), para avaliar a taxa de proliferação intracelular das leveduras (IPR).....	78
Figura 9: Representação esquemática dos regimes de coinfeção com <i>P. aeruginosa</i>	84
Figura 10: Representação esquemática dos regimes de coinfeção com <i>S. aureus</i>	85
Figura 11: Perfil de inibição de <i>C. gattii</i> (L27/01) durante co-cultivo com <i>P. aeruginosa</i> ATCC-27853.....	94
Figura 12: Perfil de inibição de diferentes cepas <i>Cryptococcus</i> durante co-cultivo com diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i>	95
Figura 13: Atividade antagonista de metabólitos secretados por diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> (Pa (ATCC27853), PAK, PA103, PAO1), inibindo o crescimento de <i>C. gattii</i> (L27/01 e R265) e de <i>C. neoformans</i> (H99).....	96
Figura 14: Atividade antagonista de metabólitos secretados por diferentes cepas mutantes de <i>P. aeruginosa</i> (PAK Δ exoS e Pa103 Δ exoU), inibindo o crescimento de <i>C. gattii</i> (L27/01 e R265) e de <i>C. neoformans</i> (H99).....	97
Figura 15: Atividade antagonista de metabólitos secretados por diferentes cepas mutantes de <i>P. aeruginosa</i>	99
Figura 16: Crescimento de <i>C. gattii</i> em sobrenadantes de culturas de diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> (Pa – ATCC27853, PAO1, PAK e PA103) e Sobrevida de camundongos infectados com diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i>	101

Figura 17: Atividade inibitória da Piocianina® - extraída de <i>P. aeruginosa</i> e comercializada por Sigma-Aldrich - frente a três diferentes cepas de <i>Cryptococcus</i>	103
Figura 18: Sobrevida e morbidade de camundongos infectados com inóculos variáveis (10^9 , 10^7 e 10^5 UFC) de Pa..	104
Figura 19: Cinética de eliminação bacteriana em órgãos de camundongos infectados via intranasal com 10^5 UFC de <i>P. aeruginosa</i> (Pa) e sacrificados 1, 3, 6, 10 e 15 DPI.	106
Figura 20: Morbimortalidade e avaliação do perfil comportamental dos animais (protocolo SHIRPA) infectados com Cg ou coinfetados com PA.....	109
Figura 21: Mensuração da carga fúngica nos órgãos alvos – pulmões (A), cérebro (B) e LBA (C) de camundongos coinfetados	112
Figura 22: Análise histopatológica dos pulmões de camundongos coinfetados, com 10^5 UFC de Pa via intranasal e 10^4 leveduras viáveis de Cg via intratraqueal..	114
Figura 23: Curvas de Sobrevidas.	117
Figura 24: Ensaio de fagocitose <i>in vitro</i> , proliferação intracelular (IPR) e produção de espécies reativas (ROS e PRN) – realizados sob estímulo de <i>P. aeruginosa</i> (Pa _{30min} e Pa _{30min} +Cg) e realizados na presença de <i>P. aeruginosa</i> (Pa e Pa+Cg).	122
Figura 25: Ensaio de fagocitose <i>in vitro</i> , proliferação intracelular (IPR) e produção de espécies reativas (ROS e PRN) – realizados com <i>P. aeruginosa</i> (Pa) inativada pelo calor (<i>heat killed</i> – HK) - PaHK.....	124
Figura 26: Quantificação de espécies reativas de oxigênio - ROS (A) e nitrogênio - PRN (B) no LBA de animais infectados com <i>P. aeruginosa</i> (Pa).....	125
Figura 27: Análise de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar	128
Figura 28: Recrutamento de células nos pulmões dos animais coinfetados com <i>P. aeruginosa</i> (Pa) e <i>C. gattii</i> (Cg) e curva de sobrevida dos animais coinfetados e tratados com droga inibidora da enzima óxido nítrico sintase induzível (INIB iNOS).	131
Figura 29: Avaliação da atividade antagonista pela técnica <i>spot on the lawn</i> (SaxCg).....	134
Figura 30: Cultivo de <i>C. gattii</i> L27/01 em sobrenadante de cultura de <i>S. aureus</i> (ATCC 33591).	135

Figura 31: Sobrevida e morbidade de camundongos infectados com inóculos variáveis (10^9 , 10^7 e 10^5) de Sa.	136
Figura 32: Cinética de eliminação bacteriana em órgãos de camundongos infectados via intranasal com 10^7 UFC de <i>S. aureus</i> e sacrificados 1, 4, 7, 10 e 15 DPI.	137
Figura 33: Morbimortalidade de camundongos infectados com Cg ou coinfectedados com Sa e avaliação do perfil comportamental (SHIRPA).	139
Figura 34: Mensuração da carga fúngica nos órgãos alvos - pulmão, cérebro e LBA - e análise do perfil de células no LBA (lavado bronco alveolar).	142
Figura 35: Análise histopatológica dos pulmões de camundongos coinfectedados, com 10^7 UFC de Sa via intranasal e 10^4 leveduras viáveis de Cg via intratraqueal.	144
Figura 36: Curvas de Sobrevidas SaxCg.	147
Figura 37: Ensaio de fagocitose <i>in vitro</i> , proliferação intracelular (IPR) e produção de espécies reativas (ROS e PRN) – realizados na presença de <i>S. aureus</i> (Sa e Sa+Cg) e realizados com <i>S. aureus</i> (Sa) inativada pelo calor (<i>heat killed</i> – HK) - SaHK.	149
Figura 38: Análise de NAG e MPO no tecido pulmonar.	151

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 <i>Cryptococcus</i> e a Criptococose.....	23
2.1.1 Principais fatores de virulência e mecanismos de patogênese envolvidos nas infecções do trato respiratório causadas por <i>Cryptococcus</i>	27
2.1.2 Disseminação e entrada no SNC.....	32
2.1.3 Resposta imune respiratória frente a <i>Cryptococcus</i>	33
2.1.4 Tratamento da criptococose	35
2.2 Coinfecções ou Doenças Polimicrobianas	36
2.3 Interações entre microorganismos nas coinfecções	40
2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e Infecções das Vias Aéreas	41
2.4.1 Principais fatores de virulência e mecanismos de patogênese envolvidos nas infecções do trato respiratório causadas por <i>P. aeruginosa</i>	44
2.4.2 Resposta imune respiratória frente a <i>P. aeruginosa</i>	53
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> e Infecções das Vias Aéreas.....	55
2.5.1 Principais fatores de virulência e mecanismos de patogênese envolvidos nas infecções do trato respiratório causadas por <i>S. aureus</i>	58
2.5.2 Resposta imune respiratória frente a <i>S. aureus</i>	64
3 OBJETIVOS	66
3.1 Geral:	66
3.2 Específicos:.....	66
3.2.1 <i>P. aeruginosa X C. gattii</i>	66
3.2.2 <i>S. aureus X C. gattii</i>	67
4 MATERIAIS E MÉTODOS	68

4.1 Manutenção de <i>C. gattii</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	68
Ensaio <i>in vitro</i>	69
4.2 Determinação <i>in vitro</i> da atividade inibitória de metabólitos secretados por diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> contra <i>Cryptococcus</i>	69
4.2.1 Preparo dos inóculos bacterianos e fúngicos	69
4.2.2 Método de antagonismo de <i>spot-on-the-lawn</i>	69
4.3 Co-cultivo entre cepas de <i>P. aeruginosa</i> x <i>Cryptococcus</i> spp. e <i>S. aureus</i> x <i>C. gattii</i>	70
4.3.1 Preparo dos inóculos bacteriano e fúngico para co-cultivo.....	70
4.3.2 Co-cultivo entre <i>P. aeruginosa</i> e <i>Cryptococcus</i>	71
4.3.3 Co-cultivo entre <i>S. aureus</i> e <i>C. gattii</i>	71
4.4 Cultivo de <i>C. gattii</i> L27/01 em sobrenadantes de culturas de diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> (Pa – ATCC27853, PAO1, PAK e PA103) e <i>S. aureus</i> (Sa - ATCC33591)	72
4.5 Avaliação da susceptibilidade a piocianina	72
4.5.1 Diluição da Piocianina.....	73
4.5.2 Preparo do inóculo.....	73
4.5.3 Leitura e interpretação dos resultados da CIM	74
4.6 Curva de crescimento em concentrações subinibitórias de piocianina ...	74
4.7 Ensaio de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação de espécies reativas (ROS e PRN).....	75
4.7.1 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs).....	75
4.7.2 Ensaio de fagocitose.....	76
4.7.3 Proliferação Intracelular IPR	77
4.7.4 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN) no ensaio de fagocitose.....	78
Ensaio <i>in vivo</i>	79
4. 8 Animais Experimentais.....	79

4.9 Isolados Utilizados	80
4.10 Escolha do inóculo bacteriano para experimentos de co-infecção.....	80
4.11 Preparo de inóculo bacteriano e infecção intranasal.....	80
4.12 Análise da cinética de eliminação bacteriana nos pulmões (<i>P. aeruginosa</i> - Pa e <i>S. aureus</i> - Sa)	81
4.13 Preparo de inóculo e infecção intratraqueal com <i>C. gattii</i>	82
4.14 Análise de sobrevivência dos animais coinfectedados e análise comportamental (SHIRPA)	83
4.15 Quantificação das cargas fúngica e bacteriana em órgãos alvos (LBA, pulmão e cérebro) e avaliação do perfil de recrutamento celular no LBA.	86
4.16 Quantificação do estresse oxidativo em células de lavado bronco alveolar (LBA) de animais infectados com <i>P. aeruginosa</i> – ROS e PRN <i>in vivo</i>	87
4.17 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) e Atividade de N- acetilglicosaminidase (NAG) nos tecidos infectados.....	88
4.18 Quantificação da concentração de citocinas e quimiocinas nos pulmões dos animais coinfectedados com Pa e Cg	90
4.19 Citometria de fluxo	91
4.20 Análise de sobrevivência dos animais coinfectedados com <i>P. aeruginosa</i> e <i>C.</i> <i>gattii</i> e tratados com inibidor da enzima óxido nítrico sintase (iNOS)	92
4.21 Análise Estatística dos Dados.....	92
Tópico I: <i>Cryptococcus gattii</i> X <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93
5 Resultados e Discussão - PaXCg	93
5.1 Determinação <i>in vitro</i> da atividade inibitória de diferentes cepas de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> contra <i>Cryptococcus</i>	93
5.1.1 Co-cultivo.....	93
5.1.2 Atividade inibitória de metabólitos secretados por <i>P. aeruginosa</i> contra <i>Cryptococcus</i>	95
5.1.3 Atividade inibitória da piocianina secretada por <i>P. aeruginosa</i> contra <i>Cryptococcus</i>	102

5.2 Análise de sobrevivência de camundongos infectados com Pa (ATCC27853)	103
5.3 Cinética de eliminação de <i>P. aeruginosa</i> (Pa)	104
5.4 Análise de sobrevivência dos animais coinfetados e análise comportamental (SHIRPA)	107
5.5 Quantificação da carga fúngica em órgãos alvos (pulmão, cérebro e LBA) - Avaliação do perfil de células no LBA - Histopatologia	110
5.6 Análise de sobrevivência dos animais coinfetados com Pa inativada pelo calor (HK: <i>Heat Killed</i>) e com Pa em diferentes dias antes da infecção com <i>C. gattii</i>	115
5.7 Determinação <i>in vitro</i> da influência de <i>P. aeruginosa</i> (ATCC-27853) na fagocitose de <i>C. gattii</i> (L27/01) por macrófagos derivados de medula óssea - Ensaio de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação do estresse oxidativo (ROS, PRN)	118
5.8 Quantificação do estresse oxidativo em células de LBA de animais infectados com <i>P. aeruginosa</i> – ROS e PRN <i>in vivo</i>	125
5.9 Análise de mediadores inflamatórios, NAG, MPO e citocinas, nos pulmões dos animais coinfetados	126
5.10 Análise do perfil de recrutamento celular por citometria de fluxo nos lavados bronco-alveolares (LBA) dos animais coinfetados com <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. gattii</i> . Análise de sobrevivência dos animais tratados com inibidor de iNOS	129
6 Sumário dos Resultados – Pa X Cg	132
Tópico II: <i>Cryptococcus gattii</i> X <i>Staphylococcus aureus</i>	134
7 Resultados e Discussão - SaXCg	134
7.1 Determinação <i>in vitro</i> da atividade de produtos secretados por <i>S. aureus</i> contra <i>Cryptococcus</i>	134
7.2 Análise de sobrevivência dos animais infectados somente com a Sa (ATCC33591)	135
7.3 Cinética de eliminação de <i>S. aureus</i> (Sa)	136

7.4 Análise de sobrevivência dos animais coinfetados e análise comportamental (SHIRPA)	138
7.5 Mensuração da carga fúngica nos órgãos alvos – pulmões, cérebro e LBA – 1, 3, 10 e 18 dias após inoculação de Cg e análise do perfil de recrutamento celular no LBA.....	140
7.6 Análise de sobrevivência dos animais coinfetados com Sa inativada pelo calor (HK: <i>Heat Killed</i>) e com Sa em diferentes dias antes da infecção com <i>C. gattii</i>	145
7.7 Determinação <i>in vitro</i> da influência de <i>S. aureus</i> (ATCC-33591) na fagocitose de <i>C. gattii</i> (L27/01) por macrófagos derivados de medula óssea - Ensaio de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação do estresse oxidativo (ROS, PRN).....	148
7.8 Análise NAG, MPO nos pulmões dos animais coinfetados.	151
8 Sumário dos Resultados – Sa X Cg	152
9 CONCLUSÕES	153
BIBLIOGRAFIA	154
ANEXO 1	171
Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais.....	171
CEUA 77/2018	171

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho avaliou a influência das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na progressão da criptococose causada por *Cryptococcus gattii*, em modelo murino, com perspectivas de ampliar o conhecimento sobre a patogênese da doença, investigar a influência dessas bactérias no mecanismo de disseminação do fungo para o SNC e ampliar a compreensão das possíveis interações entre esses patógenos *in vivo*.

Os potenciais patógenos envolvidos neste estudo são capazes de colonizar os pulmões e o sistema nervoso central, que constituem nichos comuns para esses microorganismos, predispondo a ocorrência de coinfeções entre esses agentes infecciosos. Também é importante considerar que os microorganismos existem em comunidades complexas, repletas de interações que podem ser antagônicas ou sinérgicas e que influenciam na evolução do patógeno. Ainda é muito pouco conhecido como as bactérias interagem com patógenos fúngicos no ambiente e em hospedeiros humanos.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria, que semelhante a *Cryptococcus*, está presente nos mais variados ambientes e atua como um patógeno oportunista, sendo importante agente causador de pneumonias em pacientes imunocomprometidos e portadores de doenças pulmonares crônicas. É capaz de secretar toxinas importantes na patogenicidade e que, *in vitro*, apresentam poder de inibição do crescimento de *Cryptococcus*. *Staphylococcus aureus* é um patógeno oportunista e resiliente, capaz de colonizar as superfícies de mucosas, sendo as narinas um dos principais reservatórios desse agente causador de inúmeras infecções graves, inclusive pneumonias. Além disso, *S. aureus* se destaca como um dos principais agentes coinfectantes envolvidos em doenças polimicrobianas. Também apresenta, *in vitro*, capacidade de inibição do crescimento de *Cryptococcus*, dependente de contato célula-célula.

Estudos dessa natureza, que visam ampliar o conhecimento das interações entre um ou mais patógenos e o hospedeiro, se tornam ainda mais relevantes com o avanço de tratamentos de alta complexidade, como transplantes, terapias antineoplásicas, antiretrovirais, e imunossupressoras, que

apesar de aumentarem as perspectivas de vida dos pacientes, muitas vezes têm como efeito colateral uma maior predisposição a infecções oportunistas, e, não raro, causadas por um ou mais agentes etiológicos. Assim, o estudo realizado neste trabalho espera contribuir como base para novas pesquisas que visam elucidar novos alvos para drogas antifúngicas e/ou imunoterapias alternativas. Além disso, é importante a comunidade científica atentar para possíveis casos de coinfeções subdiagnosticados, propondo novos protocolos diagnósticos, uma vez que os pacientes susceptíveis, normalmente se encontram em uso de terapia medicamentosa, inclusive antimicrobianos, o que poderia mascarar o diagnóstico de um dos patógenos associados no processo infeccioso.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Cryptococcus* e a Criptococose

A criptococose é uma micose sistêmica, granulomatosa e invasiva, que afeta primordialmente os pulmões, podendo também atingir o SNC, provocando meningoencefalite. É causada por leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus* que se encontram globalmente distribuídas. *Cryptococcus* apresenta mais de 80 espécies de leveduras e fazem parte do filo *Basidiomycota*. Entretanto, até o momento, duas espécies, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, se destacam como agentes etiológicos mais comuns desta doença (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; MAY et al., 2016).

A criptococose ainda está associada a pacientes imunocomprometidos, incluindo pacientes HIV positivos, transplantados, portadores de neoplasias em uso de quimioterápicos ou agentes imunomoduladores como corticosteroides e pacientes com doença hematológica grave. Entretanto, tanto *C. neoformans* como *C. gattii* podem causar doença em indivíduos hígidos; de forma que vários estudos epidemiológicos mostraram que *C. gattii* infecta predominantemente indivíduos hígidos, independentemente da localização geográfica, sendo considerado um patógeno primário emergente (JAVIER et al., 2012; KRONSTAD et al., 2011; MAY et al., 2016; PERFECT, 2012).

Em números absolutos, a criptococose é classificada como a quinta doença infecciosa mais letal, atrás apenas da AIDS, tuberculose, malária e diarreia (RODRIGUES, 2018). A meningite criptocócica é considerada critério definidor de AIDS, por ser a infecção fúngica que afeta o SNC mais comum e a terceira complicação neurológica mais frequente em pacientes com AIDS e, de modo geral, continua sendo a segunda causa mais comum de mortalidade nesses pacientes, perdendo apenas para tuberculose. Estimativas recentes apontam para uma incidência global de meningite criptocócica anual em torno de 223 mil casos, resultando, no ano de 2014, em 181.100 mortes. O maior número de casos ocorre na África Subsariana, onde foi estimado uma mortalidade de 73% no mesmo período. Entretanto, continua sendo uma doença mais que negligenciada, não sendo sequer formalmente reconhecida pela

Organização Mundial de Saúde (OMS) e outros órgãos competentes como uma doença tropical negligenciada. Além disso, como não ocorre notificação compulsória, essas estimativas podem estar subestimadas (COGLIATI, 2013; MOLLOY et al., 2017; RAJASINGHAM et al., 2017; RODRIGUES, 2018).

Na América Latina essa micose tem morbidade e mortalidade significativas, com mais de 5.000 indivíduos afetados com meningite criptocócica e cerca de 2.400 mortes anuais, representando o terceiro maior número de casos no mundo. Brasil e Colômbia destacam-se como os países com maior incidência, seguido pela Argentina e pelo México. No Brasil, a criptococose está entre as micoses sistêmicas que causa o maior número de mortes em pacientes com HIV, sendo classificada como a décima terceira causa de morte. Estudos epidemiológicos realizados com a população geral do estado do Rio de Janeiro relataram uma incidência anual média de 4,5 casos de meningite criptocócica por milhão de habitantes (FIRACATIVE et al., 2018; PRADO et al., 2009).

De acordo com a nomenclatura convencional, *C. neoformans* era classificado em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) e três variedades: *C. neoformans var. neoformans* (Sorotipo D), *C. neoformans var. grubii* (sorotipo A), e *C. neoformans var. gattii* (sorotipos B e C). Cada sorotipo foi caracterizado com base nas diferenças estruturais e específicas do polissacarídeo glucuronoxilomanano (GXM), que constitui o principal componente da cápsula. Entretanto, na última década, várias técnicas de biologia molecular foram utilizadas para genotipar e estudar a epidemiologia de *C. neoformans*. Por meio desses estudos moleculares e filogenéticos, uma nova classificação foi estabelecida, elevando *C. neoformans var. gattii* ao nível de espécie, passando a ser denominado *C. gattii*. Sendo então reclassificados como: *C. neoformans var. neoformans* (Sorotipos D e A/D), *C. neoformans var. grubii* (sorotipo A), e *C. gattii* (sorotipos B e C). *C. gattii* também difere de *C. neoformans* com relação às características fenotípicas, ao habitat natural, à epidemiologia, e com relação a manifestações clínicas da doença e resposta ao tratamento com antifúngicos (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011; MA; MAY, 2009; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

O complexo de espécies *C. neoformans* – *C. gattii* é ainda dividido em nove tipos moleculares ou genótipos: *C. neoformans var. grubii* corresponde aos

tipos moleculares VNI, VNII e VNB; *C. neoformans var. neoformans* corresponde ao genótipo VNIV e o híbrido A/D corresponde ao tipo molecular VNIII. Já a espécie *C. gattii* corresponde a quatro tipos moleculares distintos: VGI, VGII, VGIII e VGIV, nos quais, VGI e VGII são os tipos moleculares mais prevalentes, enquanto, VGIII e VGIV são mais raros (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011; ENGELTHALER et al., 2014; MA; MAY, 2009; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Nos últimos anos, análises filogenéticas, estudos de genotipagem e de espectrometria de massa MALDI-TOF revelaram diferenças genéticas significativas dentro do complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii*. Baseado nessas análises, alguns autores propuseram uma nova classificação dentro desse complexo, reconhecendo *C. neoformans var. grubii* e *C. neoformans var. neoformans* como espécies separadas, sendo consideradas *C. neoformans* e *C. deneoformans*, respectivamente; e cinco espécies dentro do complexo *C. gattii* (*C. gattii* (VG I), *C. deuterogattii* (VG II), *C. bacillisporus* (VG III), *C. tetragattii* (VG IV), *C. decagattii* (VG IV / VG IIIc)). Entretanto, essa nova classificação ainda está sendo discutida, prevalecendo até o momento, a designação clássica que agrupa essas leveduras em duas espécies (HAGEN et al., 2015; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

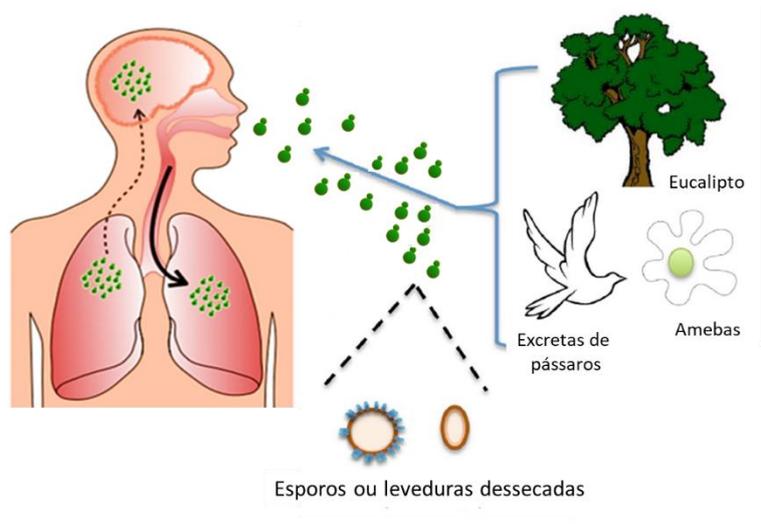
Este fungo é um patógeno amplamente distribuído em todas as regiões do mundo. Acreditava-se que *C. gattii* era uma espécie restrita a regiões tropicais e subtropicais, mas, em 1999, a ocorrência de um surto de infecção causada por *C. gattii* na ilha de Vancouver no Canadá mostrou a ampliação da área geográfica, do nicho, deste patógeno também para regiões temperadas. Além disso, os híbridos interespecies entre *C. neoformans* e *C. gattii* foram encontrados na Colômbia, Brasil, Índia e países baixos (COGLIATI, 2013; MA; MAY, 2009).

Esporos de *C. neoformans* podem ser encontrados nas fezes das aves ou solo, enquanto *C. gattii* está mais associado com plantas. Até o momento, 54 espécies de árvores que crescem globalmente são consideradas hospedeiras de *C. gattii*, sendo consideradas espécies hospedeiras dominantes o eucalipto australiano e amendoeiras, comuns em regiões tropicais e semi-tropicais, e mais recentemente o *Pinho Oregon* (*Pseudotsuga menziesii*) comum em regiões de clima mais moderado (BIELSKA; MAY, 2016; MA; MAY, 2009). Além disso,

Cryptococcus pode também ser encontrado no interior de amebas de vida livre ou nematóides, o que sustenta uma hipótese atual de que espécies de *C. gattii* e *C. neoformans* tenham desenvolvido fatores de virulência favoráveis à infecção em mamíferos a partir dessas interações com esses micróbios predadores ambientais (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; MAGDITCH et al., 2012).

Acredita-se que a infecção por *Cryptococcus* inicia-se pela inalação de basidiósporos ou leveduras dessecadas, denominados propágulos infecciosos, que se depositam nos alvéolos pulmonares, onde podem se reproduzir e alcançar a corrente sanguínea, disseminando para outros órgãos, predominantemente o SNC. Após a infecção este patógeno pode causar infecção latente ou doença aguda. As manifestações clínicas iniciais do hospedeiro estão diretamente relacionadas ao tamanho do inóculo e virulência do isolado, assim como o sexo, status imune e idade do hospedeiro (BIELSKA; MAY, 2016; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A figura 1 apresenta uma ilustração esquemática do processo de infecção de *Cryptococcus*



Fonte: Adaptado de Coelho, Bocca and Casadeval, 2014; Bielska and May, 2016.

Figura 1: Processo de infecção de *Cryptococcus*. *Cryptococcus* pode ser encontrado no ambiente, associados árvores, solo, excrementos de aves e amebas. A infecção ocorre quando esporos e/ou leveduras dessecadas são inaladas. Nos pulmões, os fungos inalados são depositados nos alvéolos pulmonares onde podem se reproduzir, alcançar a corrente sanguínea e se disseminar para outros órgãos, inclusive o SNC, causando a forma mais grave da doença, a meningoencefalite (BIELSKA; MAY, 2016; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

As manifestações clínicas causadas por *C. gattii* diferem dependendo do genótipo do isolado. Por exemplo, infecção causada pelo genótipo VGI normalmente se apresenta com doença do SNC, incluindo granulomas (criptococomas) e muitas vezes com lesões simultâneas de pulmão. Por outro lado, a infecção por VGII mais comumente se apresenta como doença pulmonar. Ambos os tipos moleculares de *C. gattii* tem uma predileção para hospedeiros imunocompetentes. Em contraste, o tipo molecular VGIII foi encontrado em uma série de pacientes infectados pelo HIV no sul da Califórnia, e VGIV foi identificado na África também associada com pacientes com AIDS. Já *C. neoformans* é conhecido por infectar principalmente imunossuprimidos, em especial pacientes HIV positivos. O sorotipo A é predominante, sendo responsável por 95% de todas as infecções causadas por *C. neoformans* (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; MA; MAY, 2009). Entretanto, estudos mais recentes vêm mostrando que *C. neoformans* e *C. gattii* usam mecanismos especializados para se adaptar ao hospedeiro mamífero e, portanto, podem ser considerados patógenos primários e não oportunistas (KRONSTAD et al., 2011).

2.1.1 Principais fatores de virulência e mecanismos de patogênese envolvidos nas infecções do trato respiratório causadas por *Cryptococcus*

As espécies *C. gattii* e *C. neoformans* expressam o mesmo conjunto dos principais fatores de virulência, que são necessários para a sobrevivência do fungo no meio ambiente e/ou no hospedeiro mamífero. Os principais são: a cápsula polissacarídica, a capacidade de crescer a 37°C, a atividade de lacase, que é responsável pela produção de melanina, e a secreção de enzimas extracelulares como a fosfolipase B (Plb1), urease, superóxido dismutase (SOD1), peroxidases (PER) (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015; CHEN; MEYER; SORRELL, 2014).

Também compartilham funções relacionadas à virulência, como genes adicionais, fatores de transcrição e vias de sinalização que respondem aos estresses do ambiente, garantindo a integridade da parede celular, permitindo adaptações durante situações de hipóxia, alterações da osmolaridade, determinantes da proliferação e do metabolismo no hospedeiro, transporte

intracelular e sensoriamento de pH do meio, regulação e absorção de ferro e cobre e metabolismo do zinco (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014).

Outra função associada a virulência é a capacidade de reprodução sexuada ou *mating type*. Assim, *mating* ou o desenvolvimento sexual controla a formação de esporos infecciosos, e a inalação de esporos confere vantagens para o fungo no processo inicial da infecção, quando comparado com a infecção iniciada por inalação de leveduras dessecadas. Os esporos apresentam maior resistência à dessecação, altas temperaturas e estresse oxidativo, sendo mais resistentes às condições do ambiente. Além disso, os esporos interagem de forma diferente com os macrófagos do hospedeiro, sendo capazes de germinar e crescer dentro das células fagocíticas (BIELSKA; MAY, 2016; KRONSTAD et al., 2011; MAZIARZ; PERFECT, 2016). *Mating type* também está associado ao aumento na produção de células titânicas ou gigantes, que podem atingir até 100 μm de diâmetro nos pulmões, em contraste com células de tamanho típico de 5-7 μm , e estão associadas a uma maior sobrevivência dos fungos e, possivelmente, ao estado de latência (ZARAGOZA; NIELSEN, 2013).

A capacidade de crescer em temperaturas fisiológicas, 37°C, é essencial para a virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*. Todos os mutantes que demonstram um fenótipo sensível à temperatura de 37°C são avirulentos e incapazes de causar infecção em modelos de mamíferos (PERFECT, 2005).

A cápsula é composta por 90-95% de glucuronoxilomanano (GXM) e 5% de galactoxilomanano (GalXM). GXM é um grande polímero com uma estrutura de repetição de α -1,3-manose e com ramificações de β -D-xilopiranosil, β -D-glucuronosil e 6-o-acetil. Diferenças nesta estrutura determinam os diferentes sorotipos de *C. neoformans* e *C. gattii*, pois são reconhecidas por anticorpos distintos (MA; MAY, 2009). É considerada o principal fator de virulência, de modo que mutantes desprovidos de cápsula são avirulentos e não são capazes de sobreviver e replicar no interior de macrófagos (GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2012; ZARAGOZA et al., 2008).

Assim, a cápsula interfere com a resposta imune do hospedeiro em vários níveis: apresenta propriedades antifagocíticas, inibe a produção de anticorpos, leva à depleção de fatores do complemento, inibe a migração de leucócitos,

atrasa a maturação e a ativação de células dendríticas, e, também, confere resistência em condições de estresse, tais como desidratação, proteção contra radicais livres e compostos antimicrobianos (MA; MAY, 2009; ZARAGOZA, 2011). Com relação às propriedades antifagocíticas, a cápsula atua como uma barreira física, dificultando o reconhecimento de receptores de células fagocitárias com os epítomos da parede celular fúngica. Além disso, o polissacarídeo capsular também pode se ligar aos receptores CD14 e *toll-like* (TLR –do inglês: *toll-like receptors* /receptores do tipo *Toll*) 2 e 4, produzindo a translocação de NFκB para o núcleo e, conseqüentemente, inibindo a secreção de TNFα (Fator de necrose tumoral-alfa), o que gera uma ativação deficiente dos macrófagos. Em adição a este mecanismo, a cápsula também pode induzir a expressão do Fas ligante (Fas - do inglês - *associated death domain* / Domínio de morte associado) na superfície dos macrófagos, que por sua vez induz a apoptose de células T e de macrófagos (GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2012).

Outra característica importante da cápsula é a sua capacidade de alterar seu tamanho de acordo com as condições do ambiente. Durante o processo infeccioso a cápsula pode sofrer um aumento/alargamento significativo que também impacta na interação com os macrófagos, favorecendo o escape do fungo da morte celular, diminuindo sua susceptibilidade aos radicais livres e peptídeos antimicrobianos, protegendo contra as condições de estresse do fagolisossomo (ZARAGOZA et al., 2008).

A enzima lacase é outro fator que participa e contribui no mecanismo de escape do fungo. As lacases pertencem ao grupo das fenoloxidasas e catalisam a oxidação de uma grande variedade de compostos fenólicos e aminas aromáticas. São sintetizadas intracelularmente e transportadas através de vesículas para a parede celular, onde interagem com substrato de melanização, as catecolaminas por exemplo, produzindo grânulos de melanina, que ficam sustentados pelos polissacarídeos da parede celular. Muitos estudos apontam para o aumento da expressão de lacase em resposta aos mecanismos de defesa do hospedeiro (EISENMAN; CASADEVALL, 2012; GIARDINA et al., 2010; PISCITELLI et al., 2011).

As melaninas apresentam muitas propriedades que contribuem para a sobrevivência do fungo no ambiente e no hospedeiro, com relação à patogênese

da criptococose, destaca-se a proteção contra a fagocitose e contra o ataque oxidativo das células fagocíticas, contribuindo para a disseminação extrapulmonar da doença. Além disso, apresenta propriedades imunomoduladoras, alterando ou até mesmo inibindo a produção de citocinas (EISENMAN; CASADEVALL, 2012; MEDNICK; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2005).

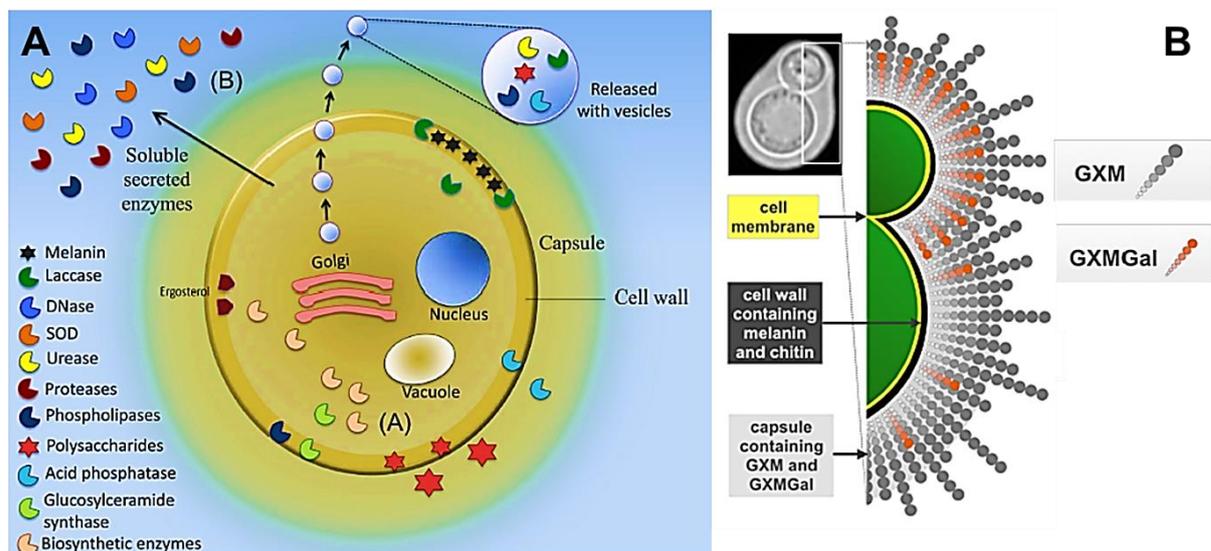
Os fungos no ambiente exercem com perfeição a função de "recicladores" da natureza, para isso, secretam uma série de enzimas para a degradação de macromoléculas e obtenção de nutrientes no ambiente. O mesmo ocorre durante o processo infeccioso, em que uma série de enzimas, como lipases, proteases e desoxirribonucleases (DNases) são liberadas e contribuem para a virulência do fungo, destruindo os tecidos, aumentando seu poder invasivo e interferindo com a resposta imune do hospedeiro (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015).

Para sobreviver e crescer no hospedeiro, o fungo deve metabolizar creatinina, xantinas e ácido úrico. Assim, a urease desempenha um importante papel catalisando a hidrólise de ureia, amônia e carbamato, sendo considerada um grande fator de virulência, além de estar envolvida na travessia do patógeno do pulmão para o SNC, contribuindo na passagem da barreira hematoencefálica (BBB- do inglês *blood-brain barrier*) e migração para o SNC (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015). Embora o papel específico desta enzima na invasão da BBB ainda não é amplamente esclarecido, tem sido sugerido que a degradação enzimática extracelular da uréia, gerando amônia tóxica, pode danificar as células endoteliais e levar a um aumento na permeabilidade da barreira (YANG; WANG; ZOU, 2017). A urease também é capaz de promover uma resposta celular anti-inflamatória mediada por células Th2 nos pulmões. Junto com a urease, a fosfolipase B é importante no estabelecimento da criptococose cerebral, e é necessária para a expulsão de *Cryptococcus* dos macrófagos (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014).

Fosfolipase B, fosfolipase C, lisofosfolipase, aciltransferase e atividade da fosfolipase são enzimas capazes de promover a ligação fúngica às células hospedeiras. Fosfolipase B promove a invasão fúngica no tecido hospedeiro e hidrolisa fosfolipídios presentes no surfactante pulmonar e na membrana plasmática. Além disso, contribui para a sobrevivência dos fungos, mantendo a integridade da parede e fornece nutrientes que podem ser usados como fontes

de carbono durante a infecção. A fosfolipase C é crucial no desenvolvimento de fenótipos virulentos, estando envolvida na produção de melanina, crescimento a 37 °C, secreção de fosfolipase B e resistência a drogas antifúngicas, além disso, também está envolvida na regulação da homeostase, separação celular após citocinese, e na manutenção da integridade da parede celular (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015; YANG; WANG; ZOU, 2017).

A figura 2 (A) representa as principais enzimas envolvidas no processo da patogênese de *Cryptococcus* e que podem alterar o processo de infecção, por isso são alvos potenciais para novos agentes antifúngicos. Algumas são mantidas ativas dentro da célula, como as envolvidas na biossíntese celular, enquanto outras são secretadas através de sistemas de secreção por vesículas (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015; BIELSKA; MAY, 2016; CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). A figura 2(B) apresenta um esquema da cápsula polissacarídica, mostrando a disposição das moléculas de GXM (mostradas em cinza) e GXMGal (mostradas em vermelho). GXMGal são encontradas principalmente em cápsulas crescentes de célula filha em desenvolvimento, em quantidades bem menores nas cápsulas de células maduras (BIELSKA; MAY, 2016).



Fonte: Almeida, Wolf e Casadevall, 2015.

Fonte: Adaptado de Bielska e May, 2016.

Figura 2: Principais fatores de virulência envolvidos no processo da patogênese de *Cryptococcus*. (A) Destaque para as principais enzimas; (B) Esquema representativo da cápsula polissacarídica criptocócica.

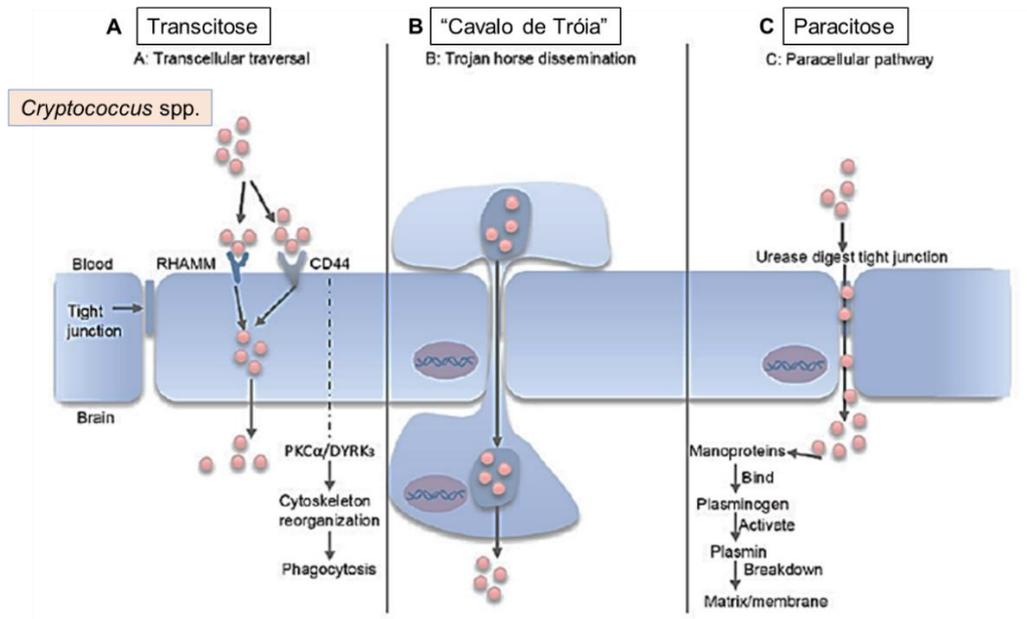
2.1.2 Disseminação e entrada no SNC

Uma característica fundamental da patogênese da criptococose envolve a saída de *Cryptococcus* dos pulmões para o sangue periférico circulante e sua entrada no compartimento do SNC. O neurotropismo apresentado por *Cryptococcus* pode ser explicado pelo fato do SNC ser um sítio imunoprivilegiado, ser um ambiente estéril e o LCR (Líquido cefalorraquidiano) conter substratos neuronais que promovem o crescimento e favorecem a sobrevivência desses patógenos, particularmente nos espaços perivasculares, constituindo um nicho rico e muito interessante para esses microorganismos. Outro fator importante é a elevada concentração de catecolaminas, que são excelentes substratos para o fungo na produção de melanina, um de seus principais fatores de virulência. Assim, estes patógenos desenvolveram mecanismos eficientes para atravessar a BBB (Sigla do inglês, *blood-brain barrier* – barreira hematoencefálica) e sobreviverem no SNC (FRANCO-PAREDES et al., 2015; MAY et al., 2016).

Existem três mecanismos propostos para explicar a travessia de *Cryptococcus* através da BBB, embora os mecanismos para este neurotropismo ainda não sejam totalmente compreendidos. De acordo com May e colaboradores (2016), no primeiro mecanismo, as células de *Cryptococcus* poderiam forçar sua passagem entre as junções das células endoteliais, em um processo conhecido como paracitose, usando proteases e urease, para promover a transmigração endotelial. O segundo seria a transcitose, em que o ácido hialurônico situado na superfície da levedura se liga ao CD44, molécula presente no lúmen endotelial, promovendo a ligação do fungo à célula endotelial do hospedeiro. Esta ligação induz uma proteína quinase C dependente de actina que promove uma remodelação na célula endotelial hospedeira, levando-a a engolir a levedura. Curiosamente, trabalhos recentes revelaram que os elevados níveis de inositol presentes no cérebro agem como um gatilho para desencadear esse processo e aumentam a expressão de ácido hialurônico pelo fungo. Finalmente, o terceiro mecanismo propõe que *Cryptococcus* atravesse a BBB dentro de macrófagos que atuam como “Cavalo de Tróia”. Nesse último caso, macrófagos com células fúngicas internalizadas cruzam a BBB, evitando assim a exposição da levedura ao sistema imune do hospedeiro (KRONSTAD et al.,

2011; MAY et al., 2016; SANTIAGO-TIRADO et al., 2017a; SORRELL et al., 2016; YANG; WANG; ZOU, 2017).

A figura 3 ilustra os três possíveis mecanismos utilizados pelo fungo para acessar o SNC.



Fonte: Adaptado de Yang, Wang and Zou, 2016.

Figura 3: Mecanismos de transmigração de *Cryptococcus* para o SNC. (A) Travessia transcelular: *Cryptococcus* se liga a receptores na célula endotelial (CD44 ou RHAMM - receptor de motilidade mediada por hialuronano), que desencadeia a endocitose celular, mediada por proteínas quinases C dependente de actina (PKC α , proteína quinase C α ; DYRK3, quinase 3 regulada por fosforilação de tirosina de especificidade dupla.). (B) Disseminação por cavalo de Tróia: *Cryptococcus* é fagocitado por um macrófago, que é capaz de cruzar a BBB, resultando no transporte do patógeno para o cérebro. (C) Via paracelular: *Cryptococcus* danifica e enfraquece as junções intercelulares por meio de enzimas como proteases e urease, o que facilita a passagem do microorganismo entre as células endoteliais.

2.1.3 Resposta imune respiratória frente a *Cryptococcus*

Os receptores de reconhecimento de padrões transmembrana (PRP), do hospedeiro, mais importantes na defesa contra *C. gattii* são os receptores do tipo Toll 4 e 9 (TLR 4 e TLR9). O reconhecimento de *C. neoformans* envolve principalmente TLR2, que reconhece quitina, o que evidencia diferenças na organização e localização de estruturas derivadas de quitina entre *Cryptococcus*. Além disso, alguns estudos mostraram que *C. gattii* induz maiores

concentrações de citocinas, como citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 e as citocinas IL-17 e IL-22, produzidas por células T, quando comparado com *C. neoformans* (BIELSKA; MAY, 2016).

A deposição de esporos ou células fúngicas dentro dos alvéolos desencadeia um reconhecimento imediato pelos macrófagos alveolares e/ou células dendríticas, que iniciam a remoção desses microorganismos por meio da fagocitose. Assim, esses fagócitos tentam eliminar esses microorganismos e buscam, também, iniciar e modular a resposta imune mais adequada, podendo levar à formação de granulomas capazes de conter e resolver o foco infeccioso ao longo de um período de semanas ou meses. Entretanto, o declínio da eficiência imunitária pode levar ao ressurgimento de uma infecção criptocócica dormente (GIBSON; JOHNSTON, 2015; MAY et al., 2016).

Cryptococcus são hábeis em superar a morte pelos fagócitos do hospedeiro, capazes de modificar a maturação do fagolisossomo, se replicar dentro dessas células e, também, de escapar por meio de um processo não lítico denominado vomocitose (SMITH et al., 2015).

O reconhecimento pelo receptor Dectina-1 nas células dendríticas de produtos fúngicos, estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-6, IL-1 e IL-23, por essas células, e esta combinação de citocinas induz a expansão de células Th17, que têm sido caracterizadas pela produção de um perfil de citocinas distinto, denominadas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Estas citocinas, em especial a IL-17, desempenham uma importante função no recrutamento de neutrófilos e alguns monócitos, para o sítio da infecção, promovendo uma inflamação neutrofílica que leva à ingestão e morte do patógeno, constituindo, assim, um papel protetor para o hospedeiro, especialmente frente a infecções fúngicas (GIBSON; JOHNSTON, 2015; ROMANI, 2011).

A resposta adaptativa mediada por células Th1 e/ou Th17 resulta no controle da infecção e é menos prejudicial para o hospedeiro, enquanto que a resposta Th2, mediada por IL-4 e IL-13, está associada à disseminação do patógeno e danos ao hospedeiro, sendo mais prejudicial (GIBSON; JOHNSTON, 2015; SCRIVEN et al., 2016). As respostas do tipo Th1 são caracterizadas pela produção de IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α (GIBSON; JOHNSTON, 2015).

2.1.4 Tratamento da criptococose

Apenas três classes de antifúngicos são usados atualmente para tratar a criptococose: os polienos (como a anfotericina B), os azóis (como o fluconazol) e o análogo de pirimidina (flucitosina (5-FC)). A anfotericina B desoxicolato (AmBd) em combinação com a flucitosina constitui a terapia de escolha no tratamento da infecção criptocócica grave, incluindo meningoencefalite. Entretanto, nos países da América Latina, a 5-FC não está disponível. E na maioria dos países do continente africano, onde ocorre o maior número de casos de meningoencefalite, a AmBd não está disponível. AmBd e 5-FC são fármacos de elevada toxicidade e precisam ser administradas em ambiente hospitalar, o que eleva ainda mais os custos e dificulta o acesso em muitas regiões sem infraestrutura hospitalar (RODRIGUES, 2016).

Assim, nos países com recursos limitados, como na América Latina, é recomendado um regime alternativo que consiste no uso de AmBd associado ao fluconazol na fase de indução, seguido do uso de fluconazol na fase de consolidação. A anfotericina B lipossomal é uma alternativa, com resultados semelhantes e menor nefrotoxicidade, sendo recomendada especificamente para pacientes com risco de disfunção renal, devido ao elevado custo. O tratamento deve ser mantido por 4 a 8 semanas e após este período, é adotado o tratamento de manutenção com fluconazol, que deve ser mantido por até um ano. O tratamento de escolha da infecção pulmonar, seja por *C. gattii* ou *C. neoformans*, em pacientes hígidos ou imunossuprimidos, é o fluconazol, por apresentar boa biodisponibilidade oral, que também apresenta excelente penetração no LCR, devendo ser administrado uma vez ao dia por via oral, durante 6 a 12 meses. Outros triazóis também podem ser utilizados alternativamente, tais como itraconazol, posaconazol e voriconazol (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; MAY et al., 2016; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Entretanto, além da elevada toxicidade dessas drogas, o prolongado tempo de administração favorece o desenvolvimento de resistência. Na África, a resistência aos azóis vem atingindo números alarmantes (RODRIGUES, 2016). Estudos realizados pelo programa global de vigilância antifúngica ARTEMIS encontraram isolados de *C. gattii* com reduzida susceptibilidade ao fluconazol

(SANTOS et al., 2014). As vacinas antifúngicas aprovadas para uso humano ainda não estão disponíveis. As altas taxas de mortalidade estão associadas a um diagnóstico tardio, ao acesso, em muitos locais, apenas aos tratamentos menos efetivos e ao aumento da resistência aos medicamentos (RODRIGUES, 2016). Um estudo em Botswana, África, mostrou que as taxas de meningite criptocócica não sofreram redução ao longo de 2010-2014, embora tenha ocorrido uma ampla cobertura da TARV, com 90% de detecção do HIV, 90% de inscrição na terapia antirretroviral e 90% de cargas virais indetectáveis, o que possivelmente está associado a falhas no cuidado e no tratamento desses pacientes (TENFORDE et al., 2017; WILLIAMSON, 2017).

2.2 Coinfecções ou Doenças Polimicrobianas

As infecções respiratórias estão entre as principais causas de morte em todo o mundo, sendo responsáveis por três milhões de mortes em 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, [s.d.]). Mesmo com os avanços da medicina e com melhorias nas políticas de saúde pública, as doenças infecciosas continuam a ser um dos maiores encargos para a humanidade, nesse contexto, as doenças polimicrobianas ou coinfecções representam um grande desafio, pois, além de envolverem doenças com maior gravidade, ainda são pouco estudadas e certamente subnotificadas (PASMAN, 2012).

De acordo com Bakaletz (2004), coinfecção ou doenças polimicrobianas envolvem dois ou mais microorganismos que atuam de forma concomitante/sinérgica ou sequencial, podendo envolver condições agudas ou crônicas, mediando processos complexos de doenças. Na maioria das vezes envolvem organismos de diferentes reinos, gêneros e espécies ou diferentes variantes fenotípicas de uma única espécie (BAKALETZ, 2004).

Um importante exemplo de infecção concomitante e aguda é o aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas respiratórias, durante a infecção em curso pelo vírus influenza, que constitui a principal causa de morte especialmente nos idosos. Da mesma forma, infecções crônicas em curso podem aumentar a susceptibilidade a infecções agudas concomitantes. Um exemplo clássico é a infecção crônica pelo vírus HIV que, ao promover uma

esmagadora supressão do sistema imune, expõe o indivíduo ao desenvolvimento de infecções agudas concomitantes causadas por microorganismos oportunistas (PASMAN, 2012).

A coinfeção também pode ser secundária/sequencial, um exemplo é o desenvolvimento de pneumonia bacteriana, que pode ocorrer logo após a eliminação do vírus influenza, caracterizando uma situação ligeiramente diferente de infecção concomitante. Há também outras coinfeções respiratórias, tais como a otite média, que é especialmente comum em crianças e, geralmente, causada por *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae*, que ocorre imediatamente após infecção causada por coronavírus, vírus sincicial respiratório (RSV – do inglês respiratory syncytial virus), ou por adenovírus (BREALEY et al., 2015; PASMAN, 2012).

Os mecanismos que levam à coinfeção ainda são pouco compreendidos. De acordo com Pasman (2012), é razoável imaginar que numa infecção secundária, um determinado microorganismo entrando em um ambiente já inflamado, com lesão tecidual, com uma resposta imune adaptativa já em curso, poderia ativar diferentes genes de virulência, infectar diferentes tipos de células e tecidos, e usar diferentes estratégias das que usaria ao infectar um tecido íntegro. Isso é visto, por exemplo, em casos complicados de tuberculose secundária à infecção pelo HIV, em que *Mycobacterium tuberculosis* pode mais facilmente se espalhar para locais extra-pulmonares (BOSCH et al., 2013; PASMAN, 2012; SKALSKI; LIMPER, 2016).

De modo geral, coinfeções do trato respiratório inferior com vírus e bactérias são comumente observados, especialmente durante infecções agudas graves e no curso de doenças respiratórias crônicas. Além disso, estudos recentes vêm mostrando que a presença simultânea de bactérias e vírus afeta o curso e a gravidade das infecções e muitos são os mecanismos envolvidos nesse processo, como por exemplo, comprometimento da depuração mucociliar, perda das junções epiteliais, expressão de receptores do hospedeiro que poderiam facilitar a adesão de bactérias, mudanças no microambiente que poderiam aumentar a oferta de nutrientes, temperatura e ATP extracelular, alterando o transcriptoma bacteriano e quadro de imunossupressão ou

modulação desfavorável da resposta imune causada por componentes virais (BELLINGHAUSEN et al., 2016; BOSCH et al., 2013).

Com a pandemia do HIV, muitas doenças que antes eram consideradas raras e não invasivas passaram a ter grande relevância e impacto na saúde. Dessa forma, os fungos do gênero *Cryptococcus*, que eram considerados patógenos incomuns, com apenas alguns casos conhecidos antes de 1955, tornaram-se microorganismos oportunistas, com o aumento da população de imunocomprometidos. Assim, a neurocriptococose, uma meningoencefalite fúngica, se tornou uma importante preocupação diante da pandemia do HIV, sendo a principal manifestação clínica associada e apresentando elevados índices de mortalidade (CRUMP et al., 2011; QUIAN et al., 2012; ROHATGI; PIROFSKI, 2015; SKALSKI; LIMPER, 2016).

Apesar da coinfeção entre vírus HIV e *Cryptococcus* ser bastante descrita na literatura, há poucos relatos de coinfeção entre esse fungo e outros agentes. Algumas coinfeções documentadas com *C. neoformans* no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com meningite incluem: *Toxoplasma gondii*, neurocisticercose, malária, com a alga *Prototheca wickerhamii*, *Mycobacterium tuberculosis*, e também com *Streptococcus pneumoniae* (JOHN; COOVADIA, 1998; MARTINEZ-LONGORIA et al., 2015; NADAUD et al., 2007; SALEEM; FASIH; ZAFAR, 2015). Com relação à coinfeções pulmonares são encontrados relatos de coinfeção de *C. neoformans* com *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium tuberculosis* (CORDERO et al., 2016; JAIN; MAHAJAN; KUMAR, 2016; JAVIER et al., 2012; KAKEYA et al., 2014). Um outro caso relatado foi de septicemia por *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* concomitante, em paciente soropositivo (MANFREDI; CALZA; CHIODO, 2017).

Diante de um quadro de infecção do SNC, um diagnóstico rápido e a correta identificação dos microrganismos patogênicos são de fundamental importância para determinar o melhor tratamento antimicrobiano e aumentar as chances de cura do paciente, reduzindo possíveis sequelas. A cultura do LCR (líquido cefalorraquidiano) é considerada o “padrão ouro” para o diagnóstico de meningite, pois permite identificar e avaliar a susceptibilidade *in vitro* do agente causador e a escolha adequada do antimicrobiano. Entretanto, na prática

laboratorial, é comum observar que muitos dos ensaios de cultura do LCR, microscopia, como coloração de Gram ou tinta da Índia, e inclusive os testes de aglutinação em látex, não são sensíveis e são limitados, e muitos casos de infecções permanecem inadequadamente tratados (FAVARO et al., 2013; SIDDIQI et al., 2014).

Em um interessante estudo, Siddiqi e colaboradores (2014), realizaram PCR em amostras de LCR de pacientes infectados pelo vírus HIV e com sintomas sugestivos de alterações no SNC, utilizando iniciadores patógenos-específicos. As análises revelaram que, das 331 amostras analisadas, foram encontrados em 68 (36,0%) amostras mais de um patógeno, reforçando a hipótese de que múltiplos patógenos podem frequentemente coexistir no LCR e essas infecções mistas possivelmente são subdiagnosticadas, uma vez que técnicas moleculares mais sensíveis ainda não são utilizadas rotineiramente, prevalecendo as técnicas de cultura para detecção de patógenos (BELLINGHAUSEN et al., 2016; SIDDIQI et al., 2014).

Um estudo recente e pioneiro realizado em nosso grupo avaliou a influência da infecção pelo vírus Influenza A H1N1 na progressão da criptococose causada por *C. gattii* em modelo murino. Os dados obtidos mostraram que a infecção secundária de *C. gattii* ao vírus influenza A provocou maior morbidade e letalidade precoce da criptococose, com especial destaque para um aumento da carga fúngica no SNC dos camundongos. A coinfeção entre esses dois patógenos modificou a resposta inflamatória do hospedeiro, com aumento de neutrófilos e macrófagos no local da infecção, indução da produção de IFN- α 4/ β , mas diminuição dos níveis de IFN- γ , mostrando uma alteração na resposta imune classicamente conhecida como protetora, e, tendo como consequência direta, a alteração da fagocitose com redução da atividade fungicida dos macrófagos. Além disso, foi observado uma modificação na morfologia fúngica, com aumento da cápsula e diâmetro celular. Assim, a alteração da virulência de *C. gattii* e do perfil inflamatório durante a infecção simultânea com o vírus influenza A justificam o aumento da morbidade, resultando na menor sobrevivência dos camundongos (OLIVEIRA et al., 2017).

2.3 Interações entre microorganismos nas coinfeções

É importante considerar que existem muitas interações entre microorganismos na natureza, mas ainda é muito pouco conhecido como as bactérias interagem com patógenos fúngicos no ambiente e em hospedeiros humanos. Microorganismos que compartilham nichos em comum, especialmente bactérias, podem desenvolver mecanismos antagônicos direcionados contra fungos causadores de doenças, e a compreensão desses mecanismos de interação, tanto em relação patógenos e hospedeiro, quanto em relação aos agentes da coinfeção entre si, podem contribuir para o desenvolvimento de novas drogas ou imunoterapias, ampliando as possibilidades terapêuticas e certamente podem contribuir ampliando a compreensão dos mecanismos de patogênese (DHAMGAYE; MURRAY; PELEG, 2015; MAYER; KRONSTAD, 2017).

Nesse sentido, a literatura recente dispõe de trabalhos que buscaram compreender *in vitro* as relações estabelecidas entre microorganismos patogênicos. Um estudo recente, realizado por Mayer e Kronstad, 2017, identificou uma bactéria do solo, *Bacillus safensis*, que bloqueou vários fatores de virulência de *C. neoformans*, incluindo a formação de melanina, a produção de cápsula e também inibiu a formação de biofilme criptocócico. Esta bactéria compartilha nicho comum com *Cryptococcus* no ambiente, e a inibição da melanização fúngica foi dependente do contato direto entre as células. Análises genéticas e fenotípicas demonstraram que a quitinase bacteriana tem ação contra a quitina da parede celular fúngica, desestabilizando a parede celular, um dos mecanismos com maior contribuição para mediar os efeitos de *B. safensis*. Esta bactéria também apresentou atividade contra fatores de virulência de *C. albicans*, inibindo fortemente a filamentação de *C. albicans* e a formação de biofilme (MAYER; KRONSTAD, 2017).

De modo geral, infecções fúngicas, especialmente a criptococose, são de difícil tratamento, devido à similaridade morfofisiológica dos fungos com as células humanas, ambas células eucariotas. Assim, a compreensão dessas relações propõe um novo conceito de desenvolvimento antimicrobiano, que vem ganhando atenção das pesquisas e visa o desarme de patógenos, ou seja,

desestabilizar em vez de erradicar, atuando na inibição dos fatores de virulência, que podem ser alvos mais seletivos para as células fúngicas, tornando-as inofensivas e/ou mais susceptíveis à contenção por antimicrobianos ou pelo sistema imune humano (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007; MAYER; KRONSTAD, 2017).

A criptococose pode ocorrer concomitantemente com outros patógenos, o que inclusive necessita maiores estudos por haver possibilidades de coinfeções subdiagnosticadas, uma vez que os pacientes susceptíveis normalmente se encontram em uso de terapia medicamentosa, o que poderia mascarar o diagnóstico de um dos patógenos associados no processo de infecção. Além disso, há possibilidades de múltiplas interações de *C. gattii* com outros patógenos e até mesmo com microorganismos da microbiota do hospedeiro, interações desconhecidas e que poderiam exercer influência nos mecanismos de patogênese desta micose (DHAMGAYE; MURRAY; PELEG, 2015; NADAUD et al., 2007; RODRIGUES, 2018; SALEEM; FASIH; ZAFAR, 2015).

2.4 *Pseudomonas aeruginosa* e Infecções das Vias Aéreas

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, de forma semelhante a *Cryptococcus*, está presente no ambiente e atua como um patógeno oportunista, infectando vários órgãos e tecidos, sendo importante agente causador de pneumonias nosocomiais. Apresenta uma maquinaria celular complexa e especializada, sendo capaz de secretar um enorme arsenal de toxinas importantes na patogenicidade e com grande potencial na inibição do crescimento de diferentes microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Cryptococcus* (BORA, 2016; RABIN; HAUSER, 2003; RELLA et al., 2012; TUPE et al., 2014).

O efeito inibitório de substâncias produzidas por várias linhagens de *P. aeruginosa* contra *C. neoformans* foi observado, *in vitro*, pela primeira vez em 1954. Desde então, alguns estudos foram realizados na tentativa de isolar essas substâncias e compreender melhor os mecanismos de inibição de *P. aeruginosa*.

Rella et al., 2012, realizou um estudo mostrando que moléculas de *quorum sensing* (QS) e fenazinas, principalmente piocianina, inibem significativamente o crescimento criptocócico. Essa inibição foi detectada principalmente durante o co-cultivo desses microorganismos, sugerindo que o contato físico desencadeia a produção de moléculas antifúngicas pela bactéria (RELLA et al., 2012). Entretanto, novos estudos precisam ser realizados no intuito de esclarecer mais especificamente esses mecanismos de inibição e como eles podem interferir *in vivo*.

Contextualizando, *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram negativa, baciliforme, asporógena, monoflagelada, pertencente ao grupo dos não fermentadores, realiza respiração aeróbia como seu metabolismo ideal, entretanto pode também realizar respiração anaeróbia na presença de nitrato ou de outros receptores de elétrons (ABDUL-HUSSEIN; ATIA, 2016). Devido ao seu genoma relativamente grande (~5-7 Mbp) e um metabolismo de admirável versatilidade, é capaz de sobreviver e se desenvolver nos mais variados nichos ambientais, como solo, matéria orgânica em decomposição, vegetação, água, ambiente hospitalar, biomateriais e em ambientes úmidos de modo geral. (BALLOK; O'TOOLE, 2013; GELLATLY; HANCOCK, 2013; MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014). É capaz de causar um amplo espectro de doenças agudas e crônicas como infecções pulmonares, epiteliais, oftálmicas, no trato urinário, ósseas e articulares e no sistema nervoso central (SNC). Acomete especialmente indivíduos imunocomprometidos e com doenças preexistentes, incluindo pacientes diabéticos, com queimaduras graves, transplantados, com neoplasias hematológicas, em uso de cateteres e próteses, traqueostomizados e em uso de drogas imunossupressoras. É um agente causador comum de pneumonia hospitalar, sendo frequentemente adquirida por pacientes em uso de ventilação mecânica, denominada pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), por pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e, especialmente, pacientes com fibrose cística (FC). É raramente associada a infecções crônicas em pacientes imunocompetentes, embora existam relatos de casos, inclusive fatais, de infecções por *P. aeruginosa* em indivíduos hígidos (MORADALI; GHODS; REHM, 2017; MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014; STREETER; KATOULI, 2016).

Existem variadas formas de contágio, como por exemplo, a ingestão de alimentos contaminados, contágio em áreas úmidas, como piscinas, banheiras de hidromassagem, banheiros, cozinhas e pias. Em ambientes hospitalares, o contágio pode ocorrer pela contaminação de equipamentos médicos, água e colonização cruzada entre pacientes, principalmente envolvendo falhas nos procedimentos de assepsia pelos profissionais de saúde. O uso de cateteres, também favorece a colonização dessas bactérias, por romper as camadas epiteliais da mucosa, e, além disso, *P. aeruginosa* possui grande habilidade para formar biofilmes (MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014; STREETER; KATOULI, 2016).

Apesar dos avanços no controle das infecções hospitalares e a introdução de uma ampla variedade de agentes antimicrobianos, a infecção por *P. aeruginosa* continua a ser um grande desafio devido à sua alta resistência aos antimicrobianos, somado a alta incidência e a gravidade das infecções. Afeta mais de 2 milhões de pacientes hospitalizados, causando cerca de 90.000 mortes anualmente (MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014). Alguns estudos mostraram seu envolvimento em aproximadamente 50% a 60% dos pacientes imunocomprometidos, em cerca 16% das pneumonias nosocomiais, 12% em infecções do trato urinário, 8% em infecções cirúrgicas e 10% em infecções da corrente sanguínea. A maioria dos estudos mostrou que as taxas de mortalidade em pacientes com bacteremia variam de 33 a 61%, além de evidências de aumento de casos em infecções alimentares (BENIE et al., 2017; VITKAUSKIENĖ et al., 2010). Em pacientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) é responsável por cerca de 13 a 23% das infecções nosocomiais (DRISCOLL; BRODY; KOLLEF, 2007). Está entre as infecções mais comuns associada a piora clínica na doença pulmonar por FC. Crianças com FC têm uma prevalência relativamente baixa, mas o risco aumenta com a idade, atingindo cerca de 80% dos adultos com FC (MAYER-HAMBLETT et al., 2014).

2.4.1 Principais fatores de virulência e mecanismos de patogênese envolvidos nas infecções do trato respiratório causadas por *P. aeruginosa*

Após ser adquirida do meio ambiente, *P. aeruginosa* coloniza o epitélio do trato respiratório nos pacientes com condições predisponentes. Dessa forma, flagelos e pili são estruturas envolvidas no processo de adesão e colonização. Os flagelos interagem por meio da ligação com um glicolípido de superfície de membrana epitelial, o asialo-GM1 (glicolípido asialo-gangliosídeo M1) e por meio de interações com receptores do tipo Toll TLR5 e TLR2. Os pili do tipo IV são também anexos filamentosos ligados à superfície celular da bactéria, promovem movimentos de contração, permitindo que *P. aeruginosa* se espalhe ao longo de superfícies hidratadas, dessa forma, facilitam o movimento bacteriano ao longo da superfície da célula hospedeira e adesão por meio de ligações com asialo-GM1, auxiliando na formação de microcolônias, dando início à colonização (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; STREETER; KATOULI, 2016).

A adesão também é mediada por outras características da superfície celular, incluindo os lipopolissacarídeos (LPS). O LPS é uma molécula grande encontrada na membrana da superfície externa na maioria das bactérias Gram-negativas, composta por um domínio hidrofóbico, o Lipídeo A, e um domínio variável e hidrofílico, o Antígeno-O, que confere proteção contra lise mediada pelo sistema do complemento. Diferenças nas cadeias polissacarídicas específicas de Antígeno-O são a base para a sorotipagem de cepas de *P. aeruginosa*. O LPS apresenta papel crítico na adesão pela ligação asialo-GM1, no reconhecimento pelas moléculas do sistema imune inato (receptores TLR4 / CD14 ou TLR4 / MD-2), responsáveis por induzir inflamação, e na ligação a CFTR (regulador da condutância transmembrana da fibrose cística), uma proteína de membrana envolvida na secreção de íons cloreto (HAUSER, 2011; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; PIER; GROUT; ZAIDI, 1997; STREETER; KATOULI, 2016).

Duas lecitinas, LecA (PA-IL) e LecB (PA-IL), caracterizadas no citoplasma de *P. aeruginosa*, estão também presentes em grande quantidade na membrana externa. LecA e LecB se ligam especificamente a glicoconjugados da superfície

da célula hospedeira, galactose e a fucose, respectivamente, apresentando uma importante atuação no reconhecimento e adesão da bactéria pela célula hospedeira. Além disso, a proteína tetramérica LecA demonstrou ter um efeito citotóxico, causando lesão no epitélio respiratório e induz uma alteração na permeabilidade do epitélio intestinal, resultando no aumento da absorção de exoenzima A. LecB parece estar envolvida na biogênese do pilus e na atividade da protease IV (CHEMANI et al., 2009).

Um outro importante composto presente na superfície celular é o alginato, um exopolissacarídeo mucoide formado por polímeros de ácido manurônico e glucurônico, que também funciona como uma adesina, encapsulando *P. aeruginosa* e proporcionando vantagens seletivas para a colonização do tecido pulmonar, aumentando a resistência à opsonização e inibindo a ação de células fagocíticas, conferindo proteção contra radicais tóxicos (ROS) e protegendo a célula bacteriana contra a ação de antibacterianos. Também pode atuar como matriz intercelular, permitindo a formação de microcolônias e participando da arquitetura de biofilmes. Em pacientes com fibrose cística é comum a presença de fenótipos mucoides que apresentam uma superexpressão de alginato (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; NIVENS et al., 2001).

A secreção de proteínas efetoras é de extrema importância para a adaptação de *P. aeruginosa* aos mais variados ambientes. Assim, essas proteínas podem: permanecer limitadas à superfície celular; ser secretadas para o meio extracelular; ou, até mesmo, ser injetadas no citosol da célula hospedeira. Para isso, *P. aeruginosa* conta com uma maquinaria diversificada, complexa e especializada, envolvendo diferentes sistemas de secreção e um enorme arsenal de exotoxinas importantes na patogenicidade (BLEVES et al., 2010; FILLOUX, 2011).

O sistema de secreção do tipo III (T3SS - Type III Secretion System) de *P. aeruginosa* é uma estrutura de pilus complexa, que funciona como um apêndice tipo agulha formando um poro na membrana eucariótica, permitindo a injeção de proteínas efetoras tóxicas no citosol das células hospedeiras. A produção de proteínas T3SS, incluindo complexos de agulhas e as proteínas efetoras, é mantida em baixos níveis até o contato com as células do hospedeiro, quando ocorre rápido aumento da expressão dos genes T3SS e ativação da

secreção (HAUSER, 2009). Há quatro toxinas efetoras, as exoenzimas S, T, U e Y, identificadas e que são injetadas por esse sistema. ExoS e ExoT são bifuncionais, possuindo atividade de proteína ativadora de GTPase (GAP) e atividade de ADP-ribosiltransferase, enquanto ExoY é uma adenilato ciclase. ExoS, ExoT e ExoY exercem atividade citolítica, com atividades sobre a organização do citoesqueleto de actina, inibição da fagocitose e estão associadas ao rompimento das junções das células endoteliais. ExoU é uma citotoxina com atividade de fosfolipase A2 (PLA2), com potente capacidade de clivar membranas fosfolipídicas e promover lise celular. Devido à atividade de PLA2, ExoU possui uma atividade pró-inflamatória, capaz de deflagrar cascata de inflamação, levando a uma liberação significativa de ácido araquidônico, eicosanóides, citocinas e PAF (Fator de Agregação Plaquetária). Além disso, ExoU também apresenta atividade citolítica para vários tipos de células, incluindo células epiteliais, macrófagos e fibroblastos. Estima-se que ExoU possui uma ação 100 vezes mais potente que ExoS, capaz de causar morte rápida de células eucarióticas, perda de integridade da membrana plasmática e necrose. A grande maioria das cepas expressa uma das duas principais exotoxinas, ExoU ou ExoS, mas raramente ambas. A exata contribuição de cada toxina na patogênese ainda não está totalmente esclarecida, tem sido documentada uma alta prevalência de produção de ExoS em isolados de *P. aeruginosa* de infecções do trato urinário e feridas. Por outro lado, ExoU está altamente associada a infecções pulmonares (GELLATLY; HANCOCK, 2013; HAUSER, 2009; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; LINS et al., 2010; PLOTKOWSKI et al., 2015; SHAVER; HAUSER, 2004; STREETER; KATOULI, 2016).

A Exotoxina A (ExoA) é secretada através de um sistema de secreção do tipo II. É uma ADP-ribosiltransferase que atua inibindo o fator de alongamento-2 (EF-2) e conseqüentemente inibe a síntese protéica, levando à morte celular e dano tecidual. ExoA exerce um papel importante na virulência de *P. aeruginosa*, embora em menor grau quando comparado com o sistema de secreção tipo III, como ExoS ou ExoU. Esta toxina exerce ações imunomoduladoras, inibindo a produção de citocinas, como TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10, promovendo uma depleção da resposta imune do hospedeiro, dificultando a eliminação da infecção

(KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; SCHULTZ et al., 2001, 2000; YOUSEFI-AVARVAND et al., 2015).

Várias proteases são secretadas por *P. aeruginosa* e são de extrema relevância para o estabelecimento da infecção e invasão tecidual, gerando danos celulares variados, rompendo estreitas junções epiteliais, degradando fibrina, colágeno, imunoglobulinas e surfactante pulmonar. Uma importante protease, secretada pelo sistema de secreção tipo II, é a fosfolipase C (PLC), que pode ser hemolítica ou não hemolítica. PLC não-hemolítica não tem atividade patogênica, já a PLC hemolítica, além de causar lise de hemácias, degrada a fosfatidilcolina e a esfingomielina presentes nas membranas eucarióticas e em surfactantes pulmonares, causando danos no tecido pulmonar, além de atuar como um potente agente indutor de inflamação, sendo um fator de extrema importância na resposta inflamatória crônica observada em pacientes com FC (MEYERS; BERK, 1990; STREETER; KATOULI, 2016).

A protease alcalina ou aeruginolisina é uma metaloprotease de zinco secretada através do sistema de secreção do tipo I, crucial para a invasão tecidual, capaz de degradar proteínas teciduais como a laminina, causando necrose, e proteínas do sistema do complemento, particularmente C1q e C3, fibrinogênio, fibrina e fibronectina, além disso, degrada os monômeros livres de flagelina, uma proteína constituinte do flagelo bacteriano, impedindo o reconhecimento desses monômeros pelo sistema imune inato via receptores TLR5, contribuindo nos mecanismos usados pela bactéria para evasão do sistema imune do hospedeiro (BARDOEL et al., 2011; LAARMAN et al., 2012; MATSUMOTO, 2004; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Entre as proteases secretadas, há também duas elastases (metaloproteases), LasA e LasB, que são reguladas pelo sistema de *quorum sensing* e secretadas pelo sistema de secreção tipo II. LasB é comumente denominada elastase e LasA é denominada estafilolisina, por ser capaz de hidrolisar a ponte penta-glicina necessária para a estabilização do peptidoglicano da parede celular de *Staphylococcus* spp.. LasA apresenta uma habilidade elastolítica inferior, quando comparada com LasB, e age intensificando a atividade de LasB na degradação da elastina. LasB atua destruindo as junções do epitélio respiratório, alterando a permeabilidade epitelial e facilitando o

recrutamento de neutrófilos, além de clivar proteínas surfactantes do trato respiratório e proteínas opsoninas do sistema imune, além de inativar anafilotoxinas, como C3a e C5a. LasB e protease alcalina parecem agir em conjunto com LasA e, dessa forma, são responsáveis pela atividade elastolítica tão preponderante e característica na patogênese por *P. aeruginosa* (GELLATLY; HANCOCK, 2013; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; MATSUMOTO, 2004).

A protease IV é uma serina protease capaz de degradar proteínas do complemento, imunoglobulinas, fibrinogênio e proteínas surfactantes do hospedeiro, levando a perda da função do surfactante pulmonar, contribuindo significativamente na colonização e no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda. Além disso, alguns estudos mostraram que é uma enzima de relevante importância na patogênese da ceratite por *P. aeruginosa* (GELLATLY; HANCOCK, 2013; MALLOY et al., 2005; MATSUMOTO, 2004).

A elevada capacidade de produzir ramnolipídeos (RML) é também uma característica de grande importância de *P. aeruginosa*. RML são moléculas compostas por uma porção de ácido graxo hidrofóbico e uma porção hidrofílica composta por uma ou duas ramnosos. Apresentam atividade hemolítica, citotóxica, atuando na invasão tecidual e podendo causar necrose, inibem o transporte mucociliar e promovem a eliminação de neutrófilos. São importantes para a manutenção da arquitetura do biofilme e também na motilidade bacteriana (DOBLER et al., 2017; MORADALI; GHODS; REHM, 2017; SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005). Junto com o alginato, desempenha um papel importante na evasão das células fagocíticas do sistema imune inato (MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014).

A produção de cianeto (HCN) também é outra característica altamente tóxica, atuando como potente inibidor do Citocromo C oxidase e outras metaloenzimas, suprimindo a respiração aeróbica das células hospedeiras por difusão rápida através dos tecidos (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

A capacidade de quelar ferro é também uma parte vital para o estabelecimento da infecção e a progressão para uma infecção crônica, o ambiente hospedeiro tem pouco ferro livre, devido ao seu próprio sequestro por

moléculas como lactoferrina e transferrina (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Assim, *P. aeruginosa* é capaz de produzir vários sideróforos ou obter ferro a partir de sideróforos produzidos por outros microorganismos, refletindo sua grande capacidade de adaptação em diferentes ambientes e nichos de colonização. Nesse contexto, destaca-se a pioverdina, um pigmento fluorescente verde-amarelo, que é secretado e funciona como um sideróforo de alta afinidade na aquisição e transporte de ferro do meio ambiente por meio de receptores específicos na membrana externa. A pioverdina inicia uma cascata de sinalização, desencadeando a produção de vários fatores de virulência, incluindo a ExoA, uma endoprotease PrpI e da própria pioverdina (CORNELIS, 2010; JIMENEZ et al., 2012; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; STREETER; KATOULI, 2016).

As fenazinas são pigmentos redox-ativos, secretadas por um número considerável de bactérias, e exibem um amplo espectro de atividade tóxicas para diversos organismos procarióticos e eucarióticos, variando de acordo com a natureza e posição dos substituintes no anel heterocíclico. A piocianina (5-N-metil-1-hidroxifenazina) é a molécula mais estudada e é produzida apenas por *P. aeruginosa* (JIMENEZ et al., 2012). Secretada por um sistema de secreção do tipo II, este metabólito de coloração azul-esverdeada promove estresse oxidativo nas células do hospedeiro, inibe os mecanismos de proteção celular das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase glutaciona (GSH-Px) em células epiteliais e interrompe o transporte de elétrons mitocondrial do hospedeiro, o que pode prejudicar os canais de cloreto de CFTR na FC. Também atua como uma molécula de sinalização, controlando um conjunto limitado de genes, denominado o estímulo de PYO, durante a fase de crescimento estacionário, regulando genes de bombas de efluxo, genes envolvidos nos processos redox e genes de aquisição de ferro. É um dos principais fatores de virulência de *P. aeruginosa*, contribuindo para infecções agudas e crônicas, capaz de suprimir a proliferação de linfócitos, modular a expressão de IL-8 e CCL5, induzir apoptose em neutrófilos, deprimindo a resposta imune do hospedeiro. Além disso, inativa os inibidores de protease, favorecendo danos nos tecidos por proteases endógenas, comprometendo

inclusive o movimento ciliar (GELLATLY; HANCOCK, 2013; HALL et al., 2016; JIMENEZ et al., 2012; RADA; LETO, 2013).

O sistema de secreção do tipo VI (T6SS) foi recentemente descoberto, e está presente em aproximadamente 25% das bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa*. Apresenta estrutura similar a um bacteriófago e, além de secretar proteínas efetoras, realiza a entrega de toxinas no citosol de células eucarióticas hospedeiras e células bacterianas competidoras. Assim, atua favorecendo o crescimento de *P. aeruginosa* em meio a outras bactérias competidoras, atua como fator de virulência e está envolvido na formação de biofilme e em vários processos celulares como conjugação e regulação de *quorum sensing*. *P. aeruginosa* codifica três sistemas de secreção do tipo VI (T6SSs), H1-, H2- e H3-T6SS, seu mecanismo geral e papel fisiológico ainda não são totalmente compreendidos. As toxinas efetoras Tfe1 e Tfe2 (efetores antifúngicos de T6SS 1 e 2) apresentam ação antifúngica, com impactos distintos na célula-alvo, mas ambas podem causar a morte celular de fungos. A intoxicação por Tfe1 causa alterações na membrana plasmática. Tfe2 interrompe a absorção de nutrientes e o metabolismo de aminoácidos em células fúngicas, além de induzir autofagia (CHEN et al., 2015, 2020; HOOD et al., 2010; TRUNK et al., 2018).

A figura 4 ilustra os principais fatores de virulência produzidos por *P. aeruginosa* descritos no presente trabalho.

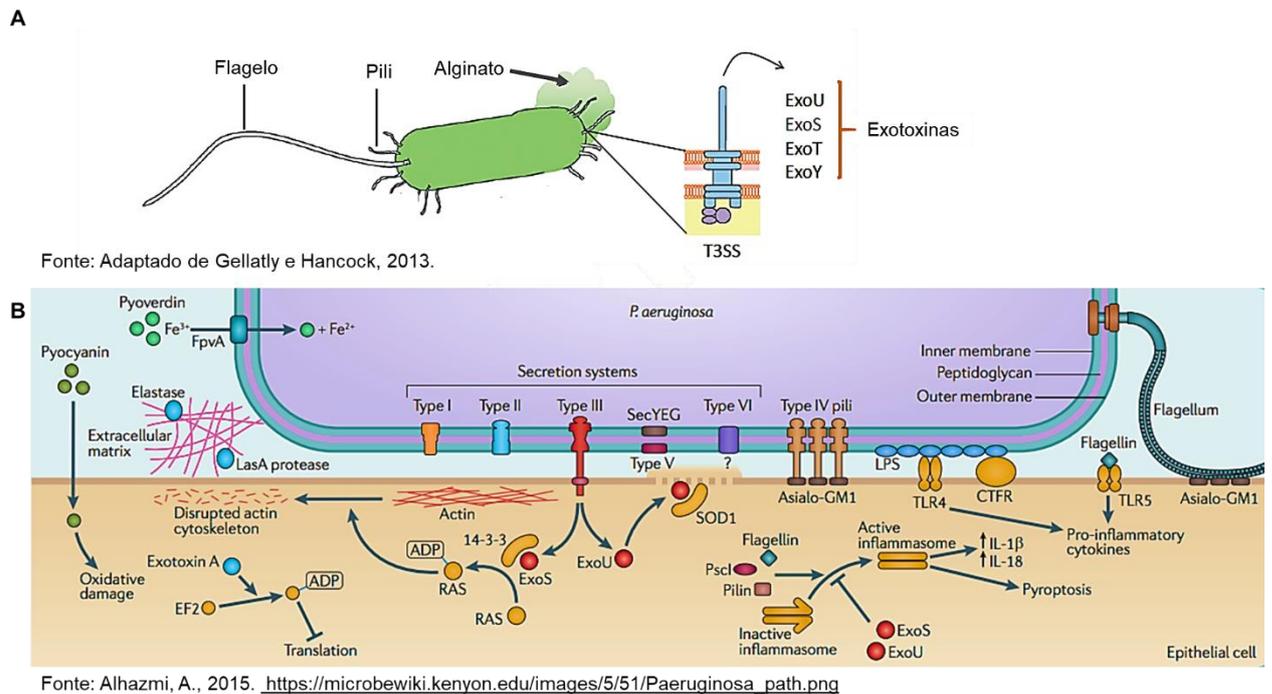


Figura 4: Principais fatores de virulência, produzidos por *P. aeruginosa*, envolvidos nos mecanismos de patogênese. (A) Morfologia da célula, bastonete, Gram-negativa, evidenciando a presença de flagelo, pili e cápsula mucóide de alginato, ao lado ilustração da estrutura do T3SS (sistema de secreção tipo III) semelhante a um complexo de agulha. (B) Ilustração dos principais fatores de virulência de *P. aeruginosa*. Abreviaturas: ADP- difosfato de adenosina; Asialo-GM1- asialo-gangliotetraocil ceramida 1; EF2- fator de alongamento 2; FpvA- receptor férrico de pyoverdina; PA- ácido fosfatídico; RAS- ribosiltransferase; SOD1- superóxido dismutase 1 (ALHAZMI, 2015).

Pseudomonas aeruginosa possui um dos mais complexos sistemas de sinalização estudados, envolvendo múltiplas sinalizações interconectadas que regulam de forma coordenada sua virulência e persistência. Entre eles o *Quorum sensing* (QS), que permite a sinalização de célula para célula através de pequenas moléculas, metabólitos secundários, que ao atingir uma concentração limiar, atuam como co-fatores de reguladores transcricionais, que permitem a expressão gênica coordenada, em toda população, de genes de sobrevivência e genes que codificam fatores de virulência e fatores essenciais na formação de biofilme (JIMENEZ et al., 2012; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Mais de 10% dos genes de *P. aeruginosa* e mais de 20% do proteoma bacteriano expresso são regulados por QS e estão envolvidos principalmente na produção de fatores de virulência, motilidade ou interrupção de mobilidade e desenvolvimento de biofilme, mecanismos de resistência a antibióticos e no

ajuste das vias metabólicas para respostas ao estresse (GELLATLY; HANCOCK, 2013; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Os biofilmes microbianos são comunidades altamente organizadas e estruturadas, que podem se formar em superfícies abióticas e bióticas, e sua formação está intrinsecamente ligada ao QS. Estão envoltas em uma matriz constituída por polímeros extracelulares (EPS), contendo polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular (eDNA) e lipídios, que propicia um nicho favorável a intensa interação célula-célula, bem como um reservatório de substâncias metabólicas, nutrientes e energia para promover o crescimento enquanto protege as células de condições desfavoráveis. Os exopolissacarídeos Psl, Pel e alginato são importantes constituintes da matriz de biofilme de *P. aeruginosa*. Psl e alginato estão envolvidos na adesão da superfície e desempenham um papel importante na proteção contra fagocitose e estresse oxidativo durante infecção, além de conferir proteção contra agentes anti-biofilme, como drogas antibacterianas. Pel apresenta um importante papel na iniciação e manutenção da interação célula-célula no biofilme. Entre os constituintes proteicos, flagelos e pili tipo IV são importantes durante a maturação do biofilme, e junto com o eDNA contribuem na formação da arquitetura do biofilme maduro (GELLATLY; HANCOCK, 2013; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Um importante mecanismo de evasão do sistema imune hospedeiro é a conversão de um estilo de vida planctônico para um estilo sésil, gerando um fenótipo mucoide, que regula negativamente a expressão de flagelo, com perda da motilidade e potencializa a secreção de alginato (LOVEWELL; PATANKAR; BERWIN, 2014). Essa alteração fenotípica atenua a vulnerabilidade à fagocitose, gerando um fenômeno conhecido como “fagocitose frustrada”, que consiste no acúmulo de neutrófilos e macrófagos na superfície do biofilme, entretanto, não conseguem mais engolfar o patógeno, e permanecem ativados em um estado secretor de compostos, gerando danos em tecidos adjacentes do hospedeiro (MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014).

O tratamento das infecções por *P. aeruginosa* constitui um grande desafio devido à capacidade dessas bactérias desenvolverem os mais variados mecanismos de resistência, incluindo mecanismos intrínsecos, adquiridos e adaptativos, que podem estar presentes simultaneamente dentro do mesmo

isolado, apresentando um perfil multi-droga resistente (MDR) (GELLATLY; HANCOCK, 2013; STREETER; KATOULI, 2016)

Entre os antibióticos clássicos utilizados no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, destacam-se os aminoglicosídeos (gentamicina); a ticarcilina; os beta-lactâmicos, como ureidopenicilinas, ceftazidima, cefepima, aztreonam; os carbapenêmicos; e as fluorquinolonas, como ciprofloxacina e levofloxacina. Devido ao crescente aumento de resistência, mesmo com terapias combinadas, e a pouca disponibilidade de novos medicamentos, drogas que antes foram abandonadas, devido a elevada toxicidade, estão sendo novamente utilizadas, como é o caso das polimixinas (colistina) (CHATTERJEE et al., 2016; EL SOLH; ALHAJHUSAIN, 2009).

2.4.2 Resposta imune respiratória frente a *P. aeruginosa*

Os receptores de reconhecimento de padrões transmembrana (PRR) mais importantes na defesa contra *P. aeruginosa* são os receptores do tipo *Toll* (TLR) 2, 4 e 5, que reconhecem pili, LPS e flagelos, respectivamente. Células epiteliais das vias aéreas com CFTR defeituoso, apresentam uma diminuição da expressão de TLR4 e, portanto, diminuição da resposta para LPS de *P. aeruginosa*. Outro PRR envolvido no reconhecimento é o TLR9, localizado no citosol da célula epitelial, apresenta capacidade de detectar DNA bacteriano (DNA CpG). O reconhecimento por esses PRRs resulta na ativação de NF- κ B via Myd88 e IL-1 β /IL-1R. Ocorre também o reconhecimento por receptores NOD-1 e NOD-2, receptores citosólicos que reconhecem componentes bacterianos como o ácido diaminopimérico e dipeptídeo muramil, respectivamente. Esses receptores estão localizados nas células epiteliais, macrófagos, células dendríticas e também em eosinófilos, e, quando ativados, desencadeiam cascatas de sinalização que culminam com a ativação de fatores transcricionais, levando à produção de TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, e quimiocinas, como RANTES (CCL5) e MCP-1, que irão atuar no intenso recrutamento de células fagocíticas, e, em paralelo, irão também promover a ativação do sistema imune adaptativo, sempre na tentativa de eliminar o patógeno e controlar a infecção (ASHKAR; ROSENTHAL, 2002; IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; MEDZHITOV, 2001;

TRAVASSOS et al., 2005; WHITSETT, 2002; WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010).

Entretanto, o papel do sistema imune adaptativo na defesa contra infecções pulmonares por *P. aeruginosa* não está totalmente esclarecido, pois a maioria dos pacientes que se torna susceptível à colonização apresenta defeitos em seus mecanismos de defesa do sistema imune inato, incluindo os pacientes com imunodeficiências adaptativas, que geralmente apresentam também alguma alteração na imunidade inata (WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010).

De modo geral, e como pode ser observado nas infecções fúngicas, as células T são de extrema importância, e a tendência para formar uma resposta Th1, com intensa produção de IFN- γ e geração de células T citotóxicas, são mais eficientes na eliminação das infecções pulmonares por *P. aeruginosa* do que as respostas Th2. Além disso, a presença das citocinas IL-17 e/ou IL-23, não apenas desempenha um importante papel na regulação e modulação de componentes do sistema imune inato, mas também de numerosos componentes do sistema adaptativo, modulando uma resposta mediada por linfócitos Th17, que promove o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010; WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010). Alguns estudos mostraram que pacientes com FC e afetados pela infecção crônica por *P. aeruginosa* apresentaram uma resposta Th2 dominante, enquanto que pacientes com FC que ainda não estavam cronicamente infectados demonstraram níveis mais altos de IFN- γ , maior função pulmonar e uma resposta Th1 / Th2 mais equilibrada (MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014).

Com relação à resposta humoral, pacientes com infecções persistentes por *P. aeruginosa* geram títulos de anticorpos, no entanto, esses anticorpos são insuficientes para a resolução da infecção, acredita-se que esta resposta de anticorpos seja responsável para prevenir a disseminação sistêmica de *P. aeruginosa*, uma vez que não é comum o desenvolvimento de bacteremia ou sepsis por pacientes com infecção persistente (MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014; WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010).

A imunoglobulina A (IgA) é outra importante molécula protetora, secretada pela mucosa do trato respiratório, presente no muco em grandes quantidades. Durante a infecção persistente por *P. aeruginosa*, mostra-se em quantidades ainda maiores, entretanto, a elevação dos níveis de IgA não é suficiente para conferir proteção. Contudo, pacientes com deficiência na secreção de IgA estão mais susceptíveis à infecção (WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010)

2.5 *Staphylococcus aureus* e Infecções das Vias Aéreas

Outra importante bactéria, que também apresenta capacidade de inibição do crescimento *in vitro* de *Cryptococcus* e compartilha nichos comuns no hospedeiro, é *Staphylococcus aureus*, um patógeno oportunista e resiliente, capaz de colonizar as superfícies de mucosas, causando inúmeras doenças graves, inclusive pneumonias. *S. aureus* se destaca como um dos principais agentes coinfectantes envolvidos em doenças polimicrobianas, podendo estabelecer interações de cooperação, que vão atuar de forma sinérgica, aumentando a gravidade da doença, ou estabelecer interações de competição, nas quais um dos patógeno age de forma antagônica, inibindo a atuação do outro microorganismo envolvido na infecção. Alguns estudos relataram interações cooperativas entre *S. aureus* e *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae* com o vírus influenza; e interações antagônicas entre *S. aureus* e *P. aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus* sp. e *Corynebacterium* sp.. (NAIR et al., 2014).

A capacidade de *S. aureus* inibir o crescimento de *C. neoformans* é dependente de contato célula-célula. *S. aureus* possui uma adesina, a triose-fosfato isomerase (TPI), uma enzima glicolítica, capaz de se ligar a resíduos de manose α -1,3 glucana, presentes na fração GXM da cápsula polissacarídica do fungo, promovendo a morte da levedura, que possivelmente ocorre via mecanismos de indução de apoptose (FURUYA; IKEDA, 2009; IKEDA, 2011; IKEDA et al., 2007). Como esses microorganismos podem coexistir no trato respiratório superior, constituindo um local primário para infecção criptocócica em animais e nicho de colonização por *S. aureus*, alguns autores consideram que essa bactéria poderia inibir a colonização da mucosa respiratória por

Cryptococcus, e a cápsula fúngica com um papel importante para modular essa interação. Assim, a identificação de moléculas que desempenham papéis nesta adesão e nesta morte pode levar a novas abordagens para a prevenção e terapia da criptococose (SAITO; IKEDA, 2005).

A figura 5 ilustra a aderência de *S. aureus* em torno de *C. neoformans*.

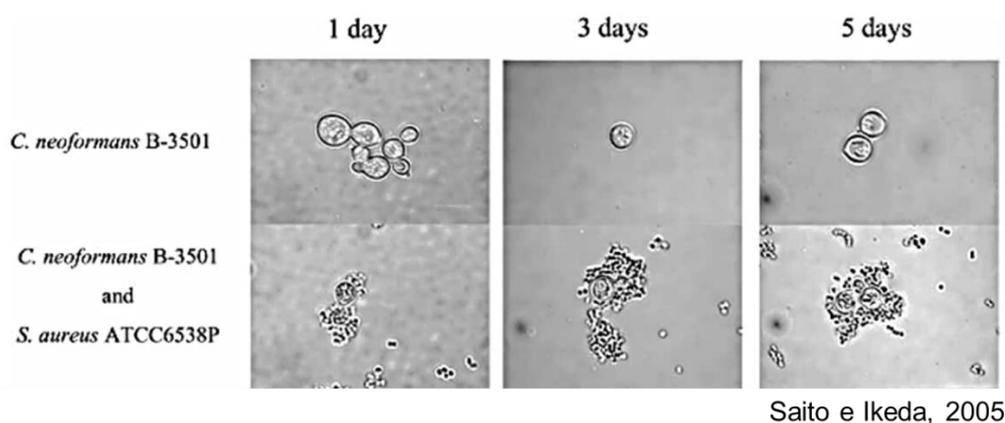


Figura 5: Aderência de *S. aureus* a *C. neoformans*.

Staphylococcus aureus são bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas, esféricas, caracterizadas por cocos individuais que se dividem em mais de um plano, formando aglomerados semelhantes a cachos de uvas. Apresentam aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, são imóveis, não-esporuladas, geralmente não-encapsuladas, coagulase positivas e estão presentes em diversos nichos ambientais (RITA COSTA et al., 2013; SANTOS et al., 2007). Caracteriza-se como a espécie mais virulenta do gênero *Staphylococcus*, capaz de causar amplo espectro de doenças agudas e crônicas, envolvendo desde lesões superficiais e localizadas até pneumonia, meningite, endocardite, osteomielite e septicemia, além das toxinoses, como intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico. É capaz de colonizar de forma assintomática a pele e as mucosas de indivíduos saudáveis, em particular as mucosas nasais (RITA COSTA et al., 2013; SANTOS et al., 2007). Alguns estudos estimaram que cerca de 20% da população são permanentemente colonizadas por essa bactéria, e 60% são portadores transitórios (NAIR et al., 2014). Dessa forma, o corpo humano constitui um dos principais reservatórios e importante fonte de disseminação dessa bactéria, que

pode ser transmitida pelo ar, e por contato de mãos e objetos contaminados (MAN; DE STEENHUIJSEN PITERS; BOGAERT, 2017; WERTHEIM et al., 2005).

Staphylococcus aureus é uma das principais causas de infecções da pele e dos tecidos moles, sendo responsável por mais de 10 milhões de consultas ambulatoriais e 500.000 internações anualmente nos Estados Unidos (LACEY; GEOGHEGAN; MCLOUGHLIN, 2016). Infecções por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA – do inglês *methicillin resistant S. aureus*) são classificadas como a segunda causa mais comum de infecções da corrente sanguínea adquiridas no ambiente hospitalar. Também acomete cerca de 20% dos pacientes submetidos à cirurgia (WERTHEIM et al., 2005). Essa bactéria é a segunda maior causa de meningites associadas a derivações ventrículo peritoneais (DVP), também acomete pacientes que sofreram alguma alteração no SNC, traumatismo, cirurgia e com tumores malignos. É um dos muitos agentes responsáveis por peritonite em pacientes submetidos a diálise peritoneal contínua. Também é a bactéria mais comum em infecções ósseas, artrites sépticas e infecções de próteses ósseas, que se caracterizam pela dificuldade de tratamento, necessitando intervenções cirúrgicas e antibioticoterapia prolongada (SANTOS et al., 2007; TONG et al., 2015).

Historicamente, a pneumonia estafilocócica acometia lactentes e idosos, particularmente após infecção por influenza. Entretanto, junto com a bacteremia, a pneumonia relacionada a MRSA tem sido reconhecida como uma das doenças mais prevalentes, não sendo mais exclusiva do ambiente hospitalar. Em 2005, foram registradas nos EUA mais de 18.500 mortes atribuídas a MRSA, envolvendo indivíduos imunocomprometidos e um grande número de indivíduos saudáveis em contato próximo com indivíduos infectados. Além disso, a pneumonia causada por *S. aureus* é uma complicação grave em indivíduos com FC e pacientes em uso de terapia imunossupressora (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011; PARKER; PRINCE, 2012).

No Brasil, ainda não é conhecida a real prevalência de MRSA e CA-MRSA (CA siglas do inglês *Community-Acquired* – MRSA adquirida na comunidade), devido à escassez de publicações referentes à ocorrência dessas infecções, o

que representa um grave problema nacional, dificultando a implementação de medidas de controle, manejo e prevenção (EVANGELISTA; OLIVEIRA, 2015).

Uma característica específica das pneumonias por CA-MRSA é a ocorrência de pneumonia necrotizante, caracterizada por uma resposta inflamatória intensa e desregulada do hospedeiro, apresentando um recrutamento rápido e excessivo de neutrófilos para o local da infecção, causando lesão de rápida progressão, com desconforto respiratório, derrame pleural, hemoptise e leucopenia (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011).

2.5.1 Principais fatores de virulência e mecanismos de patogênese envolvidos nas infecções do trato respiratório causadas por *S. aureus*

O processo de colonização está associado com uma variedade de adesinas que auxiliam a fixação bacteriana na superfície da célula hospedeira. Assim, mais de 20 diferentes proteínas de superfície, denominadas componentes de superfície microbiana reconhecendo moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMs – sigla do inglês *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), são expressas em *S. aureus*. As principais proteínas deste grupo são: proteína estafilocócica A (SpA), proteínas de ligação a fibronectina A e B (FnbpA e FnbpB), proteína de ligação ao colágeno, proteínas do fator de aglutinação ou *Clumping* (Clf) A e B, proteína associada a biofilme (Bap), determinantes de superfície A e B regulada por ferro (IsdA, IsdB) (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011; WARYAH et al., 2016).

A proteína A (SpA) é considerada o componente mais complexo devido a múltiplas interações com o sistema imune do hospedeiro. É expressa de forma abundante por praticamente todas as cepas, capaz de se ligar ao fator Von Willebrand, uma glicoproteína que medeia a adesão plaquetária em locais de dano endotelial. Também é capaz de ligar-se a porção Fc das imunoglobulinas G (IgG) e a fatores do complemento, como C1q, interferindo na opsonização e fagocitose. Além disso, pode se ligar a porção Fab de receptores de células B, induzindo uma expansão inespecífica dessas células, comprometendo a resposta imune adaptativa. Acredita-se que SpA apresenta um efeito direto sobre as células epiteliais respiratórias, induzindo a expressão de IL-8 e

promovendo o recrutamento de polimorfonucleados para as vias aéreas, desempenhando assim, um papel crucial na pneumonia (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011; PARKER; PRINCE, 2012; PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

As proteínas de ligação à fibronectina estão envolvidas na aderência de *S. aureus* a células epiteliais indiferenciadas das vias aéreas, mediando sua internalização nessas células. A proteína de ligação ao colágeno atua na ligação de substratos e tecidos de colágeno. As proteínas do fator *Clumping A* e *B* estão envolvidas na adesão ao fibrinogênio. ClfA desempenha um papel antifagocítico em neutrófilos e macrófagos e ClfB atua mediando a adesão às citoqueratinas em células epiteliais nasais. Dessa forma, essas proteínas reconhecem componentes específicos do hospedeiro, sendo fatores especialmente relevantes para a infecção de tecidos moles (PARKER; PRINCE, 2012; RITA COSTA et al., 2013).

As proteínas IsdA e IsdB estão envolvidas na aquisição de ferro para proliferação em mamíferos. *S. aureus* expressa dois sistemas de aquisição heme, o sistema de transporte (Hts) e as proteínas IsdA e IsdB, que são capazes de utilizar hemoglobina como fonte de ferro. *S. aureus* tem maior afinidade para hemoglobinas de humanos em comparação com a hemoglobina murina, assim, camundongos são menos susceptíveis que humanos às infecções sistêmicas, entretanto, esse fato não inviabiliza a utilização desses animais como modelo nos estudos dos fatores de virulência envolvidos na patogênese. *S. aureus* também expressa a proteína Fur, que atua na regulação de virulência dependente de ferro. Na presença de ferro, Fur é capaz de aumentar a expressão dos sistemas de transporte de ferro (Hts, Isd) e das proteínas CHIPS (sigla do inglês *Chemotaxis inhibitory protein of S. aureus*) e SCIN (sigla do inglês *Staphylococcal complement inhibitor*), que são proteínas imunomoduladoras e atuam inibindo a quimiotaxia/ativação de neutrófilos e do sistema do complemento, respectivamente (PARKER; PRINCE, 2012; RITA COSTA et al., 2013).

Também podem ser expressos na superfície celular os polissacarídeos capsulares, que atuam inibindo a fagocitose por neutrófilos, auxiliam a colonização bacteriana e a persistência nas superfícies mucosas, além das

estafiloxantinas, que são pigmentos carotenoides e conferem resistência aos metabólitos oxidativos dos fagócitos (RITA COSTA et al., 2013).

Além dos fatores de virulência presentes na superfície celular, *S. aureus* é capaz de secretar várias exoproteínas que são importantes na patogênese. Assim, secretam várias exotoxinas e enzimas, incluindo nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase, que atuam convertendo o tecido hospedeiro local em nutrientes necessários para o crescimento (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011; RITA COSTA et al., 2013). As exotoxinas citolíticas formam poros cilíndricos na membrana plasmática, levando à lise de células alvo. *S. aureus* secreta várias toxinas citolíticas, entre elas destacam-se as toxinas α , β , e γ , leucocidina e leucocidina de Panton-Valentine (PVL) (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011). A α -hemolisina interage com lipídios de membrana e mais recentemente foi mostrado que interage com o receptor celular ADAM10, uma metaloprotease. A interação α -toxina-ADAM10 é responsável pela ação citotóxica em baixas concentrações dessa toxina e ativa uma série de eventos de sinalização intracelular, que vão levar ao aumento da permeabilidade das células epiteliais das vias aéreas. A toxicidade da α -hemolisina está associada a formação do poro e influxo de cálcio extracelular na célula. O aumento do cálcio intracelular estimula a hidrólise dos fosfolipídios e produção de metabólitos do ácido araquidônico, como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxano A₂. Além disso, essa toxina promove a geração de óxido nítrico nas células endoteliais e epiteliais, ativação de proteína quinase C e indução da translocação nuclear NF- κ B. Juntos esses eventos levam à produção de IL-1 β e IL-18 e indução do inflamassoma via ativação de caspase-1, promovendo morte celular por piroptose (BERUBE; WARDENBURG, 2013).

A contribuição da β -toxina de *S. aureus* para a infecção pulmonar é menos conhecida, parece funcionar como uma esfingomielinase, desestabilizando a membrana plasmática (HUSEBY et al., 2007; KONG; NEOH; NATHAN, 2016). PVL é classificado como uma citolisina bicomponente (LukF-PV e LukS-PV) que se insere na membrana plasmática do hospedeiro para formar um poro. A leucocidina PVL exibe uma alta afinidade em relação aos leucócitos e está associada a pneumonia necrotizante. As toxinas γ -hemolisina e leucocidina são

citotóxicas para eritrócitos e leucócitos, respectivamente (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011).

As PSMs (modulinas solúveis em fenol), que incluem δ -hemolisina, PSM α 1-4, PSMmec, e PSM β 1-2, são peptídeos multifuncionais capazes de induzir liberação de citocinas, promover hemólise, lise de neutrófilos e de várias organelas, como lisossomos e protoplastos bacterianos, além de contribuir para formação de biofilme. *In vitro*, δ -toxina age sinergicamente com β -toxina para facilitar a fuga estafilocócica dos endossomos nas células epiteliais das vias aéreas (KONG; NEOH; NATHAN, 2016; PARKER; PRINCE, 2012).

Staphylococcus aureus também produz um grupo de exotoxinas, que incluem a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), as enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG, SEH e SEI) e as toxinas esfoliativas (ETA e ETB). A TSST-1 e as enterotoxinas são conhecidas como superantígenos pirogênicos, com poderosas propriedades imunoestimuladoras, desencadeando a ativação e proliferação de células T por meio da interação inespecífica com MHC-II de células apresentadoras de antígeno e com receptores de células T, formando um complexo trimolecular (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011; OTTO, 2014; PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

Além das exotoxinas, *S. aureus* é capaz de secretar proteínas específicas que podem causar um profundo impacto no sistema imune inato e adaptativo, inibindo a ativação do complemento e a migração de neutrófilos para o local da infecção. Alguns exemplos são: CHIPS (proteína de *S. aureus* inibitória de quimiotaxia) e FLIPr (proteína inibidora do receptor de formil peptídeo) podem bloquear os receptores de neutrófilos para quimioatrativos; SCIN (proteína de *S. aureus* inibidora do complemento) é um inibidor da C3 convertase e, conseqüentemente, inibe a fagocitose por neutrófilos; SAK (estafiloquinase) é capaz de se ligar a α -defensinas, inativando suas propriedades bactericidas, além disso é capaz de ativar plasminogênio em plasmina, degradando coágulos de fibrina, diminuindo a função da malha de fibrina na manutenção de uma infecção localizada; Efb (proteína de ligação ao fibrinogênio extracelular) inibe as vias de ativação do complemento, clássica e alternativa; Eap (proteína de

aderência extracelular) bloqueia a migração de neutrófilos dos vasos sanguíneos para o tecido (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011; RITA COSTA et al., 2013).

Muitas outras enzimas são secretadas por *S. aureus* e degradam proteínas hospedeiras, causando destruição tecidual. A protease aureolisina cliva muitas proteínas, incluindo insulina B. A glutamil endopeptidase SspA cliva os resíduos de glutamato. Aureolisina, SspA e as cisteína proteases staphopain A e B interferem com os fatores do complemento, protegendo as células bacterianas do sistema imune inato. Também produz duas coagulases, a estafilocagulase e a proteína de ligação ao fator von Willebrand (vWbp), que contribuem para a formação de coágulos de fibrina. Essas coagulases se ligam à protrombina, formando um complexo chamado estafilotrombina, e a várias outras proteínas plasmáticas, desencadeando a conversão de fibrinogênio em fibrina, levando a formação de coágulos de fibrina em torno da superfície de *S. aureus*, o que inibe a fagocitose, promove a formação de abscessos e favorece a adesão de *S. aureus* em cateteres durante a infecção associada ao biofilme (CHENG et al., 2010; OTTO, 2014; THOMER; SCHNEEWIND; MISSIAKAS, 2013).

A figura 6 ilustra os principais fatores de virulência descritos, que apresentam grande relevância na patogênese de *S. aureus*.

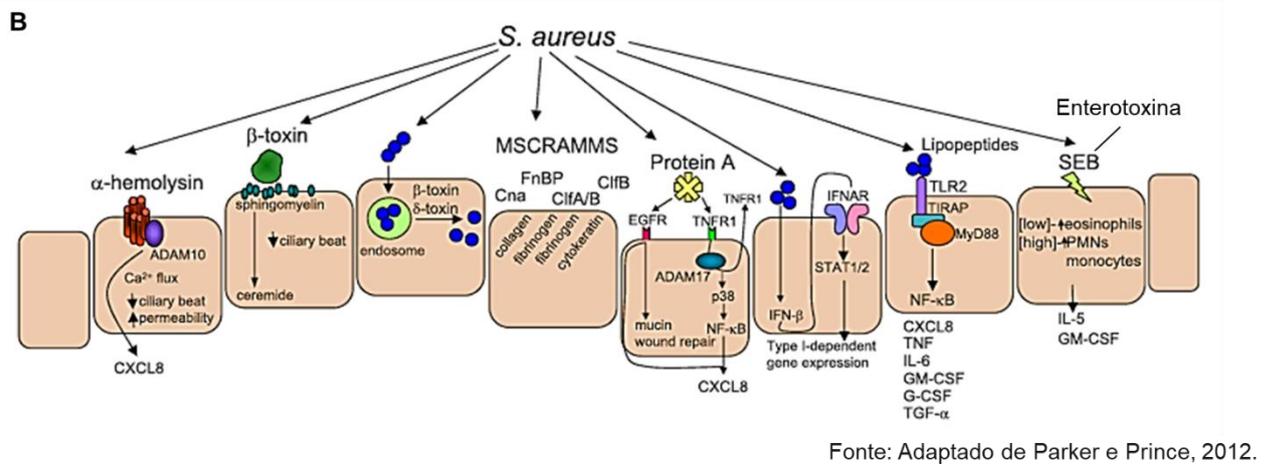
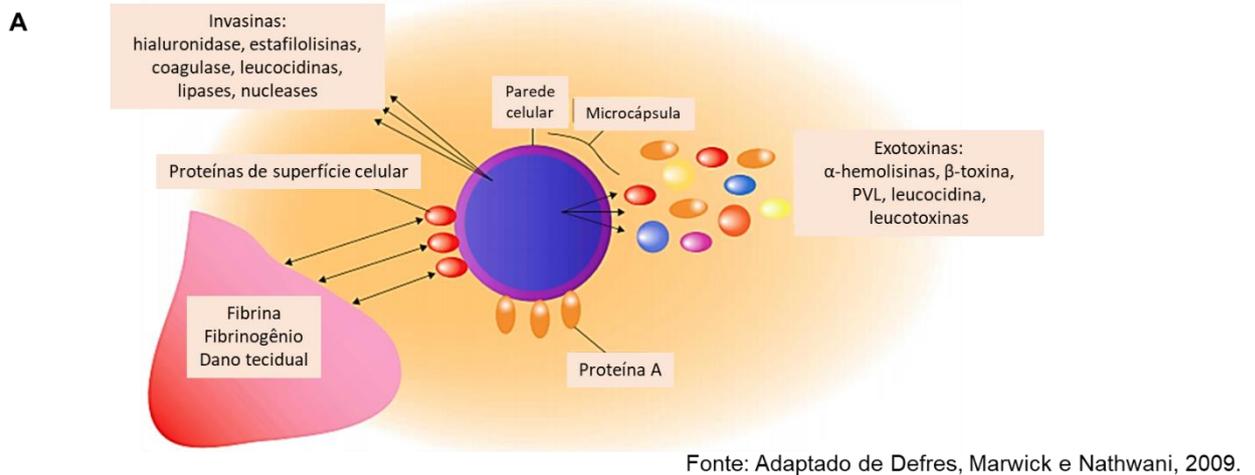


Figura 6: Principais fatores de virulência, produzidos por *S. aureus*. (A) Principais fatores de virulência, produzidos por *S. aureus*, envolvidos nos mecanismos de patogênese. PVL: leucocidina de Pantón-Valentine. (B) Ilustração dos fatores de virulência e cascatas de sinalização do hospedeiro ativadas por *S. aureus* no epitélio das vias aéreas já descritos. *Receptor TNF (TNFR1) é expresso em muitos diferentes tipos de células e inicia a ativação da cascata de TNF pró-inflamatória e anti-apoptótica. *EGFR (sigla do inglês *epidermal growth factor receptor*) medeia uma série de eventos de sinalização no epitélio das vias aéreas e responde a vários ligantes diferentes. A ativação de EGFR induz a produção de mucina, um importante componente físico das defesas inatas do pulmão.

2.5.2 Resposta imune respiratória a *S. aureus*

A resposta imune inicial contra *S. aureus* é realizada por células epiteliais das vias aéreas, que recrutam imediatamente vários tipos celulares, incluindo células dendríticas (DCs), macrófagos e células T, resultando em um intenso recrutamento de neutrófilos, de grande importância na depuração estafilocócica. As células epiteliais reconhecem componentes da parede celular bacteriana, incluindo o ácido teicóico, ácido lipoteicóico, peptidoglicano (PG) e lipoproteínas. Além disso, as toxinas secretadas, como α -toxina, β -hemolisina e PVL são neutralizadas pela presença de IgA pré-formada na mucosa das vias aéreas (BEKEREDJIAN-DING; STEIN; UEBELE, 2015; PARKER; PRINCE, 2012).

TLR2 é o principal receptor de superfície envolvido no reconhecimento epitelial de bactérias Gram-positivas comensais, como *S. aureus*. Este receptor também é expresso em células endoteliais e leucocitárias, e reconhece o ácido lipoteicóico (LTA) na parede celular estafilocócica, apresentando grande relevância no desenvolvimento de uma resposta imune inata. O fator de virulência PVL também ativa diretamente um pequeno grupo de genes via sinalização por TLR2, que incorpora os adaptadores CD14 e MyD88, levando à ativação de NF- κ B. A detecção via TLR2 não consegue distinguir entre bactérias viáveis e mortas e pode variar conforme variações na parede celular, dependendo do estado proliferativo e metabólico. TLR1 e TLR6 também reconhecem lipoproteínas presentes na parede celular de *S. aureus* (BEKEREDJIAN-DING; STEIN; UEBELE, 2015; FOURNIER; PHILPOTT, 2005). A interação com esses TLRs resulta na produção de uma variedade de citocinas, incluindo IL-1 β , GM-CSF, G-CSF, CXCL8 e TGF- α , assim como os peptídeos antimicrobianos β -defensinas. A ativação de G-CSF e GM-CSF é importante para garantir a sobrevivência dos neutrófilos (BEKEREDJIAN-DING; STEIN; UEBELE, 2015; PARKER; PRINCE, 2012).

Após invasão de células epiteliais (ou escape dos endossomos de fagócitos profissionais), o reconhecimento de *S. aureus* pelo sistema imune, ocorre via ligação do PG por receptores Nod. O receptor Nod2 reconhece o dipeptídeo muramil presente no PG dessas bactérias Gram-positivas. A

estimulação de TLR2 representa um importante co-estímulo para o reconhecimento de PG via Nod2 e vice-versa (BEKEREDJIAN-DING; STEIN; UEBELE, 2015). O reconhecimento de PG ou de toxinas, como a α -toxina, pelos receptores Nod2 também desencadeia uma cascata de sinalização que culmina com a ativação de NF- κ B, e intensa produção de citocinas. Assim, a doença causada por *S. aureus* é decorrente da intensa resposta inflamatória que ocorre no local da infecção. O reconhecimento de produtos de degradação de PG ou de DNA microbiano por receptores citosólicos leva a ativação de inflamassomas NLRP3, NLRC5 e AIM2, dependente de caspase-1, promovendo a ativação de IL-1 β e IL-18, levando a morte celular por piroptose (BEKEREDJIAN-DING; STEIN; UEBELE, 2015; PARKER; PRINCE, 2012).

O recrutamento de IL-17, dependente de NLRP3/IL-1 β , produzido por células T $\gamma\delta$ é necessário para o recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção. Além disso, foi observado que *S. aureus* pode ativar a produção de IL-17 por células dendríticas e monócitos. Essas observações mostraram a coexistência de mecanismos do sistema imune inato para induzir uma resposta mediada por células Th17. A condução para uma resposta imune mediada por células Th2 foi atribuída à incapacidade de ativação inflamassoma NLRP3 (BEKEREDJIAN-DING; STEIN; UEBELE, 2015; PARKER; PRINCE, 2012).

Outro fator importante, produzido a partir do reconhecimento de componentes da parede celular, DNA e RNA bacteriano por receptores TLRs, NLRs e outros receptores citosólicos, é o IFN tipo I, que amplifica a inflamação por meio da indução de quimiocinas CXCR3 (CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) e CXCL11 (I-TAC)), além de promover o recrutamento de células Th1 e Th17 (PARKER; PRINCE, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar, em modelo murino, a influência de *P. aeruginosa* e *S. aureus* na progressão da criptococose experimental causada por *C. gattii*.

3.2 Específicos:

3.2.1 *P. aeruginosa* X *C. gattii*

- Avaliar ***in vitro*** aspectos da interação fungo, bactéria e hospedeiro:
 - realizar o co-cultivo do fungo *in vitro* na presença da bactéria (*P. aeruginosa*);
 - determinar a atividade inibitória de metabólitos produzidos por diferentes cepas de *P. aeruginosa* contra *Cryptococcus*
 - avaliar atividade fagocítica e fungicida de macrófagos contra *C. gattii* na presença de *P. aeruginosa* por meio da realização dos ensaios de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS).
- Estabelecer um modelo experimental para testes ***in vivo*** de coinfeção entre a bactéria *P. aeruginosa* e o fungo *C. gattii* (Pa X Cg).
 - Selecionar melhor cinética de infecção e inóculos de *P. aeruginosa* para estudar coinfeção com *C. gattii*.
 - Avaliar a progressão da criptococose em camundongos infectados ou não com a bactéria (*P. aeruginosa*) nos tempos escolhidos, de forma a determinar:
 - a sobrevivência dos animais – perfil de mortalidade;
 - alterações comportamentais (protocolo SHIRPA) – perfil de morbidade;
 - carga fúngica e bacteriana em órgãos alvos (lavado bronco alveolar, pulmão e cérebro);

- resposta inflamatória por meio de contagem diferencial de células no lavado bronco alveolar e quantificação de citocinas;

3.2.2 **S. aureus X C. gattii**

- Avaliar ***in vitro*** aspectos da interação fungo, bactéria e hospedeiro:
 - determinar a atividade inibitória de metabólitos produzidos por *S. aureus* contra *Cryptococcus*
 - avaliar atividade fagocítica e fungicida de macrófagos contra *C. gattii* na presença de *S. aureus* por meio da realização dos ensaios de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS).
- Estabelecer um modelo experimental para testes ***in vivo*** de coinfeção entre a bactéria *S. aureus* e *C. gattii* (Sa X Cg)
 - selecionar melhor cinética para coinfeção e avaliar a progressão da criptococose em camundongos infectados com a bactéria (*S. aureus*), de forma a determinar:
 - a sobrevivência dos animais;
 - alterações comportamentais;
 - carga fúngica e bacteriana em órgãos alvos;
 - resposta inflamatória por meio de contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar e quantificação de citocinas;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Manutenção de *C. gattii*, *C. neoformans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*

Neste estudo foi utilizada a linhagem de *C. gattii* L27/01(VGI) de origem clínica, pertencente à coleção de microrganismos do laboratório de micologia do Departamento de Microbiologia da UFMG, mantida em meio líquido Sabouraud Dextrose (Difco) e glicerol a 25%, à -80°C. Outras linhagens de *Cryptococcus*, tais como, *C.gattii* R265 (VGII) e *C. neoformans* H99 (VNI), pertencentes à coleção citada, foram também utilizadas para análises *in vitro*, sendo mantidas nas mesmas condições.

Da mesma forma, foram utilizadas cepas de *P. aeruginosa* (Pa) ATCC27853 (Manassas, VA, USA) e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (Manassas, VA, USA) mantidas em meio líquido BHI (Acumedia Neogen Corporation, Michigan, USA) e glicerol a 25%, à -80°C.

Outras cepas de *P. aeruginosa* como: PAO1, PAK, PA103 e mutantes PAK Δ exoS e Pa103 Δ esxoU; a cepa parental PAO1 e suas mutantes PAO1 Δ H1, PAO1 Δ H2, PAO1 Δ H3, PAO1 Δ H1 Δ H2, PAO1 Δ H1 Δ H3, PAO1 Δ H2 Δ H3, PAO1 Δ H1 Δ H2 Δ H3, todas apresentando deleções relacionadas ao T6SS; e a cepa parental PA14 e suas mutantes PA14 Δ pscN, PA14 Δ pscN Δ H2, PA14 Δ pscN Δ vgrG14rhs14, apresentando deleções relacionadas ao T6SS e todas mutadas no T3SS, com deleção no gene pscN, utilizadas nos testes *in vitro*, foram gentilmente cedidas pela professora Dra Alessandra Mattos Saliba, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, sendo mantidas nas mesmas condições, diferença apenas para as cepas mutantes mantidas em meio LB (Luria-Bertani) (Acumedia®) e glicerol a 25%, à -80°C.

Ensaio *in vitro*

4.2 Determinação *in vitro* da atividade inibitória de metabólitos secretados por diferentes cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus* contra *Cryptococcus*.

4.2.1 Preparo dos inóculos bacterianos e fúngicos

Diferentes cepas de *P. aeruginosa* (Pa (ATCC27853), PAK, PA103, PAO1) e de *S. aureus* (Sa) foram cultivadas por 24 horas, em placas de ágar Cetrimide (Acumedia – Neogen Corporation, Michigan, USA), a 37°C. Em seguida, para cada cepa foi realizado um novo repique nas mesmas condições, por tempo máximo de 8 horas. As colônias de cada cepa de *P. aeruginosa* e de *S. aureus* foram inoculadas em 4 mL de salina apirogênica (Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) até a obtenção de uma absorvância de aproximadamente 1.040 (densidade óptica (DO) a 600 nm = 1.040, correspondente à escala nefelométrica de Mc Farland número 5, equivalente a $1,5 \times 10^9$ UFC/mL). Em seguida, esse volume foi centrifugado a 8000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet, contendo as células bacterianas, ressuspenso em 1mL de salina apirogênica. Desta suspensão, foi utilizado 5 µL, equivalente a aproximadamente 10^6 UFC. Os inóculos foram confirmados por plaqueamento da suspensão bacteriana.

Para *Cryptococcus* (L27/01, R265, H99), após cultivo das leveduras em meio ágar Sabouraud Dextrose - ASD (Difco), colônias foram suspensas em salinas até a obtenção de uma transmitância de aproximadamente 75 a 77% (densidade óptica (DO) a 530 nm), contendo aproximadamente 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. A concentração do inóculo foi ajustada de modo que cada 40 µL contenha aproximadamente 10^4 UFC.

4.2.2 Método de antagonismo de *spot-on-the-lawn*

Para avaliar a inibição *Cryptococcus* por produtos secretados por *P. aeruginosa* e por *S. aureus* foi realizado o método de antagonismo de *spot-on-the-lawn*, de acordo com Harris et al., 1989, com algumas modificações (HARRIS

et al., 1989). Inicialmente, 5 μ L de inóculo foram semeados sob forma de pontos (*spot*) em placas de Petri, contendo ágar BHI e incubados a 37 °C durante 18 horas, com bom crescimento evidente. As células bacterianas foram então inativadas com 1 mL de clorofórmio colocado sobre as tampas de cada placa. Após incubação, em temperatura ambiente, por 30 minutos, as placas permaneceram destampadas até total evaporação do clorofórmio. Em seguida, as placas foram sobrepostas com 4 ml de ágar BHI *soft* (0,75% ágar) semeado com 40 μ L de inóculo fúngico, contendo *C. gattii* (L27/01; R265) ou *C. neoformans* (H99). Após incubação por 48 horas, a 37 °C, foi realizada leitura visual e mensuração da formação de halos de inibição no tapete formado por células de *Cryptococcus*. O mesmo foi realizado utilizando as cepas mutantes de *P. aeruginosa*.

Entretanto, para a avaliação de produtos secretados por PAK, Pa103 e suas respectivas mutantes (PAK Δ exoS e Pa103 Δ exoU), foi adicionado ao ágar BHI 5 mM do ácido etileno glicol-bis (b-aminoetilômetro) N, N, N', N' tetraacético (EGTA) (Sigma-Aldrich) e 20 mM de MgCl₂. Esses reagentes têm a função de quelar cálcio presente no meio e favorecer a expressão de T3SS e secreção de Exo S ou Exo U, as cepas mutantes não secretam essas exotoxinas mesmo na presença desses reagentes (SALIBA et al., 2006).

4.3 Co-cultivo entre cepas de *P. aeruginosa* x *Cryptococcus* spp. e *S. aureus* x *C. gattii*.

4.3.1 Preparo dos inóculos bacteriano e fúngico para co-cultivo

Os inóculos das bactérias foram preparados conforme descrito no item 4.2.1. Para *P. aeruginosa* a concentração do inóculo foi ajustada, por diluição em salina, de modo que em 200 μ L, volume total de meio para co-cultivo, tivesse aproximadamente 10⁵ UFC. Para *S. aureus* a concentração foi ajustada para 10³ UFC em 500 μ L de meio para co-cultivo. Os inóculos foram confirmados por plaqueamento da suspensão bacteriana.

Para *Cryptococcus* (L27/01, R265, H99), após cultivo das leveduras em meio ASD, colônias foram suspensas em salinas e o inóculo preparado conforme item 4.2.1, contendo aproximadamente 10^6 UFC/ml. A concentração do inóculo foi ajustada de modo que em 200 μ L, volume total de meio para co-cultivo, contenha aproximadamente 10^5 UFC.

4.3.2 Co-cultivo entre *P. aeruginosa* e *Cryptococcus*

Inicialmente foi realizado o co-cultivo de *C. gattii* L27/01 e Pa (ATCC27853), com diferentes inóculos de Pa (10^5 , 10^3 e 10^2 UFC) e 10^5 UFC de L27/01, para a escolha do melhor inóculo de bactéria a ser utilizado. Assim, diferentes inóculos iniciais de Pa (10^5 , 10^3 e 10^2 UFC) foram co-cultivados com um inóculo inicial de 10^5 UFC de L27/01, em placa de 96 poços, em 200 μ L de BHI, incubadas a 37 °C. Alíquotas de 50 μ L dos co-cultivos com diferentes inóculos foram coletadas e plaqueadas em meio ASD contendo 0,2 g/L de Cloranfenicol para inibição do crescimento das bactérias e quantificação das UFC de *C. gattii*. Foram realizadas coletas em diferentes tempos, após 1 hora, após 4 horas e após 12 horas de incubação, a 37 °C.

Após a escolha do melhor inóculo, foi realizado o co-cultivo de cada uma das cepas de *C. gattii* (L27/01, R265) e *C. neoformans* (H99) com cada uma das cepas de *P. aeruginosa* (Pa (ATCC27853), PAK, PA103, PAO1) em placa de 96 poços, em 200 μ L de BHI, contendo um inóculo inicial de 10^5 UFC de *P. aeruginosa* e 10^5 UFC de *C. gattii* ou de *C. neoformans*. As placas foram incubadas a 37 °C, por 4 horas e, após esse tempo, as co-culturas foram plaqueadas em meio ASD contendo 0,2 g/L de Cloranfenicol para quantificação das UFC fúngicas.

4.3.3 Co-cultivo entre *S. aureus* e *C. gattii*

Foi realizado o co-cultivo de cepas de *C. gattii* L27/01 com *S. aureus* em placa de 24 poços, em 500 μ L de RPMI 1640 (HyClone, LGC Biotecnologia), contendo um inóculo inicial de 10^3 UFC de *S. aureus* e 10^5 UFC de *C. gattii*,

condições de cultivo semelhantes às realizadas no ensaio de fagocitose. As placas foram incubadas a 37 °C, em 5% CO₂, por 3 e 6 horas e, após esses tempos, as co-culturas foram plaqueadas em meio ASD - contendo 100UI/mL de Penicilina- Estreptomina (Thermo Fischer Scientific – 10.000 U/mL) - para a quantificação das UFC fúngicas e em meio BHI - contendo 5 µg/mL de Anfotericina B (Cristália) - para a quantificação de UFC da bactéria. Os cultivos foram realizados em quadruplicatas – somente *S. aureus* (Sa), somente *C. gattii* (Cg) e co-cultivo entre Sa e Cg.

4.4 Cultivo de *C. gattii* L27/01 em sobrenadantes de culturas de diferentes cepas de *P. aeruginosa* (Pa – ATCC27853, PAO1, PAK e PA103) e *S. aureus* (Sa - ATCC33591)

Os inóculos das bactérias e de Cg foram preparados conforme descrito no item 4.2.1. Inicialmente foi cultivado 10 µL de cada inóculo bacteriano, com concentração de 10⁹ UFC/mL, em 20 mL de meio BHI líquido, por 18 horas, a 37°C. Em seguida, o meio de cultivo de cada bactéria foi centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de 0,22µm, obtendo um volume final de 5 mL. Assim, em cada sobrenadante obtido, a partir do cultivo de cada uma das bactérias, foi acrescentado 40 µL do inóculo de Cg, correspondendo aproximadamente a 10⁴ UFC. Os frascos de cultivo foram incubados a 37 °C, por 24 horas e, após esse tempo, as culturas foram plaqueadas em meio ASD para quantificação das UFC fúngicas. Para o controle do crescimento fúngico, 10⁴ UFC de Cg foram cultivados em meio BHI e em BHI diluído com salina (1,25 mL de salina + 3,75 mL caldo BHI). Os sobrenadantes filtrados foram cultivados em meio BHI, a 37°C, para controle de esterilidade. Os cultivos foram realizados em triplicatas.

4.5 Avaliação da susceptibilidade a piocianina

A susceptibilidade das amostras fúngicas frente a piocianina foi determinada segundo a metodologia de microdiluição em caldo presente no documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI,

anteriormente denominado NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (CLSI, 2008).

4.5.1 Diluição da Piocianina

Para determinar a susceptibilidade *in vitro* a piocianina, solução estoque na concentração de 5000 µg/mL foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir da solução estoque, foram realizadas diluições seriadas em meio sintético RPMI 1640 tamponado (pH 7,0) com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS); sendo obtidas 6 concentrações finais que variaram de 1024 µg/mL a 32 µg/mL.

Alíquotas de 100 µl de cada diluição foram distribuídas nos poços da placa de microdiluição de 96 poços. Em cada placa foram definidos os seguintes controles: (1) crescimento, contendo apenas RPMI 1640 + Inóculo e (2) esterilidade, contendo apenas o meio RPMI 1640. Após a microdiluição das drogas, as placas foram fechadas, embaladas em filme transparente e refrigeradas a -20°C até o momento do uso.

4.5.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado pelo método espectrofotométrico proposto por (PFALLER et al., 1988). Amostras de *C. gattii* (R265 e L27) e *C. neoformans* (H99) foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 35°C por 72h. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente e suspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% esterilizada. Após homogeneização em vórtex, a transmitância foi medida em espectrofotômetro a 530nm, sendo ajustada para 75% a 77%, o que corresponde a uma suspensão de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Posteriormente, para o preparo da suspensão de trabalho, foi realizada uma diluição de 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão padrão em meio líquido RPMI 1640, resultando na concentração de $1,0 \times 10^3$ células/mL. Então, alíquotas de 100µL desse inóculo foram dispensadas nas placas de 96 poços contendo a Piocianina. Cada amostra foi testada em

duplicata. As placas foram incubadas a 35°C, por 72 horas, e posteriormente foi realizada leitura visual.

4.5.3 Leitura e interpretação dos resultados da CIM

A leitura da concentração inibitória mínima foi realizada visualmente, após 72 horas de incubação, comparando o controle de crescimento do microrganismo com o crescimento observado nos outros poços com as diferentes concentrações de piocianina; sendo considerada a concentração que apresentou inibição de 100% do crescimento.

4.6 Curva de crescimento em concentrações subinibitórias de piocianina

Para determinação da curva de crescimento das linhagens em concentrações subinibitórias de piocianina (6,4 µg/mL), células previamente cultivadas em meio ASD a 35°C por 72h foram suspensas em 1mL de solução salina e posteriormente contadas em câmara de Neubauer. A partir da contagem foi realizada diluição em meio líquido RPMI 1640 obtendo uma concentração final de 5×10^5 cels/mL. Desse inóculo, alíquotas de 200µL (1×10^5 cels) foram dispensadas em placa de 96 poços e incubadas em leitor de ELISA a 37°C durante 72 horas, com comprimento de onda ajustado para 600nm e intervalo de leitura a cada uma hora. Para cada linhagem foram realizadas oito replicatas. O aumento da população microbiana é proporcional a absorbância detectada. O parâmetro Área Sob a Curva (ASC) foi utilizado para comparar os grupos, essa análise foi realizada no *software GraphPad Prism*, pelo cálculo da integral com a finalidade de encontrar área de uma região plana sob uma curva no plano cartesiano, onde estas curvas são definidas por funções.

4.7 Ensaios de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação de espécies reativas (ROS e PRN)

4.7.1 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)

As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de camundongos BALB/c. Os animais foram eutanasiados e os fêmures e tíbias cuidadosamente extraídos e adicionados a um tubo de polipropileno contendo PBS estéril e, posteriormente, deixados em etanol 70% por 1 minuto. Utilizando-se meio RPMI 1640 (HyClone, LGC Biotecnologia) e uma seringa com agulha 0,70 x 25 mm, as células foram removidas do canal medular de cada osso, após corte das epífises. As células extraídas foram transferidas para um novo tubo de polipropileno estéril (tubo Falcon).

Para a diferenciação em macrófagos derivados da medula óssea, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% SFB (Soro Fetal Bovino), 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e também com 30% de sobrenadante de cultura de células L-929. O sobrenadante de células L-929 contém quantidade significativa de Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage-Colony Stimulating Factor*) que é um fator de crescimento essencial na diferenciação de células progenitoras de macrófagos. A suspensão de células foi colocada em placas de Petri e incubadas a 37°C/5% CO₂ por 7 dias, sendo o meio renovado de dois em dois dias. Ao sétimo dia em cultura, o sobrenadante foi descartado e a cultura de células na placa lavada com 5 mL de PBS estéril para eliminar as células não aderentes. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de PBS/EDTA 10mM à cultura na placa, seguido de incubação no gelo por 10 minutos. As células aderidas à placa, já diferenciadas como macrófagos, foram ressuspensas e transferidas para tubo de polipropileno estéril. Os BMDMs foram centrifugados a 200xg/5 min a 4 °C e ressuspensos em 5 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% SBF, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e 5% de sobrenadante de cultura de células L929. As células viáveis foram contadas, usando Azul de Trypan, plaqueadas em placas de cultura de 24 e 96 poços, de acordo com os objetivos

propostos, seguido de incubação em estufa a 37°C, atmosfera a 5% CO₂. Após vinte e quatro horas, as células foram utilizadas para ensaios de Fagocitose, Índice de Proliferação Intracelular (IPR) e quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).

4.7.2 Ensaio de fagocitose

Os macrófagos foram infectados pela bactéria e pelo fungo, seguindo três estratégias de infecção: 1ª) bactéria adicionada 30 minutos antes, seguido de lavagem dos poços com PBS e após lavagem foi adicionado inóculo de *C. gattii* (Pa_{30min}+Cg ou Sa_{30min}+Cg); 2ª) bactéria adicionada 30 minutos antes de *C. gattii* (Pa+Cg ou Sa+Cg); e 3ª) Bactéria inativada pelo calor (Heat Killed – HK) 30 minutos antes de *C. gattii* (PaHK+Cg ou SaHK+Cg). Foram feitos três controles: um apenas com a suspensão de macrófagos (M0), outro com macrófagos infectados apenas com a suspensão de *C. gattii* (Cg) e o terceiro contendo apenas o inóculo da bactéria (*P. aeruginosa* ou *S. aureus*). Para cada tipo de infecção o experimento foi realizado em sextuplicada.

Para infecção dos macrófagos, foi preparada uma suspensão fúngica, contendo 1x10⁵ leveduras viáveis por poço, contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan, estabelecendo uma relação de 1:1 (1x10⁵ UFC de leveduras para 1x10⁵ macrófagos), que foram adicionadas à cultura de macrófagos já nas placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm (PERFECTA). Paralelamente, os macrófagos também foram infectados com a bactéria para avaliar sua influência na fagocitose da levedura, de acordo com as três estratégias descritas acima. A suspensão bacteriana foi preparada conforme descrito na preparação do inóculo, item 4.2.1, na concentração de 10³ UFC (TAVARES et al., 2016). As culturas foram incubadas a 37°C em 5% CO₂, por 3 e 6 horas após a infecção por Cg ou 3 e 24 horas nos ensaios com PaHK.

Após incubação, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas, lavadas em PBS 1x estéril, secas, fixadas com metanol gelado, montadas em lâminas e coradas com o corante Panótico Rápido (LABORCLIN), conforme sugerido pelo fabricante, para visualização da fagocitose. A contagem dos macrófagos foi

realizada por meio de microscopia óptica e a capacidade fagocítica foi expressa pelo percentual de leveduras internalizadas.

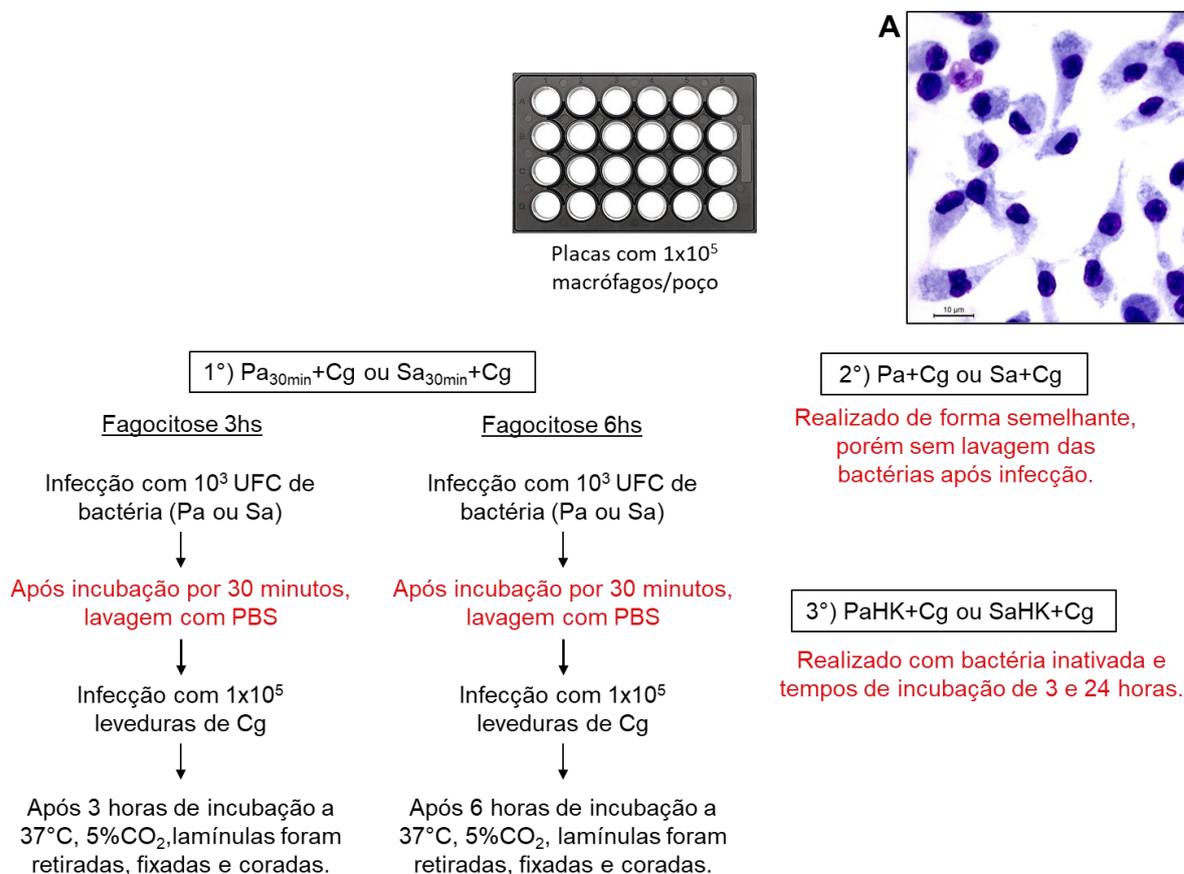


Figura 7: Esquema do ensaio de fagocitose realizado *in vitro* com macrófagos (BMDMs), seguindo diferentes estratégias de infecção com as bactérias (*P. aeruginosa* ou *S. aureus*) e com *C. gattii*. 1^a) bactéria adicionada 30 minutos antes, seguido de lavagem dos poços com PBS e após lavagem foi adicionado inóculo de *C. gattii* (Pa30min+Cg ou Sa30min +Cg); 2^o) bactéria adicionada 30 minutos antes de *C. gattii* (Pa+Cg ou Sa+Cg); e 3^a) Bactéria inativada pelo calor (PaHeat Killed – HK) 30 minutos antes de *C. gattii* (PaHK+Cg ou SaHK+Cg). Em A: foto ilustrativa dos macrófagos não infectados.

4.7.3 Proliferação Intracelular IPR

Para investigar a taxa de proliferação intracelular do fungo nestes macrófagos, foi realizado ensaio como previamente descrito por Ma et al. (2009) (MA et al., 2009). Brevemente, leveduras não internalizadas, presentes no sobrenadante, foram removidas a partir da lavagem dos poços com 200 µL de PBS. Em seguida, macrófagos foram lisados, após três, seis ou 24 horas, com 200 µL de água esterilizada e incubados por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, 50 µL do lisado foi coletado e plaqueado em Ágar Sabouraud Dextrose (Difco), suplementado com 100µg/mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich)

nos ensaios com Pa ou com 100 UI/mL de Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich) nos ensaios com Sa, para determinação do número de UFC fúngica. Os valores para IPR foram calculados considerando: UFC 6hs / UFC 3hs ou UFC 24hs / UFC 3hs (UFC intracelular). Também foram avaliados as UFC dos sobrenadantes (UFC extracelular) nos tempos de 3 e 6 horas.

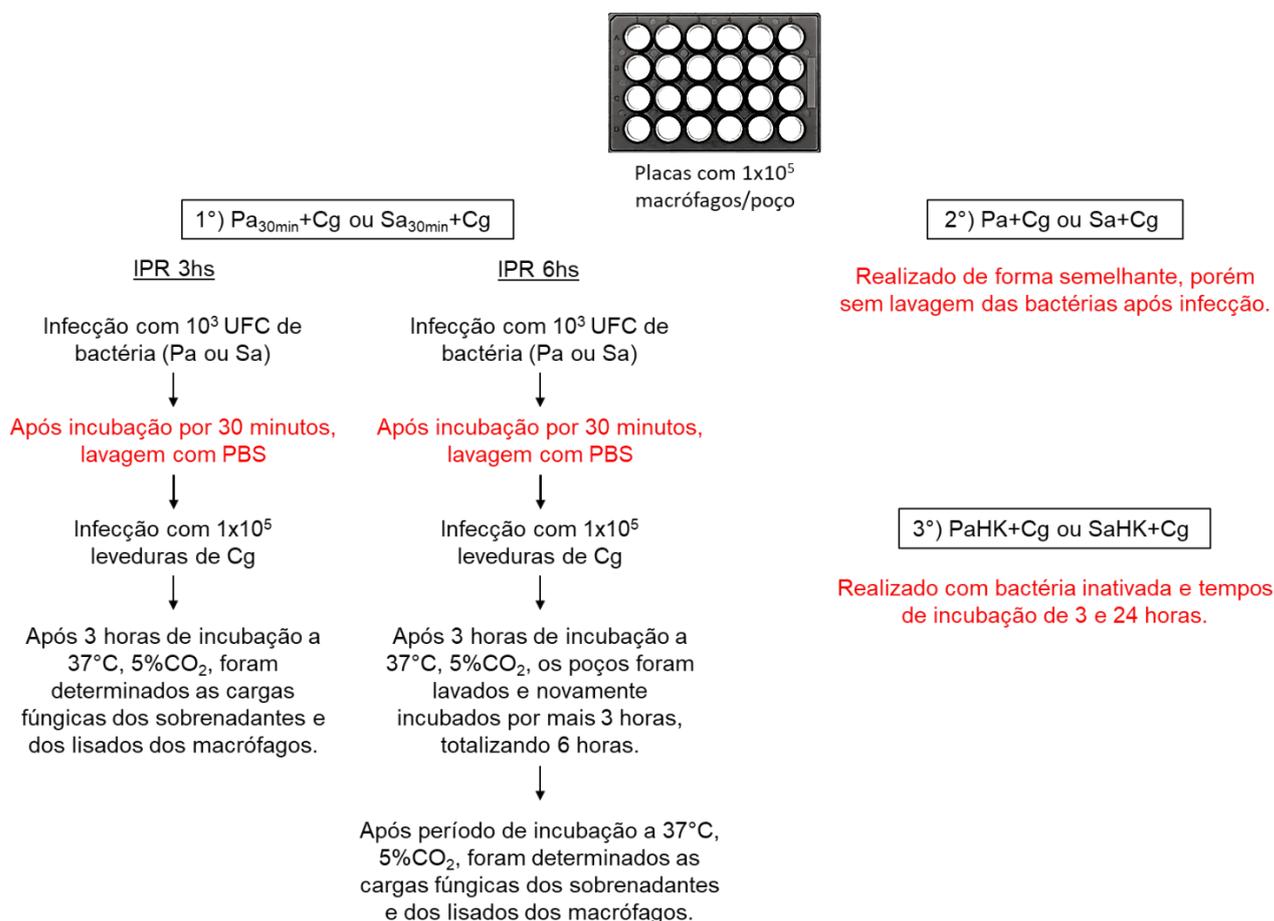


Figura 8: Ensaio realizado *in vitro* com macrófagos (BMDMs), para avaliar a taxa de proliferação intracelular das leveduras (IPR), seguindo diferentes estratégias de infecção com as bactérias (*P. aeruginosa* ou *S. aureus*) e com *C. gattii*. 1ª) bactéria adicionada 30 minutos antes, seguido de lavagem dos poços com PBS e após lavagem foi adicionado inóculo de *C. gattii* ($Pa_{30min}+Cg$ ou $Sa_{30min}+Cg$); 2ª) bactéria adicionada 30 minutos antes de *C. gattii* ($Pa+Cg$ ou $Sa+Cg$); e 3ª) Bactéria inativada pelo calor (Heat Killed – HK) 30 minutos antes de *C. gattii* ($PaHK+Cg$ ou $SaHK+Cg$).

4.7.4 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN) no ensaio de fagocitose

A quantidade endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN) foram mensuradas por um ensaio fluorimétrico, utilizando

uma sonda específica (SOARES et al., 2011). No ensaio de ROS e PRN, as células obtidas da medula foram tratadas como no teste de fagocitose descrito acima, diferindo apenas no meio, foi utilizado o RPMI-1640 sem fenol red, e no modelo da placa (foi utilizada placa de 96 poços). Após o período de incubação (3h, 6h e/ou 24h), foi adicionado em cada poço 20nM de dihydrorhodamine 123 (DHR 123; Invitrogen, Life Technologies) e 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA; Invitrogen, Life Technologies) e após incubação de 30 minutos a 37°C, foi possível a quantificação de ROS e PRN, respectivamente, através da mensuração da fluorescência em um fluorômetro (Varioskan Flash, Thermo), usando comprimentos de onda de excitação de 485nm e emissão de 530nm. Os ensaios foram realizados em sextuplicata. Os dados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência \pm SE.

Ensaio *in vivo*

4. 8 Animais Experimentais

Para a execução dos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com seis a oito semanas de idade, adquiridos no biotério do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram divididos em grupos de seis por gaiola, inclusive para os grupos controles. Foram fornecidos água e ração *ad libitum* e mantidos ciclos de claro/escuro. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMG). Previamente a qualquer experimentação, os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com solução de ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg) diluídas em PBS (137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄).

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMG), com número de protocolo 77 / 2018, conforme anexo 1.

4.9 Isolados Utilizados

Para todas as análises, foram utilizados *C. gattii* (isolado clínico L27/01), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

4.10 Escolha do inóculo bacteriano para experimentos de co-infecção

Inicialmente, foi avaliada a sobrevivência de animais infectados com inóculos variáveis de cada bactéria utilizada no estudo (*P. aeruginosa* e *S. aureus*), tendo como objetivo escolher um inóculo não letal, que permitisse avaliar a influência da infecção bacteriana na criptococose causada por *C. gattii*. Para tanto, três grupos (para cada bactéria) (n=6) foram infectados com 10^9 , 10^7 , e 10^5 UFC e acompanhados diariamente quanto à morbidade e mortalidade. À medida que os animais apresentaram os sinais clínicos mais graves da doença, foram anestesiados e eticamente eutanasiados.

4.11 Preparo de inóculo bacteriano e infecção intranasal

A suspensão de bactérias (*P. aeruginosa* ou *S. aureus*) utilizada para a infecção animal foi preparada de acordo com o tópico 4.2.1. Desta suspensão, foram utilizados 40 μ L, equivalente a aproximadamente 10^7 UFC de *S. aureus*, como inóculo para cada animal, por via intranasal. Para o inóculo de *P. aeruginosa* foi realizado uma diluição de 100 vezes da suspensão inicial para obtenção de concentração equivalente a 10^5 UFC em 40 μ L de inóculo. Para todos os experimentos, os inóculos foram confirmados por plaqueamento da suspensão bacteriana. Os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina: 80 mg/Kg/ 15 mg/Kg e, em seguida os inóculos foram instilados em suas narinas.

Para a realização dos ensaios com as bactérias (Pa e Sa) inativadas pelo calor (*Heat Killed* – HK), também foi realizado procedimento conforme descrito no tópico 4.2.1, e um volume de 1mL do inóculo obtido com DO de 1.040 foi incubado em banho-maria aquecido a 60°C por uma hora, em seguida foi resfriado em temperatura ambiente, ressuspenso em vórtex e utilizado para inoculação por via intranasal nos animais. Para Pa foi realizada uma diluição de 100 vezes com salina. Os inóculos inativados pelo calor foram semeados em meio BHI, incubados a 37°C, por 48 horas, para verificar a efetividade do procedimento para inativação (PRIEBE et al., 2002).

4.12 Análise da cinética de eliminação bacteriana nos pulmões (*P. aeruginosa* - Pa e *S. aureus* - Sa)

Após análise da sobrevivência e escolha do inóculo inicial (10^5 UFC para Pa e 10^7 UFC para Sa), foi realizado um experimento para avaliar a cinética de eliminação da bactéria, com o objetivo de identificar em quanto tempo ocorre a eliminação da bactéria e resolução da infecção pelo organismo do animal. Este experimento foi realizado para estimar os tempos ideais para a coinfeção com *C. gattii*.

Para isso, os grupos experimentais descritos a seguir foram infectados com a bactéria, por via intranasal e com o inóculo escolhido, e, posteriormente, foram eutanasiados em dias determinados para recuperação e quantificação da carga bacteriana nos órgãos alvo (pulmões, cérebro, lavado bronco-alveolar (LBA), sangue, fígado, baço, coração, linfonodos, timo), após trituração e plaqueamento em ágar BHI. Também foi realizada a contagem diferencial de células do LBA coletado para análise do perfil de recrutamento celular durante a infecção. Fragmentos de tecidos (pulmão e cérebro) coletados para análises de citocinas, MPO e NAG foram congelados em freezer -80 °C.

Grupos testados para a escolha dos tempos para coinfeção:

Grupo1: Controle – PBS – não infectado **(NI)**

P. aeruginosa **(Pa)**

Grupo 2: infecção com *P. aeruginosa* - eutanasiados após 1 dia de infecção

Grupo 3: infecção com *P. aeruginosa* - eutanasiados após 3 dias de infecção

Grupo 4: infecção com *P. aeruginosa* - eutanasiados após 6 dias de infecção

Grupo 5: infecção com *P. aeruginosa* - eutanasiados após 10 dias de infecção

Grupo 6: infecção com *P. aeruginosa* - eutanasiados após 15 dias de infecção

***S. aureus* (Sa)**

Grupo 7: infecção com *S. aureus* - eutanasiados após 1 dia de infecção

Grupo 8: infecção com *S. aureus* - eutanasiados após 4 dias de infecção

Grupo 9: infecção com *S. aureus* - eutanasiados após 7 dia de infecção

Grupo 10: infecção com *S. aureus* - eutanasiados após 10 dia de infecção

Grupo 11: infecção com *S. aureus* - eutanasiados após 15 dia de infecção

4.13 Preparo de inóculo e infecção intratraqueal com *C. gattii*

Para *C. gattii* foi utilizado o inóculo e o modelo de infecção intratraqueal desenvolvido no Laboratório de Micologia – UFMG (SANTOS et al., 2014). Após cultivo das leveduras em ASD, colônias foram suspensas em PBS, homogeneizadas e a contagem das células viáveis foi feita em Câmara de Neubauer (NEW OPTIK) após coloração com Azul de Trypan (Trypan Blue – Sigma Aldrich). A concentração do inóculo foi ajustada de modo que cada 30 µL contenha 10^4 leveduras viáveis. Após anestesia, foi feita antissepsia do local da incisão no animal, com etanol 70%. Em seguida, foi feita uma pequena incisão medial longitudinal de aproximadamente 0,5 cm na pele posterior ao mento do animal. Após a separação das camadas dos tecidos, os lobos da glândula tireóide foram afastados usando uma pinça para exposição da traquéia. A inoculação foi feita usando micro seringa de 100 µL (Hamilton) carregada com 30 µL da suspensão fúngica. Após inoculação, a pele foi suturada usando nylon 4-0 (BRASUTURE) e os animais foram acompanhados até completa recuperação.

Depois de realizados os procedimentos, os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas separadas. Após a infecção, os animais foram monitorados diariamente e a observação de sinais intensos de morbidade, como encurvamento dorsal e piloereção acentuados, foram critérios para realização de eutanásia sob anestesia, evitando intenso sofrimento, conforme requerido pelas normas do CEUA desta instituição.

4.14 Análise de sobrevivência dos animais coinfetados e análise comportamental (SHIRPA)

Feita a escolha do inóculo para cada bactéria e dos tempos ideais para realização da coinfecção, foi realizado novo experimento para análise de sobrevivência (n=6), com o objetivo de investigar a influência da infecção bacteriana na infecção fúngica. Considerando o tempo de sobrevivência, dos animais infectados com inóculo bacteriano não letal selecionado, e o tempo da cinética de eliminação da bactéria, os animais foram infectados com a bactéria antes ou após infecção com 10⁴ leveduras viáveis de *C. gattii*, seguindo os regimes de infecção a seguir descritos, e foram acompanhados diariamente para avaliação da morbidade (SHIRPA) e construção de uma curva de sobrevivência para avaliar a mortalidade.

Padronização do modelo de coinfecção entre *C. gattii* X bactéria (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) – análise de sobrevivência e do perfil comportamental (protocolo SHIRPA) foram realizados diariamente.

Grupo 1: Controle – PBS – não infectado **(NI)**

Grupo 2: infecção com *C. gattii* L27/01 **(Cg)**

Grupo 3: infecção com *P. aeruginosa* **(Pa)**

Grupo 4: infecção com *P. aeruginosa* 3 dias antes da infecção com *C. gattii* L27/01 **(Pa+Cg)**

Grupo 5: infecção com *P. aeruginosa* 3 dias após da infecção com *C. gattii* L27/01 **(Cg+Pa)**

Análise da Sobrevida e do perfil comportamental dos animais

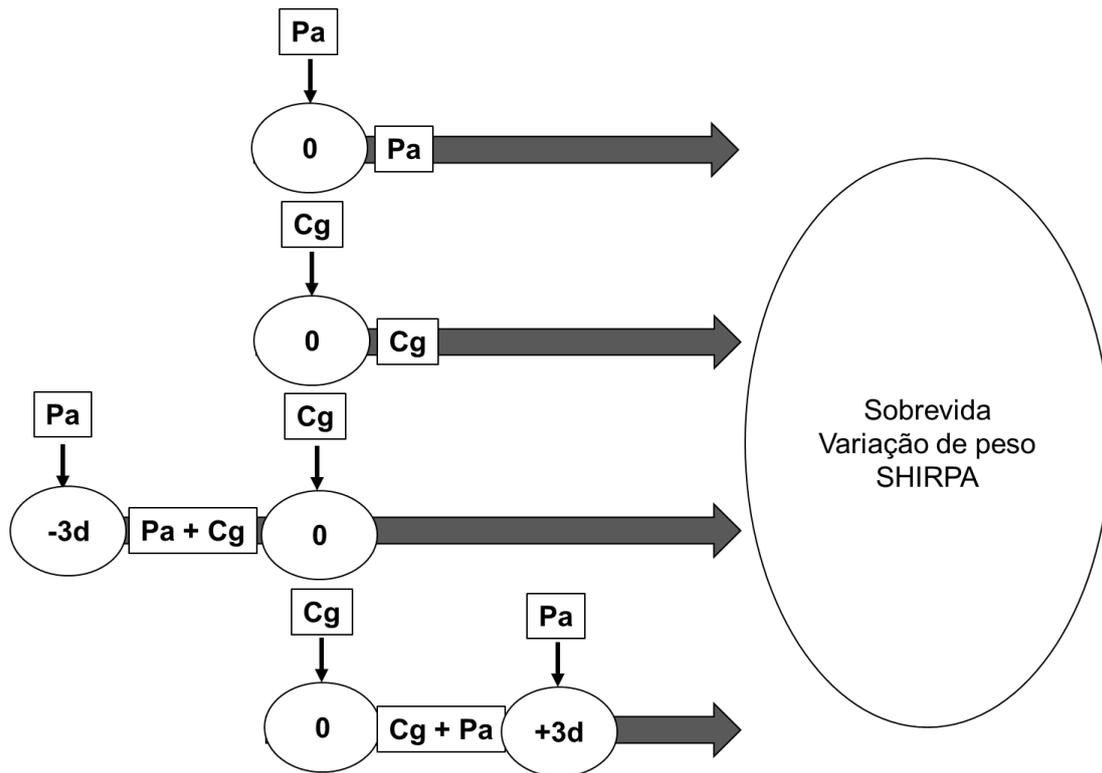


Figura 9: Representação esquemática dos regimes de coinfecção com *P. aeruginosa*.

Grupo 6: infecção com *S. aureus* (**Sa**)

Grupo 7: infecção com *S. aureus* 4 dias antes da infecção com *C. gattii* L27/01 (**Sa + Cg**)

Grupo 8: infecção com *S. aureus* 4 dias após a infecção com *C. gattii* L27/01 (**Cg + Sa**)

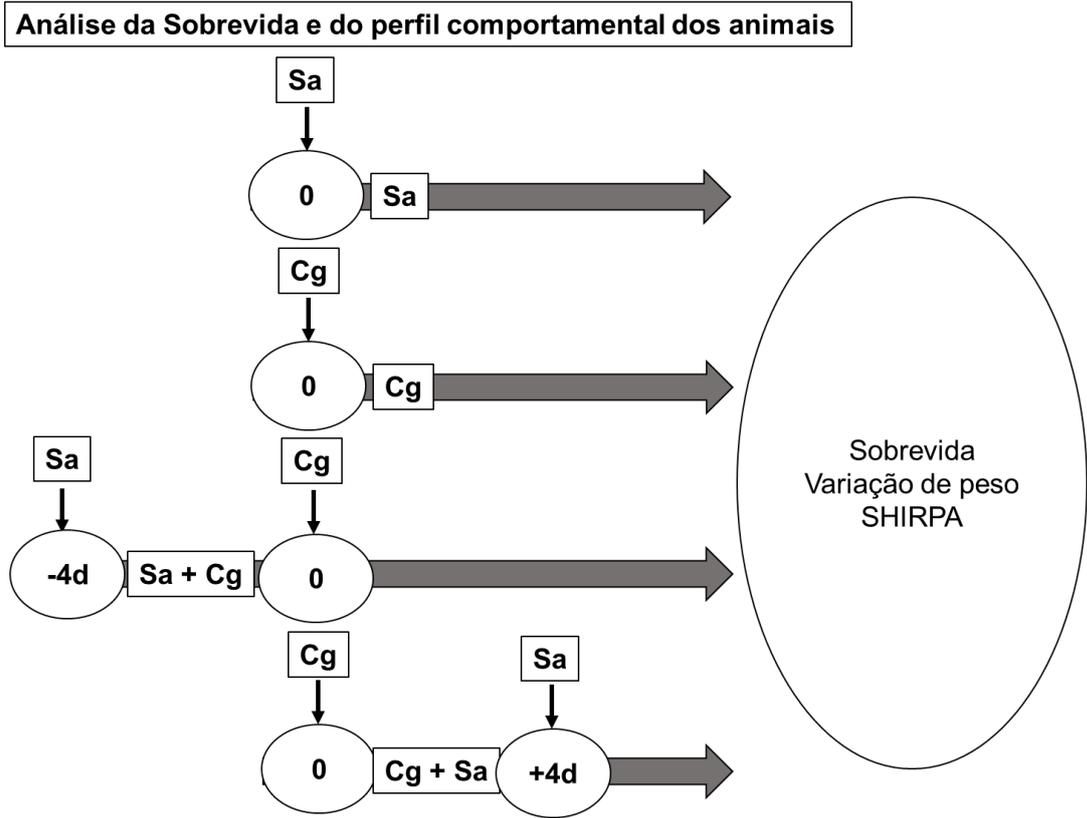


Figura 10: Representação esquemática dos regimes de coinfeção com *S. aureus*.

Paralelo à análise de sobrevida, realizado para avaliar o perfil de morbidade dos animais, foi analisado o perfil comportamental dos diferentes grupos experimentais, utilizando o protocolo SHIRPA (*SmithKline/Harwell/Imperial College/Royal Hospital/PhenotypeAssessment - SHIRPA*). Este teste mimetiza as manifestações gerais, neurológicas e psiquiátricas que ocorrem em humano (ROGERS et al., 1997). Para o propósito de análise, os parâmetros individuais avaliados pelo SHIRPA foram agrupados em cinco categorias funcionais descritas na tabela 1 (função reflexa e sensorial; estado neuropsiquiátrico; comportamento motor; função autonômica; tônus e força muscular) de acordo com Lackner et al. (2006), para determinar uma contagem global e cinco domínios de contagem (LACKNER et al., 2006).

Tabela 1: Classificação das categorias funcionais do teste SHIRPA de acordo com os parâmetros avaliados (ROGERS et al., 1997).

Categorias Funcionais	Parâmetros Avaliados
Função reflexa e sensorial	Posicionamento visual, <i>pinna reflex</i> , reflexo corneal, beliscada da pata traseira e postural
Estado neuropsiquiátrico	Atividade espontânea, excitação de transferência, escape ao toque, passividade posicional, mordida provocada, medo, irritabilidade, agressão e vocalização
Comportamento motor	Posição corporal, tremor, atividade locomotora, elevação pélvica, ambulação, elevação da cauda, encurvamento do tronco, segurar as patas traseiras, manobra do arame, <i>geotaxis</i> negativa
Função autônoma	Taxa de respiração, defecação, micção, fechamento de pálpebras, piloereção, cor da pele, frequência cardíaca, lacrimejamento, salivação, temperatura corporal
Tônus muscular e força	Força ao agarrar, tônus corporal, tônus dos membros e tônus abdominal

4.15 Quantificação das cargas fúngica e bacteriana em órgãos alvos (LBA, pulmão e cérebro) e avaliação do perfil de recrutamento celular no LBA.

Após a análise do tempo de sobrevivência e do perfil comportamental dos grupos coinfectedos, novos grupos de animais (n=6/grupo) foram novamente coinfectedos para a realização dos demais experimentos: quantificação da carga fúngica e bacteriana em órgãos alvos (LBA, pulmão e cérebro); avaliação da resposta inflamatória no LBA; quantificação de citocinas nos pulmões e quantificação de enzimas como MPO e NAG; avaliação histopatológica dos tecidos de cérebro e pulmões. Após 10 dias da realização da infecção por *C. gattii*, o LBA foi obtido com o auxílio de um tubo traqueal, por meio de injeção de 2 mL de PBS gelado nas vias aéreas dos camundongos. Os órgãos foram removidos cirurgicamente, pesados e triturados em 1 mL de PBS. O volume de

50µL de cada homogenato dos órgãos e do LBA foram plaqueados, em duplicata, em ASD (DIFCO) suplementado com Cloranfenicol (0,1 mg/mL) para quantificação das leveduras e em ágar BHI suplementado com Anfotericina B (5 mg/L) para quantificação das bactérias viáveis. Os dados foram expressos em quantidade de UFC/g de pulmões e de cérebro, e UFC/mL de lavado. Para a contagem diferencial de leucócitos, mononucleares e polimorfonucleares, o LBA restante foi centrifugado a 1200 rpm, 4°C, por 5 minutos, e o pellet celular resultante foi suspenso em 100uL de BSA 3% (Sigma). Em seguida, foi feita a confecção de esfregaços em Cytospin (Thermo), a 450 rpm, por 10 minutos (MAXEINER et al., 2007), que foram corados com Panótico Rápido (LABORCLIN), conforme protocolo de coloração sugerido pelo fabricante. Fragmentos de tecidos (pulmão e cérebro) coletados para análises de citocinas, MPO e NAG foram congelados em freezer -80 °C.

Para avaliação histopatológica, os pulmões de cada animal (em experimento independente) foram fixados em formalina tamponada 10% e embebidos em parafina para a realização de secções histológicas (5µm) que foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e Grocott; posteriormente examinados ao microscópio óptico para análise e comparação das alterações teciduais resultantes das infecções propostas para cada grupo.

4.16 Quantificação do estresse oxidativo em células de lavado bronco alveolar (LBA) de animais infectados com *P. aeruginosa* – ROS e PRN *in vivo*

Foram realizadas análises de ROS e PRN *in vivo* no LBA de animais infectados com Pa. Para isso, os animais foram inoculados com 10⁵ UFC de Pa (preparado conforme descrito no item 4.11), por via intranasal. Após 3 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e os LBAs coletados, conforme descrito no item 4.15. Os LBAs foram centrifugados a 1200 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Em seguida os sobrenadantes foram descartados e os pellets contendo as células foram ressuspensos em 100 µL de salina e colocados em placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado em cada poço, 20nM de dihydrorhodamine 123 (DHR 123; Invitrogen, Life Technologies) e 2,7-diclorofluoresceína diacetato

(DCFH-DA; Invitrogen, Life Technologies) e, após incubação de 30 minutos a 37°C, foi possível a quantificação de ROS e PRN, respectivamente, através da mensuração da fluorescência em um fluorômetro (Varioskan Flash, Thermo), usando comprimentos de onda de excitação de 485nm e emissão de 530nm. Os ensaios foram realizados em sextuplicata. Foram analisados animais infectados com Pa e animais não infectados. Os dados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência \pm SE.

4.17 Atividade da enzima Mieloperoxidase (**MPO**) e Atividade de N-acetilglicosaminidase (**NAG**) nos tecidos infectados

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos. A quantificação de MPO é uma técnica que tem sido utilizada como um marcador bioquímico de recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório e permite demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (CROSS et al., 2003). O acúmulo de macrófagos no tecido foi avaliado pelo ensaio de atividade enzimática da N-acetilglicosaminidase (NAG).

Para determinação da atividade de MPO e NAG, os tecidos foram processados, de forma que os fragmentos de tecido obtidos após eutanásia foram congelados em ultrafreezer (-80 °C). No momento da realização do procedimento, foram descongelados e homogeneizados em tampão I pH 4,7 (0,1M NaCl; 0,02M Na₃PO₄; 0,015M Na₂EDTA) - (1mL para 100mg tecido), centrifugado (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos), descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido a lise hipotônica (0,75 mL de solução 0,2% de NaCl / 100 mg tecido, durante 30 segundos), para o rompimento de hemácias. Decorrido esse tempo, foi feita a adição de 0,75 mL de uma solução de NaCl 1,6% (p/v) com glicose 5% (p/v) para cada 100 mg de tecido, a solução final foi homogeneizada e dividida igualmente em dois eppendorfs, um para MPO e outro para NAG. Esses volumes foram centrifugados (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos). O sobrenadante foi novamente desprezado:

- Nos tubos para análise de MPO foram adicionados 800 µL de tampão II (tampão fosfato (0,05 mol/L de Na₃PO₄ e 0,5% (p/v) de hexadecil-trimetil brometo de amônia (HETAB), pH 5,4);

- Nos tubos para análise de NAG os sedimentos foram ressuspensos e homogeneizados em 1 ml de salina 0,9% com 0,1% v/v de Triton X-100, centrifugado por 10 minutos a 9000 x g, e o ensaio foi realizado com o sobrenadante coletado.

Para a atividade da MPO, a suspensão foi submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm, coletando-se o sobrenadante. O ensaio foi conduzido adicionando-se 25 µl da amostra em duplicata em placa de 96 poços (o tampão II – 25 µl/poço corresponde ao branco). A reação iniciou com a adição de 25µl de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) com concentração final de 1,6 mM, às amostras e incubação a 37°C por 5 minutos. Ao final desta etapa adicionou-se 100 µl de H₂SO₄ (1M) para término da reação. As placas foram lidas em leitor de ELISA (450nm). O conteúdo de neutrófilos foi calculado com base em curva padrão de MPO, feita pela coleta de neutrófilos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 3 mL de caseína 5%. Os resultados foram apresentados como número relativo de neutrófilos por grama de órgão.

Os níveis de NAG foram determinados pela alteração na densidade ótica (D.O.) durante leitura em espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 400 nm, utilizando o substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (SIGMA) e tampão glicina 0,2M (pH 10,6). O acúmulo de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos com tioglicolato 3%. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos em 100 mg de tecido.

4.18 Quantificação da concentração de citocinas e quimiocinas nos pulmões dos animais coinfectados com Pa e Cg

A dosagem de citocinas e quimiocinas foi realizada a partir do sobrenadante do extrato de pulmão dos animais infectados com Pa, Cg e Pa+Cg, um e dez dias após a inoculação de Cg. Somente no grupo Pa, foi analisado no terceiro dia após a inoculação de Pa, por representar a condição em que o fungo foi inoculado no grupo coinfectado. Para obtenção do extrato de tecido, 100mg de tecido foram homogeneizadas numa solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1 mM “phenylmethilsulfonyl fluoride”, 0,1 mM “benzethonium chloride”, 10 mM “EDTA” e 80 KI de aprotinina A) e 0,05% v/v de “Tween 20”, na proporção de 0,1 g de tecido para cada 1 mL de solução, utilizando-se o homogeneizador Power Gen 125 (Fischer Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 10min a 4°C (em centrífuga BR4, Jouan Winchester VA, USA) e os sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) a -20°C, para posterior análise. Para realização do ensaio, as concentrações utilizadas para os anticorpos e reagentes foi baseada nos protocolos dos fabricantes (R&D Systems). Inicialmente, placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) foram recobertas com anticorpos purificados específicos para as moléculas em análise (IL1 β , CXCL1-1/KC, IL-17, IFN- γ e IL-10), sendo 50 μ L/poço, em PBS, e incubadas por 18 horas a 4°C. Numa segunda etapa, as placas foram lavadas com PBS acrescido de Tween 20 0,1% v/v, e bloqueadas pela adição BSA 1% p/v em PBS (100 μ L/poço) por 2 horas, sob agitação. Após nova lavagem, amostras de sobrenadante de extrato de tecidos diluídas em BSA 1% p/v em PBS foram adicionadas em duplicada (50 μ L/poço), e, então, incubadas por 18 horas a 4°C. Após lavagem, foi adicionado anticorpo específico biotilado e, após incubação por 2 horas à temperatura ambiente e nova lavagem, foi utilizada uma solução de estreptoavidina acoplada à enzima peroxidase, seguido de incubação por 20 minutos sob agitação, à temperatura ambiente. Após lavagem, a reação foi realizada pela adição de 50 μ L/poço do cromógeno OPD (Sigma) a 0,4mg/mL, contendo H₂O₂ (0,2 μ L de uma solução a 30% v/v) em tampão citrato (pH 5,0) e a absorbância lida em leitor de ELISA com filtro para comprimento de onda de 492nm (Status-labsystems, multiskan RC,

Uniscience do Brasil). Os dados foram expressos em pg/mL ou pg/100mg de tecido de acordo com curva padrão realizada nas mesmas condições.

4.19 Citometria de fluxo

A análise do perfil celular, por citometria de fluxo, foi realizada a partir dos LBAs dos animais infectados com Pa, Cg e Pa+Cg, dez dias após a inoculação de Cg. Somente o grupo Pa, foi analisado no terceiro dia após a inoculação da bactéria, por representar a condição em que o fungo foi inoculado no grupo coinfestado. Foi realizado a marcação de leucócitos presentes no LBA. Para isso, 1×10^5 células recuperadas no lavado foram adicionadas em placas de 96 poços com fundo em U e, após centrifugação e descarte do sobrenadante, incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 20 minutos com um mix de anticorpos contendo os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: anti-mouse CD45, anti-mouse CD11b, anti-mouse Ly6G, anti-mouse F4/80, anti-mouse CD4, anti-mouse CD3 e anti-mouse MHCII. Após a incubação, as amostras foram lavadas com 150µl de PBS contendo 0,5% p/v de BSA e centrifugadas por 10 minutos a 4° C a 400 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 200 µL de solução de fixação (formaldeído a 4% v/v em PBS) e incubados por 20 minutos ao abrigo da luz a 4°C. Após incubação, as amostras foram novamente centrifugadas e lavadas com PBS. Em seguida, foi realizado a permeabilização das células para marcação intracelular através da adição de 200µL do tampão de permeabilização (eBioscience) e incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 20 minutos. Após essa permeabilização as amostras foram lavadas com tampão de permeabilização e foi adicionado o anticorpo não conjugado Rat anti mouse iNOS por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas com tampão de permeabilização e foi adicionado o anticorpo anti-rat IgG conjugado e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas e em seguida fixadas com formaldeído a 4% v/v em PBS. As amostras foram adquiridas no citômetro FACSCanto II e analisadas no software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

4.20 Análise de sobrevivência dos animais coinfetados com *P. aeruginosa* e *C. gattii* e tratados com inibidor da enzima óxido nítrico sintase (iNOS)

Foi realizado uma nova curva de sobrevivência (conforme item 4.14) para avaliar o efeito do tratamento com inibidor da enzima iNOS no grupo coinfetado (Pa+Cg). Para isso foi adicionado na água dos animais o fármaco Aminoguanidina (Sigma-Aldrich), na concentração de 1mg/mL, por 20 dias. Os seguintes grupos de animais foram avaliados:

Grupo 1: Controle – PBS – não infectados e tratados com Aminoguanidina (**NI INIB. iNOS**)

Grupo 2: infecção com *C. gattii* L27/01 e não tratados (**Cg NT**)

Grupo 3: infecção com *C. gattii* L27/01 e tratados com Aminoguanidina (**Cg INIB. iNOS**)

Grupo 4: infecção com *P. aeruginosa* 3 dias antes da infecção com *C. gattii* L27/01 e não tratados (**Pa+Cg NT**)

Grupo 5: infecção com *P. aeruginosa* 3 dias antes da infecção com *C. gattii* L27/01 e tratados com Aminoguanidina (**Pa+Cg INIB. iNOS**)

4.21 Análise Estatística dos Dados

Os resultados foram analisados utilizando-se testes estatísticos para comparar as diferenças significativas entre os grupos estudados, com o apoio instrumental do software PRISMA 5.0 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA). O nível de 95% de significância foi considerado para que os valores sejam significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tópico I: *Cryptococcus gattii* X *Pseudomonas aeruginosa*

5 Resultados e Discussão - PaXCg

5.1 Determinação *in vitro* da atividade inibitória de diferentes cepas de *P. aeruginosa* contra *Cryptococcus*.

5.1.1 Co-cultivo

Ainda são necessários muitos estudos sobre a etiopatogenia das doenças infecciosas e de acordo com Nair e colaboradores, 2014, a maioria das infecções são de natureza polimicrobiana e podem ocorrer em quase todos os nichos do corpo humano, particularmente nas superfícies de mucosas, onde diferentes espécies de microorganismos, como bactérias, fungos e vírus coexistem, formando comunidades (NAIR et al., 2014). As doenças polimicrobianas compartilham mecanismos de patogênese, como por exemplo, os fatores predisponentes, mas cada doença tem aspectos únicos, o que confere grande complexidade e requer estudos com ampla abordagem (BAKALETZ, 2004). Além disso, a exposição a uma infecção anterior pode exercer efeito modulador na resposta a infecções futuras, influenciando o resultado e o prognóstico das doenças (NAIR et al., 2014).

Dessa forma, compreender as relações estabelecidas entre os patógenos é de fundamental importância para possibilitar a compreensão dos mecanismos de patogênese que serão estabelecidos durante uma coinfeção. Já é bem descrito na literatura a inibição do crescimento de *Cryptococcus* por *P. aeruginosa* (Pa) (RELLA et al., 2012; TEOH-CHAN et al., 1975). Entretanto os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente esclarecidos. Assim, foram realizados testes *in vitro* com a perspectiva de conhecer as relações estabelecidas entre as cepas estudadas nesse trabalho.

Inicialmente, foi realizado o co-cultivo de *C. gattii* L27/01 e *P. aeruginosa* ATCC-27853 (Pa) com diferentes inóculos de Pa (10^5 , 10^3 e 10^2 UFC) e 10^5 UFC de L27/01. O crescimento fúngico foi avaliado em diferentes tempos (1; 4; e 12

horas), por meio da quantificação de UFC do fungo. Dessa forma, foi possível observar que no tempo de 4 horas e com um inóculo de 10^5 UFC de Pa ocorreu uma redução significativa no crescimento de *C. gattii* L27/01, o que pode ser observado na figura 11.

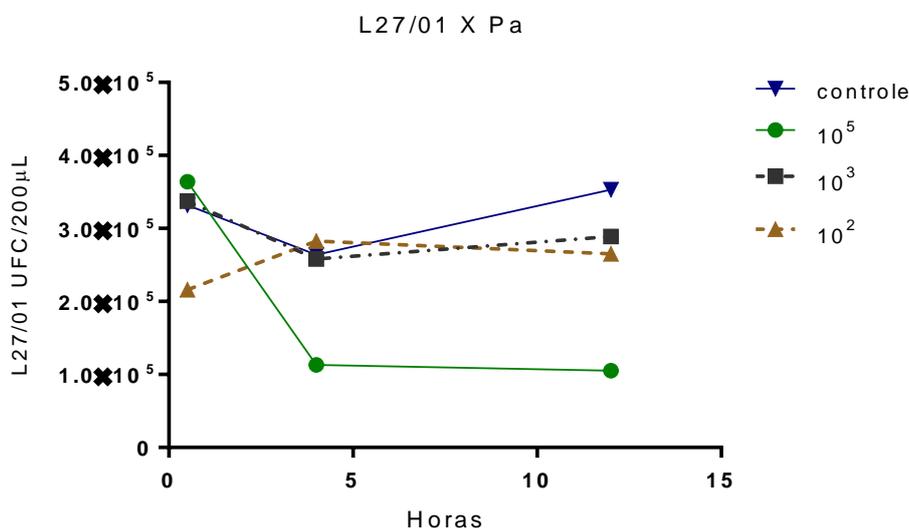


Figura 11: Perfil de inibição de *C. gattii* (L27/01) durante co-cultivo com *P. aeruginosa* ATCC-27853. Inóculo de 10^5 leveduras de *C. gattii* foi co-cultivado com diferentes inóculos de *P. aeruginosa* (10^5 , 10^3 e 10^2 UFC). Nos tempos de 1, 4 e 12 horas foi detectado a carga fúngica no co-cultivo.

Em seguida, foram realizados os co-cultivos de diferentes cepas de *Cryptococcus* (L27/01, R265 e H99) com diferentes cepas de *P. aeruginosa* (Pa (ATCC-27853), PAK, PA103, PAO1). Após 4 horas, o crescimento fúngico foi avaliado através da quantificação de UFC do fungo. Foi possível observar que, da mesma forma como ocorreu com o co-cultivo de L27 x Pa, ocorreram reduções significativas nos crescimentos de *C. gattii* (L27/01 e R265) e de *C. neoformans* (H99) nos co-cultivos com as demais cepas de *P. aeruginosa*, o que pode ser observado na figura 12.

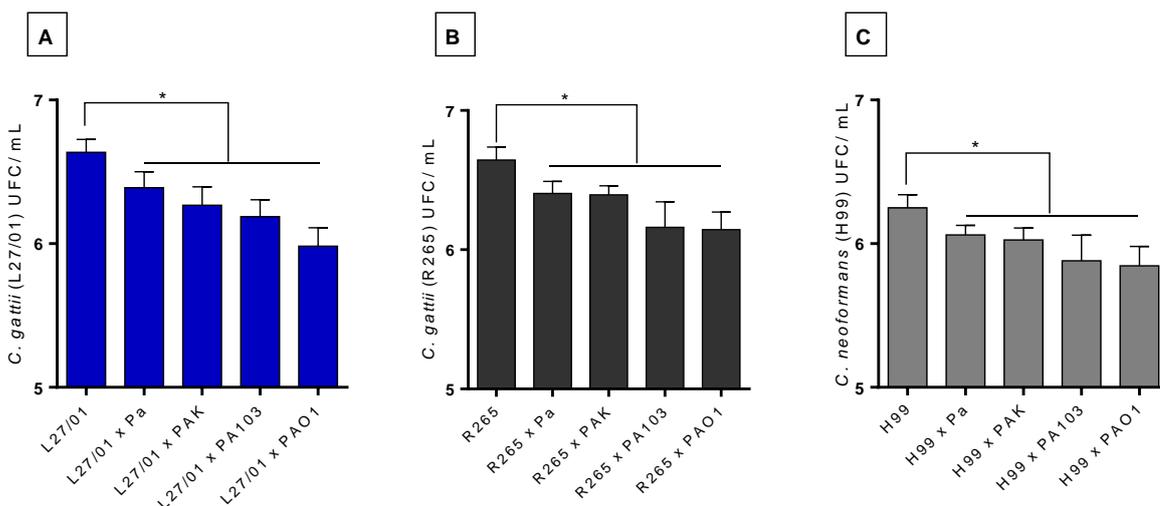


Figura 12: Perfil de inibição de diferentes cepas *Cryptococcus* durante co-cultivo com diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Em **A**, inóculo de 10^5 leveduras de ***C. gattii* L27/01** foi co-cultivado com inóculo de 10^5 UFC de diferentes cepas de *P. aeruginosa* (Pa, PAK, PA103, PAO1). Em **B** e **C** co-cultivos realizados de forma semelhante, para ***C. gattii* R265** e ***C. neoformans* H99**, respectivamente. Após 4 horas de incubação, em estufa a 37°C , foram detectadas as cargas fúngicas em cada co-cultivo. Análise por *Tukey's multiple comparisons test* mostrou diferenças com significância estatística na comparação dos co-cultivos com os controles (L27/01, R265 e H99).

5.1.2 Atividade inibitória de metabólitos secretados por *P. aeruginosa* contra *Cryptococcus*

Pseudomonas aeruginosa é conhecida como uma exímia secretora. Com um extenso genoma (cerca de 6,4 Mbp), codifica e secreta um enorme arsenal de proteínas efetoras e pigmentos, que atuam promovendo sua adaptação ao meio ambiente e determinam sua patogenicidade. Para isso, conta com sistemas de secreção complexos e diversificados, apresentando cinco dos sete tipos de sistemas de secreção descritos até o momento em bactérias Gram-negativas (BLEVES et al., 2010; CHEN et al., 2015; CROUSILLES et al., 2015; FILLOUX, 2011).

Assim, após a realização do co-cultivo, foi realizada a técnica de *spot on the lawn* para avaliar a atividade de produtos secretados por diferentes cepas de *P. aeruginosa* sobre o crescimento de *Cryptococcus*.

Os produtos secretados a partir do cultivo de cepas de *P. aeruginosa* (Pa (ATCC27853), PAK, PA103, PAO1) apresentaram uma atividade inibitória sobre

o crescimento de *C. gattii* (L27/01 e R265) e de *C. neoformans* (H99), mostrando halos de inibição límpidos e bem definidos (figura 13). Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos, entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os diâmetros dos halos obtidos (dados não apresentados), comparando as diferentes cepas de *P. aeruginosa* e diferentes cepas de *Cryptococcus*.

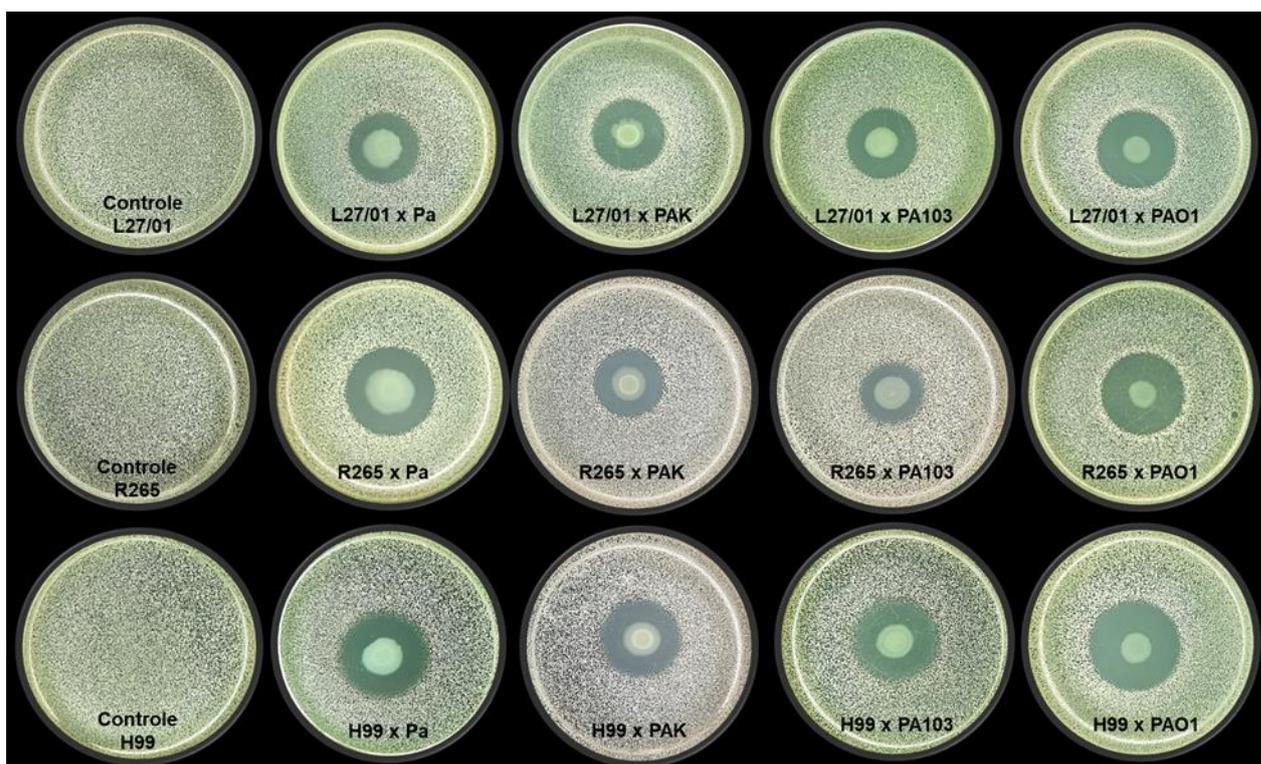


Figura 13: Atividade antagonista de metabólitos secretados por diferentes cepas de *P. aeruginosa* (Pa (ATCC27853), PAK, PA103, PAO1), inibindo o crescimento de *C. gattii* (L27/01 e R265) e de *C. neoformans* (H99). Os halos límpidos formados mostram zonas de inibição do crescimento de *Cryptococcus*.

A cepa ATCC-27853 é amplamente utilizada como uma cepa modelo para pesquisas de suscetibilidade aos antibióticos, desenvolvimento de biofilme e estudos de atividades metabólicas em geral. Apresenta expressão de várias proteínas de superfície, proteínas envolvidas no metabolismo celular e nos sistemas de secreção do tipo I, III e VI, sugerindo potenciais fisiológicos e patogênicos únicos da ATCC-27853 (CAO et al., 2017). Essa ATCC produz ExoA, via T2SS e também produz ExoS, via T3SS (YOUSEFI-AVARVAND et al., 2015).

T3SS é uma via de secreção de proteínas dependente de contato com célula hospedeira, desempenha um papel fundamental na patogênese, e duas exotoxinas se destacam por caracterizar o poder invasivo das cepas de *P. aeruginosa*: ExoS é uma citotoxina envolvida em estágios de colonização, invasão e disseminação de infecção; ExoU é uma citotoxina potente com atividade de fosfolipase, capaz de matar uma variedade de células eucarióticas *in vitro*, apresentando, dessa forma, um efeito maior do que outros efetores T3SS sobre a virulência das bactérias (RADÓ et al., 2017; YOUSEFI-AVARVAND et al., 2015).

Dentre as demais cepas utilizadas para comparação, as cepas PAK, PAO1 e PA14 destacam-se pela secreção de ExoS (MIKKELSEN; MCMULLAN; FILLOUX, 2011); e PA103 pela produção de ExoU (PLOTKOWSKI et al., 2015; SALIBA et al., 2003; SUN et al., 2012).

Na tentativa de conhecer a importância dessas toxinas (ExoS e ExoU) em meio às demais substâncias secretadas pelas cepas de *P. aeruginosa* disponíveis nesse estudo, foi realizado o teste *spot on the lawn*, utilizando cepas mutantes, com deleção para a secreção de ExoS (PAK Δ exoS) e ExoU (PA103 Δ exoU). Os resultados obtidos podem ser observados na figura 14.

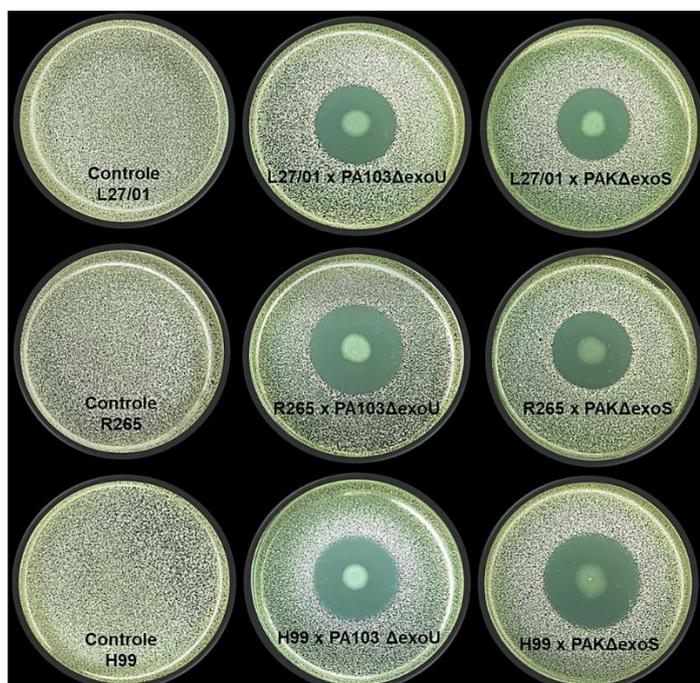


Figura 14: Atividade antagonista de metabólitos secretados por diferentes cepas mutantes de *P. aeruginosa* (PAK Δ exoS e Pa103 Δ exoU), inibindo o crescimento de *C.*

gattii (L27/01 e R265) e de *C. neoformans* (H99). Os halos límpidos formados mostram zonas de inibição do crescimento de *Cryptococcus*.

De forma semelhante, produtos secretados pelas cepas mutantes (PAK Δ exoS e Pa103 Δ exoU) apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento das cepas de *Cryptococcus*, mostrando halos de inibição límpidos e bem definidos. Mesmo na ausência dessas exotoxinas, os produtos secretados pelas cepas mutantes exerceram atividade inibitória sobre o crescimento de *C. gattii* e de *C. neoformans*, ratificando o poder inibitório dos diversos metabólitos secretados por *P. aeruginosa*, através de seus variados sistemas de secreção, destacando o T2SS, que atua com uma variedade de substâncias importantes, entre elas a exotoxina A e a piocianina (LEE et al., 2005).

Também foram analisados os efeitos inibitórios de metabólitos secretados por cepas mutantes com deleções importantes no T6SS. *P. aeruginosa* utiliza três sistemas de secreção do tipo VI (T6SS), três grupos de genes T6SS (H1, H2 e H3), para direcionar uma infinidade de proteínas efetoras para a célula alvo (eucariótica ou procariótica). Envolve um conjunto de 13 proteínas principais que se assemelham à cauda contrátil de bacteriófagos e cuja ponta é considerada um dispositivo de perfuração (VgrGs), que ajuda a atravessar membranas. Uma variedade de genes e outros efetores remotos são pré-requisitos para que ocorra a produção e uma entrega bem sucedida das proteínas efetoras vinculadas a esse sistema (MIKKELSEN; MCMULLAN; FILLOUX, 2011; WETTSTADT et al., 2019).

Cepas mutantes para T6SS, incluindo duplo e triplo mutantes, também foram avaliadas quanto ao poder inibitório sobre as leveduras de *C. gattii*. Foram avaliados produtos secretados pela cepa parental PAO1 e suas mutantes PAO1 Δ H1, PAO1 Δ H2, PAO1 Δ H3, PAO1 Δ H1 Δ H2, PAO1 Δ H1 Δ H3, PAO1 Δ H2 Δ H3, PAO1 Δ H1 Δ H2 Δ H3, todas apresentando deleções relacionadas ao T6SS; e a cepa parental PA14 e suas mutantes PA14 Δ pscN, PA14 Δ pscN Δ H2, PA14 Δ pscN Δ vgrG14rhs14, apresentando deleções relacionadas ao T6SS e todas mutadas no T3SS, com deleção no gene pscN e, conseqüentemente, com o efeito citotóxico de ExoS abolido. O sistema T3SS

utiliza ATPases para a translocação de proteínas efetoras do complexo proteico, em forma de agulha, para injetar suas exotoxinas nas células hospedeiras eucarióticas. PscN atua como uma ATPase de fundamental importância para a manutenção e funcionalidade desse sistema (HALDER; ROY; DATTA, 2019)

Mais uma vez, as cepas analisadas secretaram no meio extracelular, durante o cultivo, substâncias com atividade inibitória sobre o crescimento das cepas de *C. gattii* (L27/01), mostrando halos de inibição límpidos e bem definidos (figura 15), independente das deleções gênicas em T6SS e T3SS.



Figura 15: Atividade antagonista de metabólitos secretados por diferentes cepas mutantes de *P. aeruginosa*, comparativamente às suas cepas parentais: (**PAO1** - PAO1ΔH1, PAO1ΔH2, PAO1ΔH3, PAO1ΔH1ΔH2, PAO1ΔH1ΔH3, PAO1ΔH2ΔH3, PAO1ΔH1ΔH2ΔH3) e (**PA14** - PA14ΔpscN, PA14ΔpscNΔH2, PA14ΔpscNΔvgrG14rhs14)

PA14 Δ pscN Δ vgrG14rhs14). Os halos lípidos formados mostram zonas de inibição do crescimento de *C. gattii* (L27/01).

É interessante observar que, como exposto por Mikkelsen, McMullan e Filloux, 2011, PA14 é uma cepa altamente virulenta que causa doenças em uma ampla gama de organismos, enquanto PAO1 é considerada moderadamente virulenta. E embora o PA14 possua ilhas de patogenicidade ausentes em PAO1, a presença ou ausência de agrupamentos de genes específicos não é preditiva de virulência (MIKKELSEN; MCMULLAN; FILLOUX, 2011).

Assim, como exposto por Crousilles e colaboradores, 2015, apesar do grande arsenal genômico que permite a produção de inúmeros fatores de virulência, “*P. aeruginosa* não é um patógeno profissional e precisa se adaptar ao ambiente hospedeiro para sobreviver”. Análises comparativas de RNASeq (transcriptoma - quantificando os níveis de transcrição) e TnSeq (sequenciamento de Transposons - avaliando a contribuição dos genes específicos para *fitness in vivo*) revelou que havia baixa correlação entre a abundância de transcritos e a contribuição do gene correspondente, mostrando que *P. aeruginosa* é capaz de ajustar suas vias metabólicas durante a infecção para se adaptar ao conjunto de nutrientes e oferta de oxigênio disponíveis no hospedeiro ou meio ambiente, dessa forma, nem todos os tipos de infecção provocam os mesmos requisitos metabólicos em *P. aeruginosa* (CROUSILLES et al., 2015).

Além da técnica *spot on the lawn*, também foi realizado o cultivo de *C. gattii* L27/01 em sobrenadantes de culturas de diferentes cepas de *P. aeruginosa* (Pa – ATCC27853, PAO1, PAK e PA103). Embora haja limitações nessa técnica, impostas pela ampla gama de metabólitos secretados que poderiam perder a viabilidade quando no meio extracelular, como por exemplo, a ação de proteases da própria bactéria que poderiam inibir exotoxinas, o crescimento de Cg foi inibido quando cultivado nesses sobrenadantes e comparados com os controles – meio BHI e BHI acrescido de salina (figura 16(A)). Além disso, a literatura nos informa que a expressão e secreção de ExoS e ExoU, importantes exotoxinas, ocorrem apenas mediante contato da bactéria com a célula hospedeira ou, *in vitro*, quando ocorre uma deficiência expressiva de cálcio no meio de cultura, o

que foi possível na técnica de *spot on the lawn*, com a adição de quelantes de cálcio, mas não ocorreu no crescimento de Cg nos sobrenadantes de cultura *P. aeruginosa*. É interessante observar que os metabólitos secretados por PA103 não produziram um efeito expressivo na inibição de Cg, entretanto, essa mesma cepa, quando inoculada em animais, apresentou um perfil de virulência diferente das demais cepas. A análise de sobrevivência foi realizada com um inóculo de 10^5 UFC de cada cepa (Pa – ATCC27853, PAO1, PAK e PA103) e administradas por via intranasal em camundongos BALB/c (figura 16(B)). A cepa PA103 desencadeou um quadro de pneumonia grave poucas horas após a inoculação, levando os animais a óbito em menos de 24 horas, já as outras cepas, com concentrações dos inóculos semelhantes, apresentaram um quadro clínico mais atenuado, com piloereção, encurvamento de dorso e hiperventilação, restabelecendo à normalidade em torno de 3 a 4 dias, não tendo sido registrados óbitos até 20 dias pós-infecção (figura 16(B)).

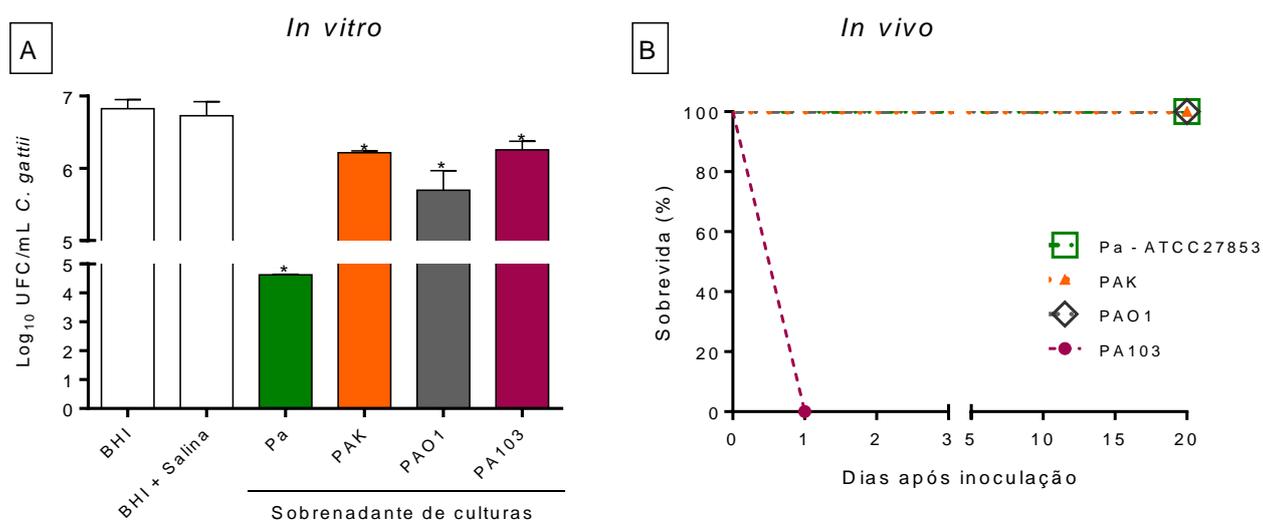


Figura 16: Crescimento de *C. gattii* em sobrenadantes de culturas de diferentes cepas de *P. aeruginosa* (Pa – ATCC27853, PAO1, PAK e PA103) e Sobrevivida de camundongos infectados com diferentes cepas de *P. aeruginosa*. **(A)** Cultivo de *C. gattii* L27/01 em sobrenadantes de culturas de diferentes cepas de *P. aeruginosa* (Pa – ATCC27853, PAO1, PAK e PA103) – One Way ANOVA - Newman-Keuls multiple comparisons test $^*p < 0,05$. **(B)** Sobrevivida de camundongos infectados com 10^5 UFC de Pa-ATCC27853, PAK, PAO1 e PA103. Grupo que recebeu PA103 foi a óbito dentro das 24 horas após inoculação. Os grupos que receberam as demais cepas apresentaram sinais característicos doença com melhora a partir de 3-4 dias, evoluindo para total recuperação.

5.1.3 Atividade inibitória da piocianina secretada por *P. aeruginosa* contra *Cryptococcus*

Como já exposto anteriormente, a piocianina (PCN) é uma fenazina, secretada por *P. aeruginosa* (Pa), responsável por dar ao meio de cultura uma coloração azul esverdeada. É um composto redox ativo, capaz de aceitar e doar elétrons, e pode facilmente atravessar membranas biológicas. Muitos estudos mostraram que esse fator de virulência contribui significativamente para a patogênese da fibrose cística (FC) e de outras bronquiectasias de pacientes infectados por Pa. A PCN é considerada um dos fatores de virulência mais importante, tanto que alguns estudos mostraram que a administração dessa toxina purificada nas vias respiratórias de camundongos, por longos períodos, pode causar um fenótipo pulmonar semelhante ao observado na FC. Além disso, essa toxina possui um enorme potencial de aplicação em biotecnologia, sendo capaz de degradar hidrocarbonetos, inclusive contaminantes ambientais (ABDUL-HUSSEIN; ATIA, 2016; LAU et al., 2004; RADA; LETO, 2013).

Assim, foi interessante avaliar o efeito dessa toxina sobre *Cryptococcus*. Primeiro foi realizado um ensaio de microdiluição para detectar os valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) da Piocianina® (Sigma-Aldrich). Foi observado um valor de CIM de 32 µg/mL para *C. gatti* L27/01 e *C. neoformans* H99 e CIM de 64 µg/mL para *C. gattii* R265. Os valores referentes às CFM foram de 128 ou maior que 128 µg/mL para *C. gatti* L27/01 e *C. neoformans* H99, respectivamente, e CFM maior que 256 µg/mL para *C. gattii* R265 (figura 17 A).

A partir dos valores de CIM obtidos, foram realizadas curvas de crescimento de *Cryptococcus* na presença de 6,4 µg/mL de PCN. Esse ensaio teve como objetivo avaliar a susceptibilidade de *Cryptococcus* na presença de concentrações subinibitórias de PCN. De fato, a PCN apresentou um poder inibitório muito interessante frente às cepas analisadas, ressaltando a importância desse fator de virulência de Pa (figura 17 B, C e D).

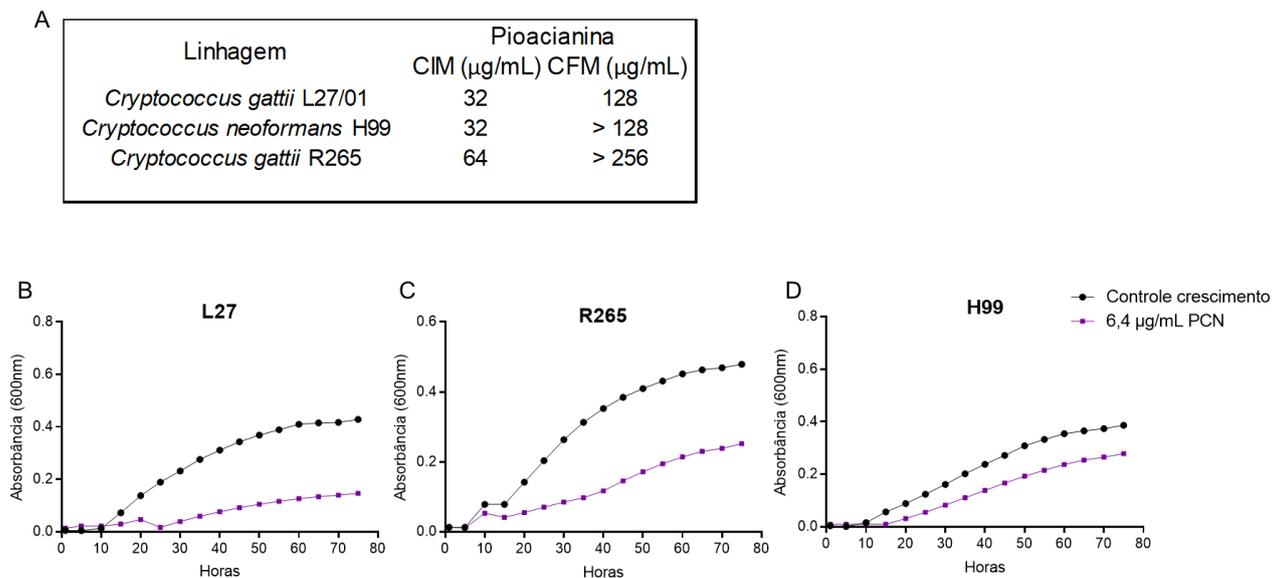


Figura 17: Atividade inibitória da Pioacianina[®] - extraída de *P. aeruginosa* e comercializada por Sigma-Aldrich - frente a três diferentes cepas de *Cryptococcus*. Os ensaios foram realizados em meio RPMI, com inóculo inicial de 10^4 leveduras por poço. **(A)** Detreminação da concentração inibitória mínima (CIM - $\mu\text{g/mL}$) e da concentração fungicida mínima (CFM - $\mu\text{g/mL}$) de pioacianina frente à *C. gattii* (L27/01 e R265) e frente à *C. neoformans* (H99). **(B)**, **(C)** e **(D)** - Curva de crescimento de *C. gattii* (L27/01**(B)** e R265**(C)**) e de *C. neoformans* (H99**(D)**) frente a uma concentração subinibitória de 6,4 $\mu\text{g/mL}$ de pioacianina (10 vezes inferior à concentração obtida no CIM para *C. gattii* (L27/01)).

5.2 Análise de sobrevida de camundongos infectados com Pa (ATCC27853)

A partir das observações *in vitro*, foram iniciados os experimentos *in vivo*, para avaliar a influência da infecção bacteriana (Pa) no desenvolvimento e progressão da criptococose causada por *C. gattii* (Cg). Inicialmente, foi realizada a infecção dos animais com inóculos variáveis de Pa, tendo como objetivo padronizar um inóculo não letal, mas capaz de desencadear a doença, no caso a pneumonia. Para isso, foram testados três inóculos de Pa, nas concentrações de 10^9 , 10^7 e 10^5 UFC. Avaliando-se a mortalidade dos animais, observou-se que os inóculos de 10^9 e 10^7 promoveram uma pneumonia aguda e fulminante, levando os camundongos a óbito em menos de 24 horas após inoculação (Figura 18 (A)).

Já com o inóculo de 10^5 UFC, os animais ficaram doentes, com sintomas clássicos de pneumonia, apresentando piloereção, hiperventilação, encurvamento de dorso e perda de peso, entretanto, apresentaram melhora nos parâmetros observados após 3-4 dias de infecção. A variação de peso pode ser evidenciada na figura 18 (B), que mostra uma redução em torno de 10% do peso e recuperação a partir do quarto dia.

Dessa forma, o inóculo de 10^5 UFC foi escolhido como ideal para seguimento dos demais experimentos, pois promoveu o adoecimento dos animais, mas não foi letal. Os animais conseguiram recuperar e tiveram uma sobrevivência compatível com os camundongos não infectados (Figura 18 A e B).

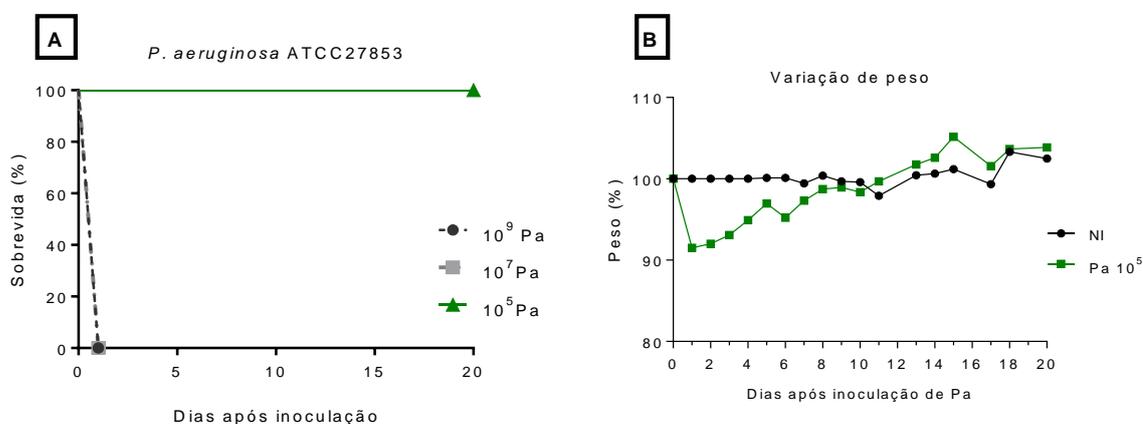


Figura 18: Sobrevivência e morbidade de camundongos infectados com inóculos variáveis (10^9 , 10^7 e 10^5 UFC) de Pa. (A) Sobrevivência de camundongos infectados com inóculos variáveis de Pa. Os animais inoculados com 10^9 e 10^7 UFC foram a óbito dentro das 24 horas após inoculação. O inóculo de 10^5 UFC causou sinais acentuados da doença com melhora a partir de 3-4 dias, evoluindo para total recuperação. (B) Variação de peso de animais infectados com 10^5 UFC de Pa. Animais apresentaram redução em torno de 10% e recuperação a partir de 3-4 dias. NI: Não infectado. Pa: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

5.3 Cinética de eliminação de *P. aeruginosa* (Pa)

A cinética de eliminação da bactéria foi avaliada com o objetivo de identificar um tempo ideal para realização da coinfeção. Na eutanásia realizada 24 horas após a infecção, Pa foi recuperada no lavado broncoalveolar (LBA), nos pulmões, coração e timo (figura 19 (A), (B) (C) e (D)). Após 3 e 6 dias da administração, houve recuperação de Pa apenas nos pulmões, ocorrendo uma redução da carga bacteriana (UFC) nesse órgão com o passar dos dias (figura

19 (B)). Após 10 e 15 dias, não houve recuperação de carga bacteriana em nenhum dos órgãos analisados. Não foram recuperados UFC de bactérias nos cérebros em todos os dias avaliados.

Também foi realizada a análise do perfil de recrutamento celular no LBA, em que foi possível observar uma mudança no perfil de células ao longo dos dias. No primeiro dia após inoculação (1 DPI) foi observado uma predominância de neutrófilos. Em 3 DPI, houve um equilíbrio entre neutrófilos e células mononucleadas. Em 6 DPI e 10 DPI houve predominância de células mononucleadas, com muitos linfócitos reativos e macrófagos alveolares esponjosos (figura 19 (E) e (E1)).

O perfil celular 15 DPI apresentou um menor recrutamento de células com predomínio de células epiteliais, raros linfócitos e macrófagos alveolares que são tipicamente encontrados em condições normais (grupo NI), mostrando uma total eliminação do processo inflamatório e retorno à normalidade (figura 19 (E) e (E1)).

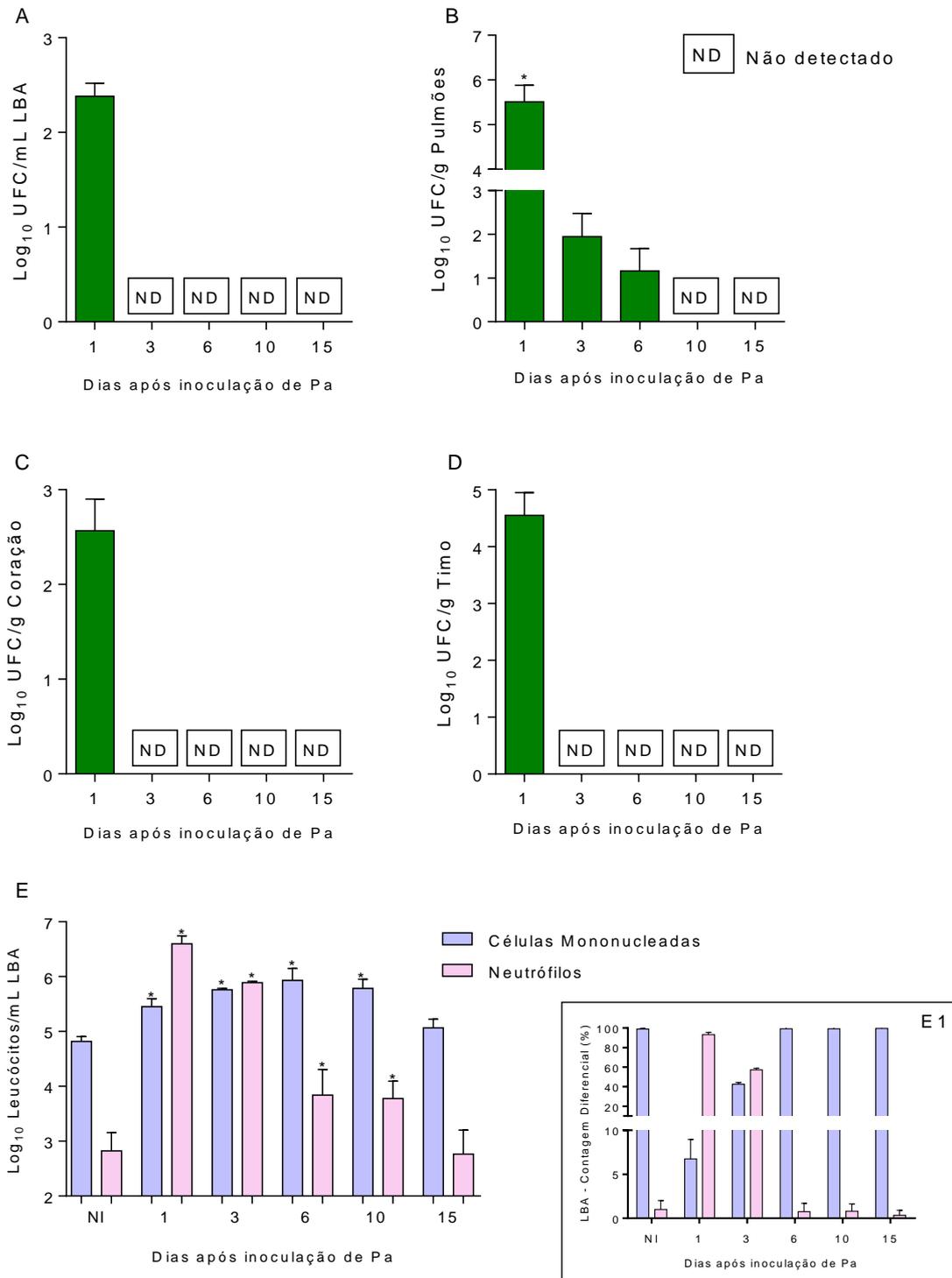


Figura 19: Cinética de eliminação bacteriana em órgãos de camundongos infectados via intranasal com 10^5 UFC de *P. aeruginosa* (Pa) e sacrificados 1, 3, 6, 10 e 15 DPI. (A) LBA, (B) pulmão, (C) coração e (D) timo. ND: não detectado. (B) Pulmão: ANOVA / Tukey's multiple comparisons test: * $p < 0,05$ diferenças estatísticas quando comparados 1DPIx3DPI e 1DPIx6DPI. (E) Perfil de recrutamento celular no LBA (lavado bronco alveolar), em valores absolutos – células/mL LBA, nos dias pós inoculação. Multiple t tests: *diferenças estatísticas quando comparados com o grupo NI - valores de células mononucleadas e neutrófilos respectivamente. (E1) Perfil de recrutamento celular no

LBA, contagem diferencial – valores percentuais de células mononucleadas e neutrófilos. DPI: Dias após inoculação.

A partir desta análise, e comparando com os resultados obtidos na análise de sobrevivência com diferentes inóculos, o terceiro dia após a inoculação de Pa (3DPI) apresentou características interessantes para a avaliação da coinfeção de Pa e Cg, considerando os sinais clínicos amenizados, o que favoreceu a inoculação por via intratraqueal do fungo e, presença de Pa nos pulmões. Assim, 3 DPI foi escolhido como o dia para a inoculação de *C. gattii*, formando o grupo Pa+Cg, grupo que recebeu a bactéria 3 dias antes da inoculação do fungo. Da mesma forma, também foi formado o grupo Cg+Pa, grupo que recebeu a bactéria 3 dias após a inoculação de Cg L27/01.

5.4 Análise de sobrevivência dos animais coinfectados e análise comportamental (SHIRPA)

Os animais foram infectados com a 10^5 UFC de Pa, 3 dias antes ou 3 dias após infecção com 10^4 leveduras viáveis de *C. gattii*, e foram acompanhados diariamente para avaliação da morbidade (protocolo SHIRPA) e construção de uma curva de sobrevivência para avaliar a mortalidade.

Os animais infectados somente com a bactéria (Pa) não sucumbiram à infecção, apresentando perda de peso imediatamente após inoculação da bactéria, mas com rápida recuperação, em torno de 3 a 4 dias (figura 20 (A) e (B)). Os animais infectados somente com *C. gattii* (Cg), tiveram uma média de sobrevivência de 26 dias, enquanto o grupo de animais que recebeu a bactéria 3 dias antes (Pa+Cg) apresentou uma média de sobrevivência de 32 dias, sendo 6 dias a mais ($p < 0,0001$) que os grupos (Cg) e (Cg+Pa). O grupo de animais que recebeu a bactéria 3 dias após a inoculação do fungo apresentou uma média de sobrevivência de 25 dias, sem diferenças significativas quando comparado ao grupo (Cg) (figura 20 (A)).

Observou-se que as manifestações iniciais da criptococose, como piloereção e hiperventilação, ocorreram acompanhadas com o início da perda de peso, o que pode ser visualizado no gráfico de variação de peso (figura 20 (B)).

Nos grupos Cg e Cg+Pa a perda de peso e os sinais clínicos da doença foram manifestados a partir do 15° ao 18° dia. O grupo Pa+Cg manifestou esses sinais iniciais a partir do 23° dia.

O atraso na letalidade observado no grupo Pa+Cg (figura 20 (A)) foi acompanhado com uma redução de morbidade, que mostrou melhoras significativas nos cinco parâmetros avaliados no protocolo SHIRPA, quando comparados com os grupos infectados somente com Cg e com o grupo Cg+Pa (figura 20 (C - I, II, III, IV, V)).

O atraso na letalidade foi simultâneo com um atraso na evolução dos sintomas, os animais do grupo Pa+Cg demoraram mais tempo para apresentar alterações clínicas significativas como perda de força e tônus muscular, comprometimento do comportamento motor, alterações das funções autônomas e sensoriais e comprometimento do SNC (estado neuropsiquiátrico). Essas observações chamaram a atenção pela possibilidade da infecção prévia por Pa promover uma modulação da resposta do hospedeiro, gerando um atraso na progressão da criptococose, ou até mesmo uma inibição de Cg por Pa no início da infecção, alterando inclusive o processo de colonização do fungo, o que poderia justificar a demora no desenvolvimento do processo infeccioso de Cg e, conseqüentemente, o atraso na letalidade. Assim, as próximas condutas foram direcionadas para compreender essa relação estabelecida entre Pa X Cg *in vivo* e as implicações da resposta do hospedeiro nesse processo.

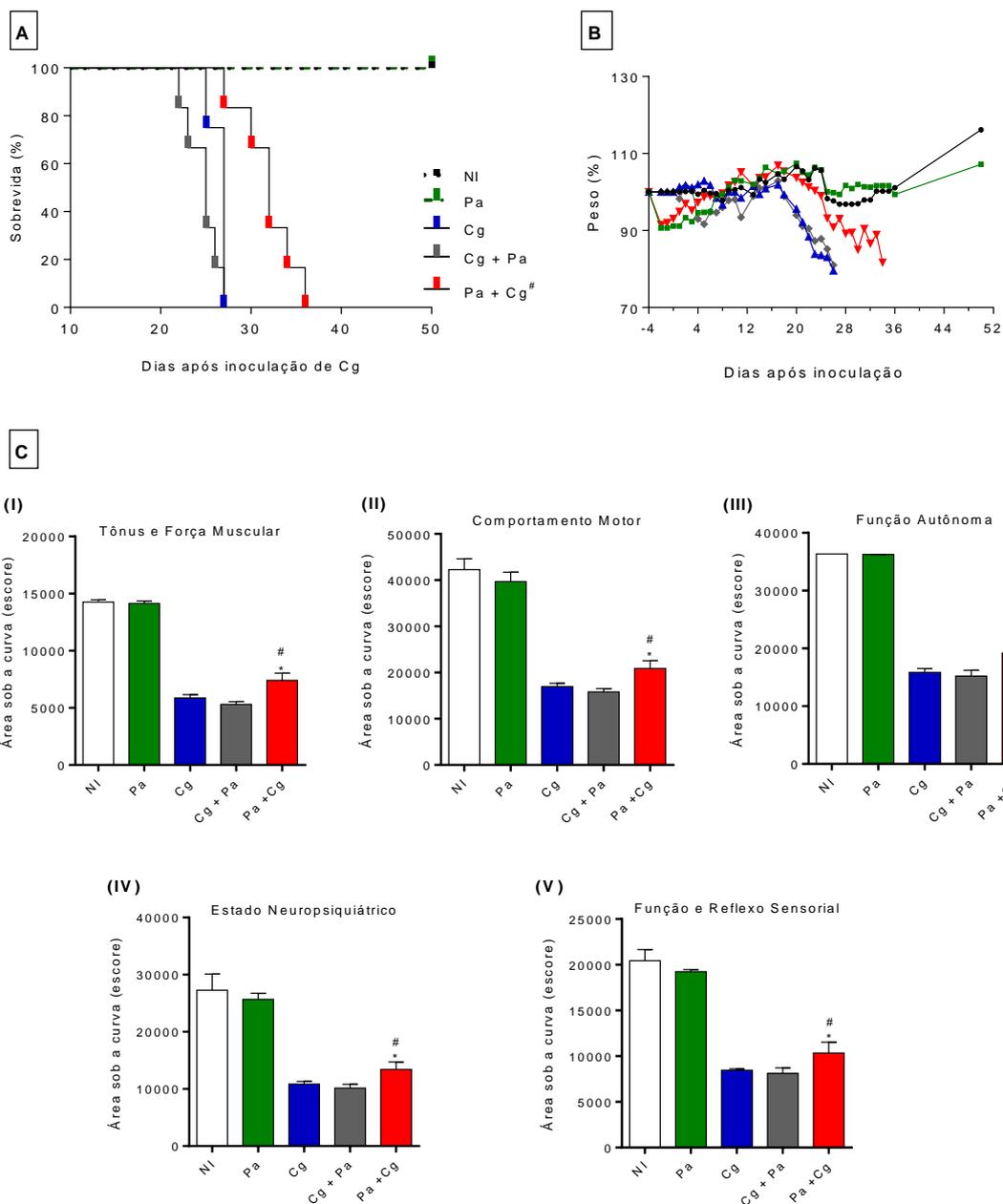


Figura 20: Morbimortalidade e avaliação do perfil comportamental dos animais (protocolo SHIRPA) infectados com Cg ou coinfectados com PA. (A) Curva de sobrevivência de camundongos infectados via intratraqueal com 10^4 células viáveis de Cg e/ou infectados via intranasal com 10^5 células viáveis de Pa - 3 dias antes e 3 dias após inoculação de Cg. # $p < 0,0001$ - diferença estatística em relação ao grupo Cg usando Long rank test. (B) Curva de variação de peso dos animais, valores percentuais. (C) A avaliação do perfil comportamental dos animais realizada através do protocolo SHIRPA, resultados encontrados por análise da área sob a curva das cinco categorias funcionais do escore de gráficos obtidos com o protocolo SHIRPA. (I) Tônus e força muscular; (II) Comportamento motor; (III) Função autônoma; (IV) Estado neuropsiquiátrico; (V) Função e reflexo sensorial. ANOVA / Tukey's multiple comparisons test: # $p < 0.001$ (diferença estatística quando comparado ao grupo Cg e Cg+Pa); * $p < 0.0001$ (diferença estatística quando comparado ao grupo NI). NI: Não infectado; Pa: grupo infectado com *P. aeruginosa*; Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Pa+Cg: grupo infectado com *P.*

aeruginosa 3 dias antes da infecção com *C. gattii*; Cg+Pa: grupo infectado com *P. aeruginosa* 3 dias após a infecção com *C. gattii*.

5.5 Quantificação da carga fúngica em órgãos alvos (pulmão, cérebro e LBA) - Avaliação do perfil de células no LBA - Histopatologia

Foi realizada a análise de carga fúngica nos pulmões, cérebros e LBA dos animais coinfectedados, avaliando diferentes períodos da coinfecção. Os grupos de animais foram eutanasiados em diferentes tempos, 1 dia, 10 e 18 dias após inoculação de Cg (grupos Cg1d e Pa+Cg1d; Cg10d, Pa+Cg10d e Cg18d, Pa+Cg18d). O grupo coinfectedado Cg+Pa foi analisado apenas o décimo dia após inoculação de Cg.

As análises relativas aos grupos eutanasiados um dia após a inoculação de Cg mostraram que a fase inicial da coinfecção foi de fato primordial para explicar o atraso da transmigração para o SNC e, conseqüentemente, o atraso da letalidade observados no grupo Pa+Cg. Nesse grupo, Pa+Cg 1d, foi observado uma redução de carga fúngica significativa nos pulmões (figura 21 A), sugerindo que embora ambos os grupos (Cg e Pa+Cg) tenham recebido o mesmo inóculo, o grupo Pa+Cg inicia o processo de infecção com menor carga fúngica que o grupo Cg.

A eutanásia dos animais no décimo dia de coinfecção, revelou uma redução significativa na carga fúngica recuperada nos pulmões e nos LBAs dos animais pertencentes ao grupo que recebeu a bactéria antes (Pa+Cg), quando comparados com os grupos Cg e Cg+Pa (figura 21 (A) e (C)). Com relação à carga fúngica no cérebro, houve recuperação no tecido cerebral dos grupos Cg e Cg+Pa. Esses dados demonstram que ocorreu transmigração do fungo para o SNC nesses grupos, antes mesmo da apresentação dos sinais clínicos característicos da criptococose. No grupo Pa+Cg, além da carga fúngica reduzida nos pulmões e LBA, no cérebro só foi possível recuperação de carga fúngica quando analisado volume de amostra quatro vezes maior que nos grupos Cg e Cg+Pa, e em apenas 40% dos animais analisados, média que se manteve em todos os experimentos realizados (figura 21 (C)).

O 18° dia foi escolhido por representar o tempo em que o grupo Cg manifestou sintomas clínicos mais graves, com expressiva perda de peso e hiperventilação. Entretanto, nesse período, não foram observadas diferenças significativas nas cargas fúngicas recuperadas nos pulmões e nos LBAs dos animais coinfectados (Pa+Cg), quando comparados com o grupo Cg (figura 21 (A) e (C)). Porém, o grupo Pa+Cg18d apresentou carga fúngica no tecido cerebral inferior ao grupo Cg18d (figura 21 (B)), corroborando com as análises realizadas no décimo dia após inoculação de Cg, mostrando que a infecção primária por Pa promoveu uma contenção do fungo, dificultando, atrasando, mesmo que temporariamente, a transmigração do fungo para o SNC.

A análise de recrutamento celular do LBA mostrou diferentes perfis entre os grupos analisados (figura 21 (D) e (D1)).

No primeiro dia após inoculação de Cg, o LBA do grupo Cg apresentou aumento de células mononucleadas, quando comparado ao grupo NI, mas com relação aos neutrófilos, não houve diferenças significativas. Entretanto, o grupo Pa+Cg apresentou aumento expressivos dessas células, tanto em comparação ao grupo NI, quanto ao grupo Cg (figura 21 D e D1).

Os LBAs dos animais do grupo Pa+Cg apresentaram no décimo dia após inoculação de Cg um perfil celular diferente, com predomínio de células mononucleadas reativas, enquanto os grupos Cg e Cg+Pa apresentaram predomínio de neutrófilos. Já no 18° dia, Cg e Pa+Cg apresentaram predomínio de neutrófilos no LBA (figura 21 D e D1).

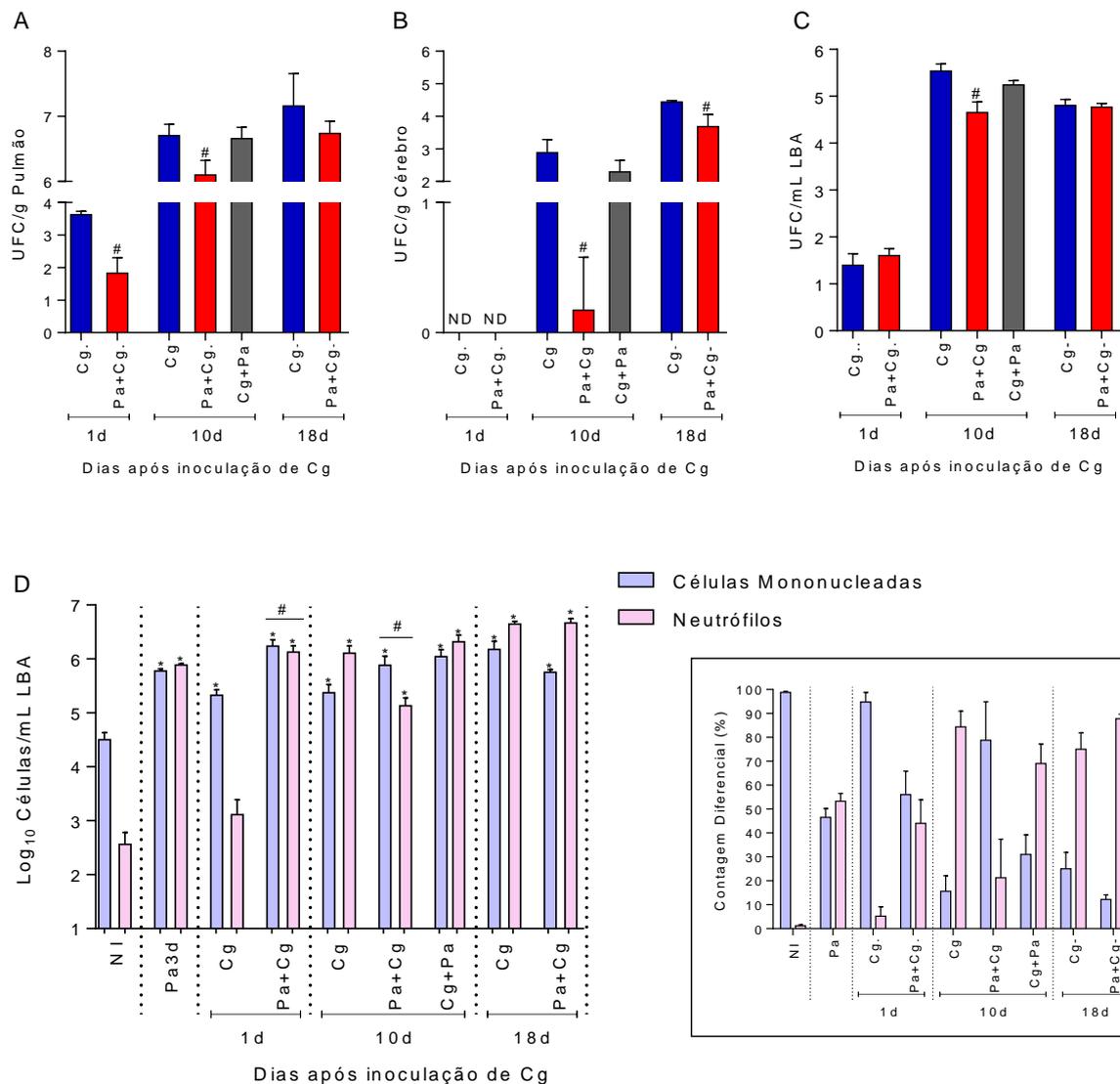


Figura 21: Mensuração da carga fúngica nos órgãos alvos – pulmões (**A**), cérebro (**B**) e LBA (**C**) de camundongos coinfetados, com 10^5 UFC de Pa via intranasal e 10^4 leveduras viáveis de Cg, via intratraqueal, e eutanasiados após 1 dia (1d), 10 dias (10d) e 18 dias (18d) após a inoculação de Cg. ANOVA / Tukey's multiple comparisons test: # - diferença estatística quando comparados os grupos Cg X Pa+Cg nos respectivos dias. (**D**) Perfil de recrutamento celular no LBA, em números absolutos – células/mL LBA, nos dias pós inoculação. Multiple t tests: * diferenças estatísticas quando comparados com o grupo NI; # diferenças estatísticas quando comparados os grupos Cg X Pa+Cg. (**D1**) Perfil de recrutamento celular no LBA, contagem diferencial – valores percentuais de mononucleados e neutrófilos. Pa: grupo infectado com *P. aeruginosa*. Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Pa+Cg: grupo infectado com *P. aeruginosa* 3 dias antes da infecção com *C. gattii*; Cg+Pa: grupo infectado com *P. aeruginosa* 3 dias após a infecção com *C. gattii*.

O mesmo perfil foi observado na análise histopatológica dos pulmões, em que foram avaliados o processo inflamatório e a presença do fungo no tecido pulmonar 10 dias após a infecção com Cg (figura 22).

Os seguintes parâmetros inflamatórios foram avaliados: arquitetura pulmonar (danos no tecido pulmonar), presença de infiltrado inflamatório (perivascular, peribronquial, alveolar e intersticial) e presença de hemorragia e necrose. Os parâmetros inflamatórios avaliados foram classificados com escores de 0 (ausente) a 5 (Difuso acentuado). Além disso, também foi avaliado a presença de células fúngicas no tecido pulmonar, sendo classificadas com escores de 0 (ausente) a 3 (Presente e acentuado).

Dessa forma, os exames histopatológicos dos pulmões demonstraram infiltrado inflamatório multifocal e intenso nos animais infectados somente com Pa (escore 4). Este grupo infectado somente com a bactéria (Pa) foi eutanasiado no terceiro dia após inoculação da bactéria e representa a condição do tecido pulmonar no dia 0, condição em que o fungo foi inoculado no grupo coinfecção Pa+Cg (figura 22 II). Os demais grupos foram eutanasiados no décimo dia após inoculação de Cg.

No grupo infectado com Cg foi possível observar numerosas leveduras de *C. gattii* nos alvéolos e nas ramificações broncoalveolares (escore 3), além de infiltrado inflamatório multifocal (escore 3) (figura 22 III). O grupo Cg+Pa apresentou redução no número de leveduras, com redução do escore para 2, quando comparado ao grupo Cg, entretanto apresentou infiltrado inflamatório difuso e acentuado (escore 5) (figura 22 V). O grupo Pa+Cg apresentou redução em todos os parâmetros analisados, quando comparado ao grupo Cg, com presença discreta de leveduras (escore 1) e infiltrado inflamatório multifocal (escore 3) (figura 22 IV).

A histopatologia do cérebro também foi realizada para o mesmo tempo de infecção (10 dias após inoculação de *C. gattii*), porém nenhuma alteração histopatológica foi identificada nos grupos avaliados (dados não mostrados).

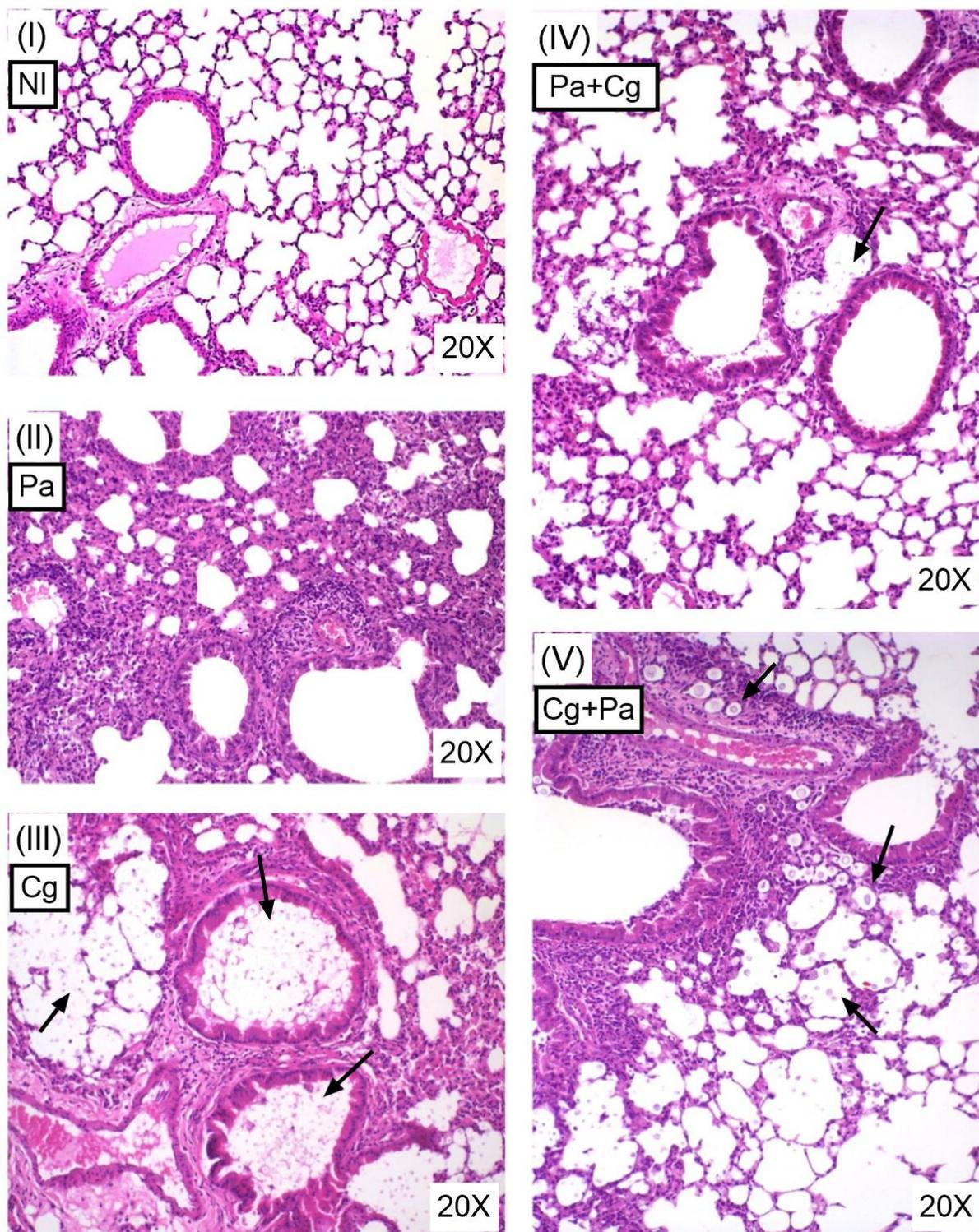


Figura 22: Análise histopatológica dos pulmões de camundongos coinfetados, com 10^5 UFC de Pa via intranasal e 10^4 leveduras viáveis de Cg via intratraqueal. Os animais foram eutanasiados após dez dias de inoculação de *C. gattii* e os pulmões recuperados, apenas o grupo Pa (II) foi eutanasiado 3 dias após inoculação da bactéria. As seções histológicas dos pulmões foram coradas com HE e visualizadas a uma amplificação de 100 e 200 X, foram avaliados pelo menos 10 campos por lâmina. A seta em Cg (III) indica a presença de leveduras dentro dos alvéolos, visualizadas como estruturas esféricas ou ovaladas, formando conglomerados, que induzem deformação anatômica

dos alvéolos (escore 3). Essas leveduras também podem ser observadas, em menor número nos grupos Cg+Pa (V) (escore 2) e Pa+Cg (IV) (escore 1). A presença de infiltrado inflamatório (perivascular, peribronquial, alveolar, intersticial, hemorragia e necrose) pode ser observada nos grupos Pa (escore 4), Cg (escore 3), Cg+Pa (escore 5) e Pa+Cg (escore 3). NI (I) apresentou escore 0 para inflamação e ausência de fungo. (I) NI: não infectado; (II) Pa: grupo infectado somente com *P. aeruginosa* e eutanasiado 3 dias após inoculação de Pa; (III) Cg: grupo infectado com *C. gattii*; (IV) Pa+Cg: grupo infectado com *P. aeruginosa* 3 dias antes da infecção com *C. gattii*; (V) Cg+Pa: grupo infectado com *P. aeruginosa* 3 dias após a infecção com *C. gattii*. Escores inflamação: 0=Ausente; 1=F (Focal); 2=FE (Focalmente Extenso); 3=M (Multifocal); 4=MC (Multifocal a Coalescente); 5=D (Difuso acentuado). Escores leveduras fúngicas: 0=Ausente; 1=Discreto; 2=Moderado; 3=Acentuado.

5.6 Análise de sobrevivência dos animais coinfetados com Pa inativada pelo calor (HK: *Heat Killed*) e com Pa em diferentes dias antes da infecção com *C. gattii*

Foi realizada a coinfecção com a bactéria inativada pelo calor (*heat killed*-HK) para avaliar a possibilidade de componentes de parede celular da bactéria deflagrarem uma resposta imune nos animais e, de forma semelhante, promover um atraso na letalidade. Assim, os animais foram infectados com 10^5 UFC de Pa HK (células inviáveis) 3 dias antes e 3 dias após infecção com 10^4 leveduras viáveis de *C. gattii* (grupos PaHK+Cg e Cg+PaHK respectivamente), e foram acompanhados diariamente, para a construção de uma curva de sobrevivência e avaliação da mortalidade (figura 23 A (I)). Outra forma de análise realizada foi a coinfecção com PaHK e Cg, mas com Cg sendo inoculado 5 horas após a inoculação de PaHK, também nas mesmas concentrações de inóculos, sendo 10^5 UFC de Pa HK (células inviáveis) via intranasal e, após 5 horas, foi inoculado 10^4 leveduras viáveis de *C. gattii* por via intratraqueal (figura 23 A (II)).

Nas duas formas de coinfecção analisadas (figura 23 A (I) e (II)), os grupos coinfetados com Pa HK (PaHK+Cg) não apresentaram diferenças significativas em relação ao tempo de sobrevivência comparativamente ao grupo infectado somente com o fungo (Cg).

Entretanto, o atraso na letalidade, a redução da morbidade e a redução da carga fúngica em órgãos alvos detectados nos animais do grupo Pa+Cg mostraram que a inoculação de Pa três dias antes da chegada de Cg nos pulmões consistiu num fator protetivo, retardando a progressão da criptococose, o que despertou o interesse para analisar um intervalo de dias em que a

presença ou os efeitos de Pa nos pulmões poderiam de forma semelhante retardar o desenvolvimento da doença fúngica. Assim, os animais foram coinfectedados com Pa nos dias -1, -3, -6, -15 e -80 dias antes da infecção por Cg (DAI) (figura 23 B). Os grupos Pa+Cg -1d e -3d apresentaram média de sobrevivência significativamente maior que o grupo Cg (29, 29,5 e 23 dias, respectivamente), o que representa quase uma semana no atraso da letalidade dos animais coinfectedados. Já os animais coinfectedados -6, -15, e -80 DAI não apresentaram alteração significativa na sobrevivência comparativamente ao grupo Cg (figura 23 B)).

Assim, por meio dessas análises de sobrevivências (figuras 23 (A) e (B)), foi possível observar que a presença da bactéria nos pulmões (detectadas nos dias 1 e 3 DPI – figura 19 A) foi de extrema importância para a promoção do atraso na letalidade. Além disso, para que esse efeito ocorresse, foi importante a viabilidade das células bacterianas, Pa precisava estar presente, mesmo que em pequenas concentrações e com metabolismo ativo (células viáveis). Além disso, foi importante considerar que o hospedeiro apresentava imunidade inata em ampla atividade, como visto na análise histopatológica, grupo Pa 3DPI com intenso infiltrado inflamatório (figura 22 (II)) e nos perfis de células do LBA, com aumento expressivo de células mononucleadas reativas e neutrófilos (figuras 19 E e E1).

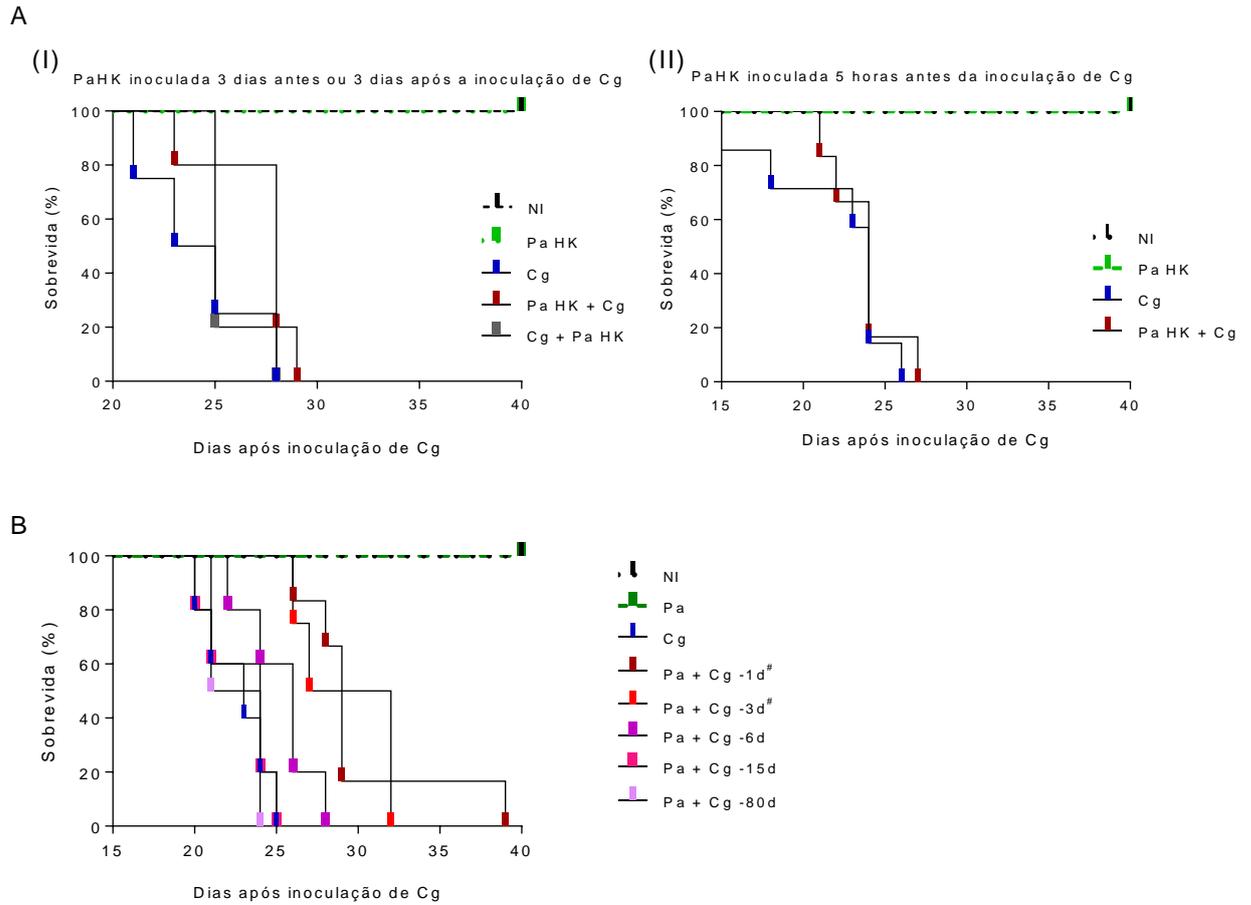


Figura 23: Curvas de Sobrevidas.

A) **(I)** - Curva de sobrevida de camundongos infectados via intratraqueal com 10^4 células viáveis de Cg ou coinfetados via intranasal com 10^5 células inviáveis de Pa (inativadas pelo calor – *Heat killed* (HK)). PaHK: grupo infectado com *P. aeruginosa* HK. Cg: grupo infectado com *C. gattii*; PaHK+Cg: grupo infectado com *P. aeruginosa* HK 3 dias antes da infecção com *C. gattii*; Cg+PaHK: grupo infectado com *P. aeruginosa* HK 3 dias após a infecção com *C. gattii*.

(II) - Curva de sobrevida de camundongos infectados via intratraqueal com 10^4 células viáveis de Cg ou coinfetados via intranasal com 10^5 células inviáveis de Pa (inativadas pelo calor – *Heat killed* (HK)). PaHK: grupo infectado com *P. aeruginosa* HK. Cg: grupo infectado com *C. gattii*; PaHK+Cg: grupo infectado com *P. aeruginosa* HK 5 horas antes da infecção com *C. gattii*.

B) Curva de sobrevida de camundongos infectados via intratraqueal com 10^4 células viáveis de Cg ou coinfetados via intranasal com 10^5 células viáveis de Pa -1, -3, -6, -15 e -80 dias antes de Cg. # $p < 0,001$ e * $p < 0,01$ - diferença estatística em relação ao grupo Cg usando Long rank test. NI: Não infectado; Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Pa+Cg -1d: grupo infectado com *P. aeruginosa* 1 dia antes da infecção com *C. gattii*; Pa+Cg -3d: grupo infectado com *P. aeruginosa* 3 dias antes da infecção com *C. gattii*; Pa+Cg -6d: grupo infectado com *P. aeruginosa* 6 dias antes da infecção com *C. gattii*. Pa+Cg -15d: grupo

infectado com *P. aeruginosa* 15 dias antes da infecção com *C. gattii*; Pa+Cg - 80d: grupo infectado com *P. aeruginosa* 80 dias antes da infecção com *C. gattii*.

5.7 Determinação *in vitro* da influência de *P. aeruginosa* (ATCC-27853) na fagocitose de *C. gattii* (L27/01) por macrófagos derivados de medula óssea - Ensaio de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação do estresse oxidativo (ROS, PRN)

Cryptococcus é considerado um patógeno intracelular facultativo, podendo sobreviver e se replicar no ambiente extracelular dos espaços alveolares ou no interior de macrófagos e neutrófilos. Assim, para sobreviver no meio extracelular, esse fungo desenvolveu diferentes estratégias para evitar a internalização por células fagocíticas, destacando-se a cápsula polissacarídica com suas proteínas antifagocíticas. Entretanto, os macrófagos alveolares e neutrófilos representam a primeira linha de defesa contra esse microrganismo, podendo resultar na morte do patógeno ou na replicação intracelular, determinando inclusive o grau de infecção, produzindo uma pneumonia localizada, uma doença disseminada grave ou, até mesmo um estado de latência. Os diferentes resultados possíveis após o engolfamento de leveduras mostram uma espetacular habilidade desse microorganismo em manipular o sistema imune do hospedeiro e utilizar macrófagos, uma poderosa célula de defesa, como mecanismo de evasão e como principal mecanismo de disseminação para o SNC, onde provoca a forma mais grave da doença, a meningoencefalite (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018; GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2012; WAGER et al., 2016).

Diante dessas considerações, avaliar a interação estabelecida com macrófagos já estimulados por contato prévio com *P. aeruginosa* foi de extrema importância para compreender um dos possíveis mecanismos envolvidos no atraso da progressão da criptococose observado no grupo coinfected Pa+Cg. Assim, foi realizado o ensaio de fagocitose, avaliando o índice fagocítico das leveduras (figuras 24 (A)), o índice de proliferação intracelular das leveduras (IPR) (figuras 24 (C) e (D)) e o efeito sobre o estresse oxidativo desses macrófagos,

representado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (PRN) (figuras 24 (E) e (F)).

Nesse trabalho foram usados macrófagos derivados de medula óssea (BMDM). Essas células representam um sistema aplicável para o estudo de fagocitose, apresentação de antígenos, produção de citocinas e migração em culturas de células, sendo um protocolo já bem padronizado pelo grupo (WEISCHENFELDT; PORSE, 2008). Os tempos de interação analisados foram de 30 minutos após inoculação de *P. aeruginosa* e de 3 e 6 horas para *C. gattii*, que foram inoculados nos poços em duas condições distintas: 1º) após lavagem e retirada de Pa (grupo Pa_{30min}+Cg) e 2º) na presença de Pa, a bactéria não foi retirada dos poços (grupo Pa+Cg); estabelecendo em ambos os casos uma proporção (MOI - *multiplicity of infection*) de 1:1 (1 célula:1 levedura).

Dessa forma, a análise do índice fagocítico mostrou uma fagocitose da levedura significativamente menor nos grupos Pa_{30min}+Cg e Pa+Cg, em relação ao grupo Cg, nos tempos analisados (figura 24 (A)). Entretanto, nesses grupos (Pa_{30min}+Cg e Pa+Cg) também foi observado uma quantidade significativamente maior de leveduras aderidas à superfície dos macrófagos em relação ao grupo Cg (figura 24 (B)). Na figura 24 (A1) observa-se macrófagos com leveduras internalizadas, perfil encontrado no grupo Cg; já o perfil visualizado na figura 24 (B1) ilustra campos comumente encontrados nos grupos Pa_{30min}+Cg e Pa+Cg, em que é possível observar macrófagos com leveduras internalizadas, porém há maior quantidade de leveduras aderidas na superfície extracelular dos macrófagos, que parecem desenvolver invaginações em suas membranas, entretanto, a maioria das leveduras permanecem no exterior, não foram engolfadas.

A figura 24 (C) mostra um reduzido índice de proliferação intracelular das leveduras (IPR) recuperadas após serem fagocitadas, sugerindo que os macrófagos estimulados previamente pela bactéria (grupos Pa_{30min}+Cg e Pa+Cg) apresentaram uma maior eficiência fungicida em relação aos macrófagos do grupo Cg. A figura 24 (D) apresenta o somatório das UFC recuperadas no ambiente extracelular (sobrenadante) e intracelular (após lise dos macrófagos) em cada grupo analisado. Essa análise mostrou que no tempo de 3 horas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e no

tempo de 6 horas foi possível observar redução de UFC nos grupos com a presença da bactéria (Pa_{30min}+Cg e Pa+Cg) em relação ao grupo Cg, corroborando com os dados de IPR (figura 24 (C)) e, servindo como parâmetro para validar a análise de IPR, mostrando que de fato houve uma maior eficiência fungicida do macrófago e não um dado decorrente da menor fagocitose, além disso, é importante lembrar que o processo de exposição aos microorganismos foi diferente nos ensaios de fagocitose e IPR.

O estresse oxidativo dos macrófagos, caracterizado pela produção de enzimas (NADPH oxidases (do inglês - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases*) e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (PRN) representam um importante mecanismo pelo qual os macrófagos respondem aos estímulos provocados pelos microorganismos, exercendo atividade microbicida (FERRARI et al., 2011). As análises de ROS e PRN indicaram aumento expressivo na produção de ambas as espécies reativas no grupo estimulado com Pa (grupos Pa_{30min} e Pa_{30min}+Cg) em comparação ao grupo Cg (figuras 24(E) e (F)). Assim, pode-se inferir que a redução de carga fúngica encontrada no grupo Pa_{30min}+Cg na análise de IPR, foi associada à maior produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio promovidas pelo estímulo prévio com a bactéria, o que levou à morte do fungo pelos macrófagos. Esse achado poderia explicar a diferença de carga fúngica observada, *in vivo*, entre os grupos Pa+Cg e Cg e, inclusive, explicar a menor taxa de transmigração para o cérebro observada no grupo Pa+Cg, em fases iniciais da infecção, uma vez que a literatura sugere que o mecanismo de “cavalo de tróia” seja a principal via de *Cryptococcus* para o SNC (SANTIAGO-TIRADO et al., 2017b; SORRELL et al., 2016).

Com relação às análises realizadas com a bactéria se mantendo presente durante todo o tempo de incubação (3 e 6 horas), também foi observado uma redução do índice fagocítico (grupo Pa+Cg) quando comparado ao grupo Cg e um aumento percentual no número de macrófagos com leveduras aderidas na superfície (figuras 24 (A) e (B)). A figura 24 (C) mostra um reduzido índice de proliferação intracelular das leveduras (IPR), entretanto, a redução de IPR não foi associada aos resultados de ROS e PRN (figuras 24 (E) e (F)). Na presença da bactéria metabolicamente ativa houve redução de ROS (grupos Pa e Pa+Cg) tanto em relação ao grupo controle M0 (somente macrófagos) quanto ao grupo

Cg. Com relação a análise de PRN, não foram observadas diferenças significativas quando comparados com o grupo controle M0, apontando uma redução de PRN apenas no grupo Pa em comparação ao grupo Cg.

O aumento da atividade fungicida dos macrófagos foi observado nas situações em que a infecção foi realizada com a bactéria viável, metabolicamente ativa, independente das condições estudadas, apenas estímulo de 30 minutos ou estímulo seguido da presença da bactéria durante todo o tempo de incubação. Entretanto, na presença da bactéria durante todo o protocolo, a atividade fungicida não foi associada aos dados de ROS e PRN, isso por que provavelmente as bactérias, tendo sido expostas aos macrófagos 30 minutos antes da inoculação de Cg, gerou um estímulo, seguido de fagocitose de Pa que estando metabolicamente ativa promoveu inibição ou até mesmo um esgotamento do arsenal enzimático desses macrófagos. Pa apresenta cápsula e outros fatores de virulência capazes de neutralizar enzimas e as espécies reativas, por isso os valores reduzidos de ROS e PRN nos grupos Pa e Pa+Cg (figuras 24 (E) e (F)). Assim, a redução de IPR, nesses grupos, ocorreu possivelmente por ação direta de metabólitos de Pa sobre Cg, e não por ação dos macrófagos.

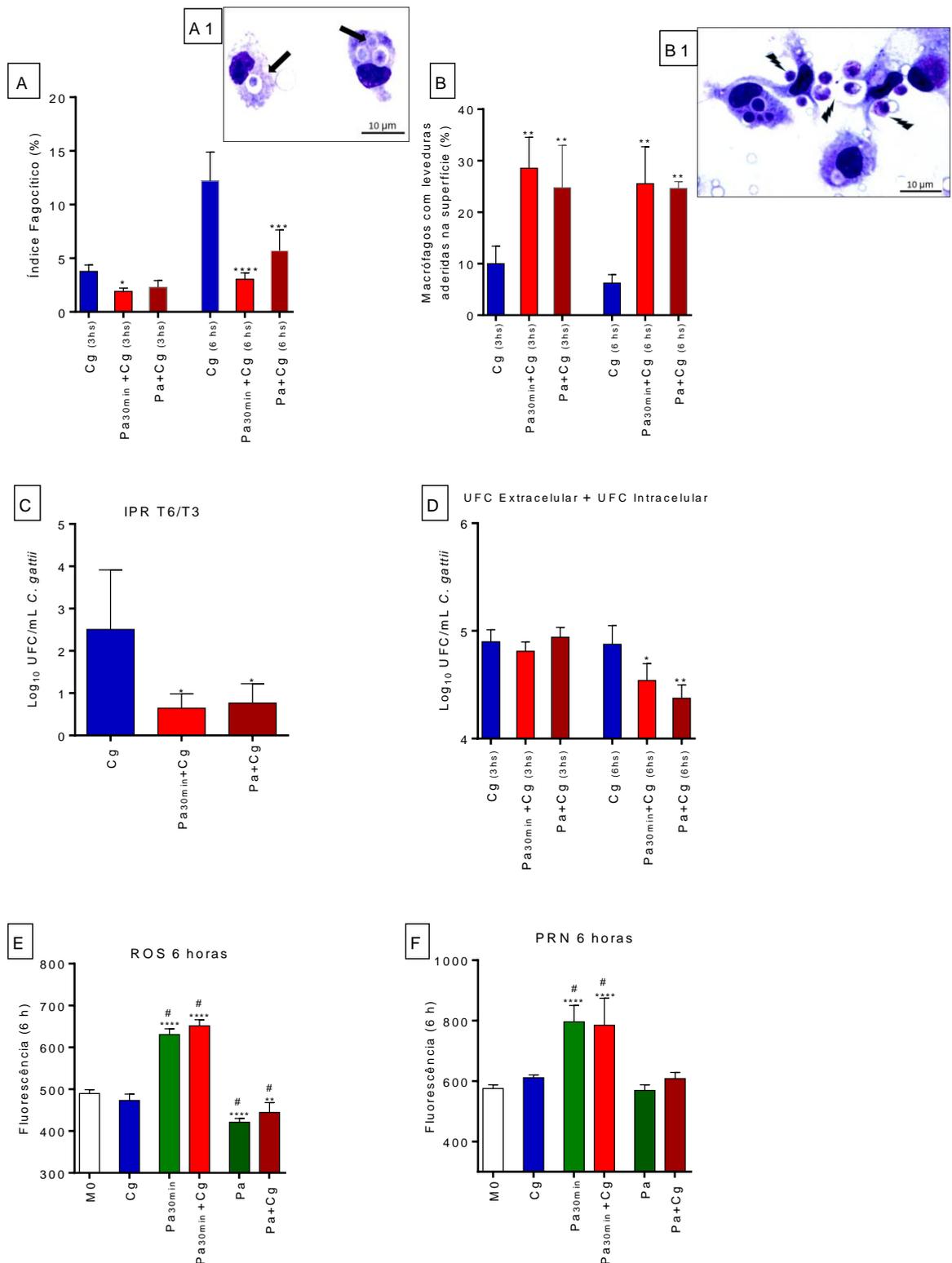


Figura 24: Ensaio de fagocitose *in vitro*, proliferação intracelular (IPR) e produção de espécies reativas (ROS e PRN) – realizados sob estímulo de *P. aeruginosa* (Pa_{30min} e Pa_{30min}+Cg) e realizados na presença de *P. aeruginosa* (Pa e Pa+Cg). **(A)** Índice fagocítico percentual após 3h e 6h de incubação com *C. gattii*. **(A1)** Macrófagos com leveduras internalizadas, as setas destacam as leveduras de *C. gattii* no interior dos macrófagos, podendo em muitos casos serem visualizadas várias leveduras. **(B)**

Valores percentuais de macrófagos que apresentaram leveduras aderidas em sua superfície externa. **(B1)** Macrófagos com leveduras aderidas na superfície, alguns apresentando invaginações de membrana e macrófagos com leveduras em seu interior. **(C)** Relação da proliferação intracelular (IPR) *in vitro* de *C. gattii* internalizados entre os tempos de 6 e 3 horas. **(D)** Somatório das cargas fúngicas (UFC) extracelular (recuperadas do sobrenadante) e intracelular (recuperadas a partir da lise celular) obtidas em cada tempo avaliado. **(E)** e **(F)** Produção de espécies reativas de oxigênio - ROS (E) e nitrogênio – peroxinitrito - PRN (E) após 6h de infecção por *C. gattii*. Foram formados grupos de macrófagos BMDMs infectados somente com *C. gattii* (grupo Cg); infectados com *C. gattii* após infecção prévia com Pa_{30min} (30 minutos seguido de lavagem dos poços) (grupo Pa_{30min}+Cg) e infectados somente com Pa_{30min} (grupo Pa_{30min}); infectados com *C. gattii* após infecção prévia com Pa (grupo Pa+Cg) e infectados somente com Pa (grupo Pa) - grupos em que a bactéria se manteve presente em todo o período de incubação; grupo controle somente macrófagos BMDMs (grupo M0). *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 e ****p<0.0001 diferenças estatísticas em relação ao grupo Cg (em A, B, C e D) e ao grupo M0 (em E e F). # diferença estatística quando comparado ao grupo Cg.

Considerando a excepcional capacidade de *P. aeruginosa* em secretar diversas substâncias que apresentam atividade fungicida, foi realizado um novo ensaio de fagocitose, utilizando a bactéria inativada pelo calor (heat killed -HK), com o objetivo de analisar os efeitos da fagocitose de Cg na presença do estímulo de Pa inativada, sem os fatores de virulência secretados pela bactéria no meio, e confrontar com os resultados obtidos na fagocitose anterior com estímulo de Pa metabolicamente ativa.

A realização do ensaio de fagocitose com a presença bactéria inativada pelo calor (grupo PaHK+Cg) mostrou, de forma semelhante, uma redução no índice fagocítico de *C. gattii*, após 24 horas de incubação, quando comparado ao grupo Cg (figura 25 (A)). E em relação ao percentual de macrófagos com leveduras aderidas na superfície, foi observado um aumento no grupo PaHK+Cg em relação ao grupo Cg (figura 25 (B)). Entretanto, a atividade fungicida dos macrófagos do grupo PaHK+Cg se mostrou reduzida em relação ao grupo Cg (figura 25 (C)), o que pode ser associado com os valores obtidos em ROS e PRN (figura 25 (D) e (E)). Não houve aumento de ROS nos grupos PaHK e PaHK+Cg em relação ao grupo Cg. Os valores obtidos para PRN foram ainda menos expressivos, não havendo diferenças entre os grupos infectados e o grupo controle M0.

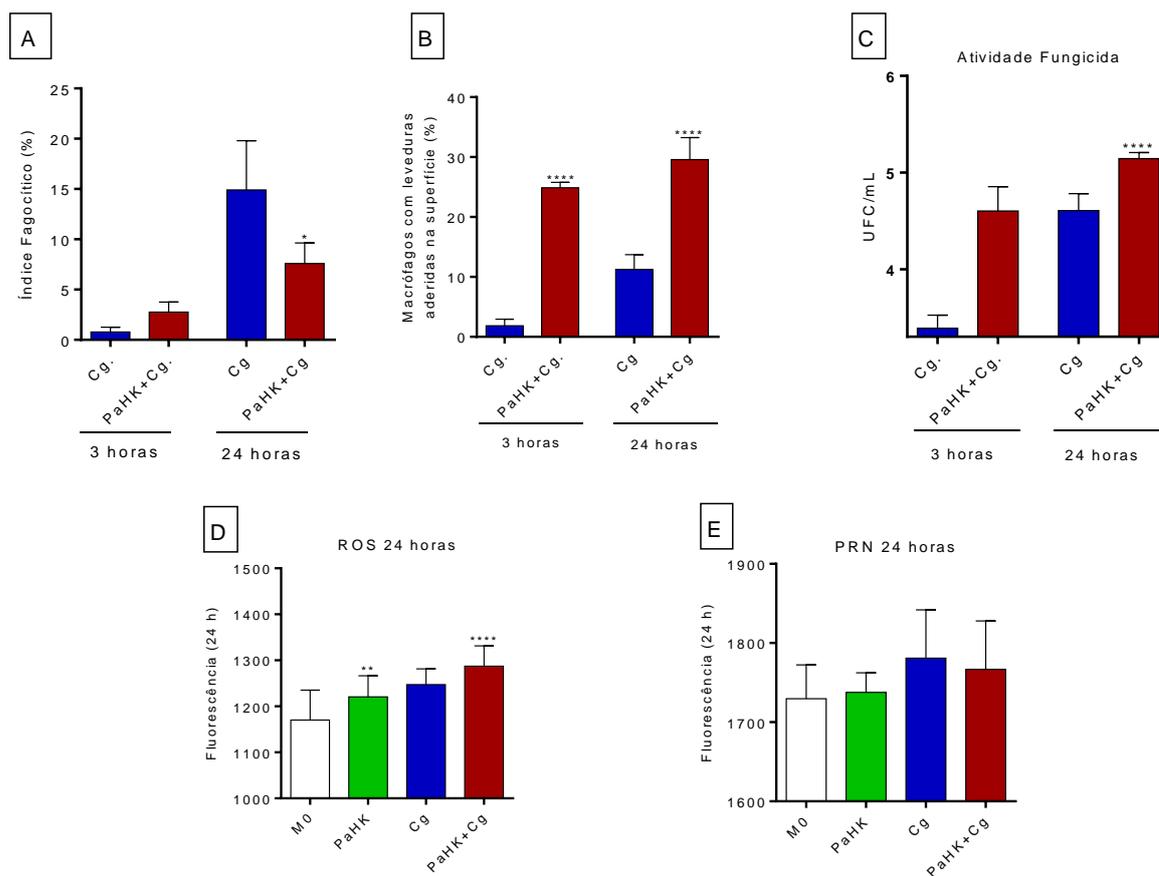


Figura 25: Ensaio de fagocitose *in vitro*, proliferação intracelular (IPR) e produção de espécies reativas (ROS e PRN) – realizados com *P. aeruginosa* (Pa) inativada pelo calor (*heat killed* – HK) - PaHK. **(A)** Índice fagocítico percentual após 3h e 24h de incubação com *C. gattii* (Cg). **(B)** Valores percentuais de macrófagos que apresentaram leveduras aderidas em sua superfície externa. **(C)** Atividade fungicida dos macrófagos após incubação de 3 e 24 horas com PaHK e/ou Cg. **(D)** e **(E)** Produção de espécies reativas de oxigênio - ROS (D) e nitrogênio - PRN (E) após 24h de infecção por PaHK e/ou Cg. Foram formados grupos de macrófagos BMDMs infectados somente com *C. gattii* (grupo Cg), infectados com *C. gattii* após infecção prévia com PaHK (grupo PaHK+Cg), infectados somente com PaHK (grupo PaHK) e grupo controle somente BMDMs (grupo M0). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ diferenças estatísticas em relação ao grupo Cg (em A, B, C) ou ao grupo M0 (em D).

Essas análises mostraram que embora a bactéria inativada (PaHK) promova uma alteração no perfil fagocítico dos macrófagos, a atuação dos receptores externos da bactéria, como os expostos na parede celular, cápsula ou flagelos, não foram suficientes para promover uma ativação mais intensa, alterando o estresse oxidativo dessas células e até mesmo otimizando sua capacidade microbicida.

Essas reflexões fortaleceram as observações com relação ao papel dos macrófagos na resposta imune inata dos animais coinfectados, contribuindo para explicar a reduzida carga fúngica nos órgãos, especialmente nos cérebros de animais coinfectados com Pa (Pa+Cg).

5.8 Quantificação do estresse oxidativo em células de LBA de animais infectados com *P. aeruginosa* – ROS e PRN *in vivo*

Para corroborar os dados obtidos nos ensaios de ROS e PRN com BMDM *in vitro*, foram realizadas análises de ROS e PRN *in vivo* no LBA de animais infectados com Pa. Foi evidenciado um aumento pronunciado dessas espécies reativas no LBA do grupo infectado com Pa, mostrando que quando o animal é infectado com o fungo, este encontra um ambiente pulmonar reativo, com presença de substâncias tóxicas (ROS e PRN), sugerindo um sistema imune já estimulado (figura 26 (A) e (B)).

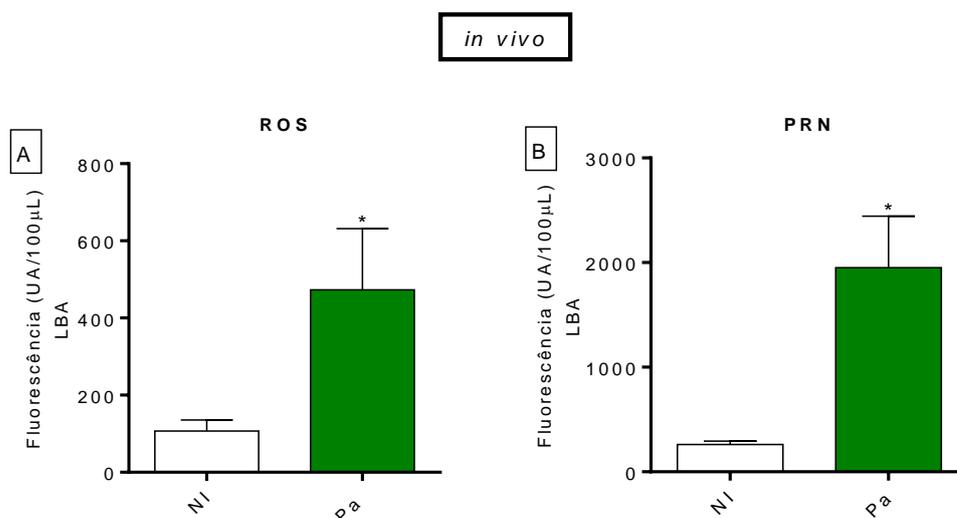


Figura 26: Quantificação de espécies reativas de oxigênio - ROS (A) e nitrogênio - PRN (B) no LBA de animais infectados com *P. aeruginosa* (Pa), três dias após inoculação de 10^5 UFC de Pa por via intranasal. * $p < 0.05$ - diferença estatística em relação ao grupo não infectado (NI).

5.9 Análise de mediadores inflamatórios, NAG, MPO e citocinas, nos pulmões dos animais coinfectados.

Os dados observados nos ensaios de sobrevivência com a bactéria inativada e em diferentes tempos de infecção (figura 23), somados aos achados nos ensaios de fagocitose, nas diferentes condições analisadas, sugeriram que tanto a influência de Pa sobre a resposta imune inata, como uma possível ação direta e inibitória de Pa sobre Cg poderiam ocorrer simultaneamente durante a coinfeção, justificando o atraso na letalidade dos animais coinfectados. Essas observações são fortalecidas pela presença de Pa recuperada dos pulmões no terceiro dia após inoculação da bactéria, dia em que foi inoculado Cg (figura 19 B).

A partir de todos esses achados apresentados até aqui, foram realizadas dosagens de NAG, MPO e citocinas (CXCL1, IL-1 β , IFN- γ , IL-17 e IL-10) no tecido pulmonar com o objetivo de conhecer o microambiente pulmonar dos animais coinfectados e confrontar com o presente no grupo Cg, para avaliar as possíveis diferenças no recrutamento de células e características do perfil inflamatório nesse processo.

A dosagem de NAG e de MPO no tecido pulmonar mostraram um aumento no influxo de macrófagos (figura 27 A) e neutrófilos (figura 27 B) para o grupo Pa+Cg1d, quando comparado ao grupo Cg1d, corroborando com a análise celular do LBA. Já no décimo dia, destaca-se o elevado número de neutrófilos no grupo Cg10d, evidenciado pela análise da enzima MPO (27 B).

A dosagem dos mediadores inflamatórios mostrou maiores concentrações de CXCL1 e IL-1 β no grupo Pa+Cg1d, quando comparado com o grupo Cg1d, e compatíveis com as concentrações observadas no grupo Pa. Essas citocinas pró-inflamatórias são marcadores muito importantes para caracterizar a resposta inflamatória aguda, sendo CXCL1 um dos mais importantes quimioatrativos para neutrófilos. IL-1 β é uma citocina produzida principalmente por macrófagos e possui inúmeras atividades celulares, incluindo proliferação e diferenciação celular, além de apoptose. Esses achados também corroboram com a reduzida carga fúngica no grupo Pa+Cg 1d, mostrando que o fungo ao chegar em um

ambiente com uma resposta imune inata já instalada, foi mais eficientemente contido (figuras 27 C e D).

Além disso, a resposta induzida por Pa promoveu no grupo Pa+Cg 10d uma produção antecipada de IL-10 (27 G), quando comparado com o grupo Cg. Essa citocina pode ter colaborado na modulação da inflamação no grupo Sa+Cg10d. Já no grupo Cg10d, o aumento de IFN- γ , CXCL-1 e IL-1 β , somado a menores concentrações de IL-10, pode ter contribuído para a exacerbação da inflamação e pior prognóstico (figuras 27 C, D, E e G). Com relação a IL-17, não foram observadas diferenças entre os grupos nos períodos analisados (figura 27 F).

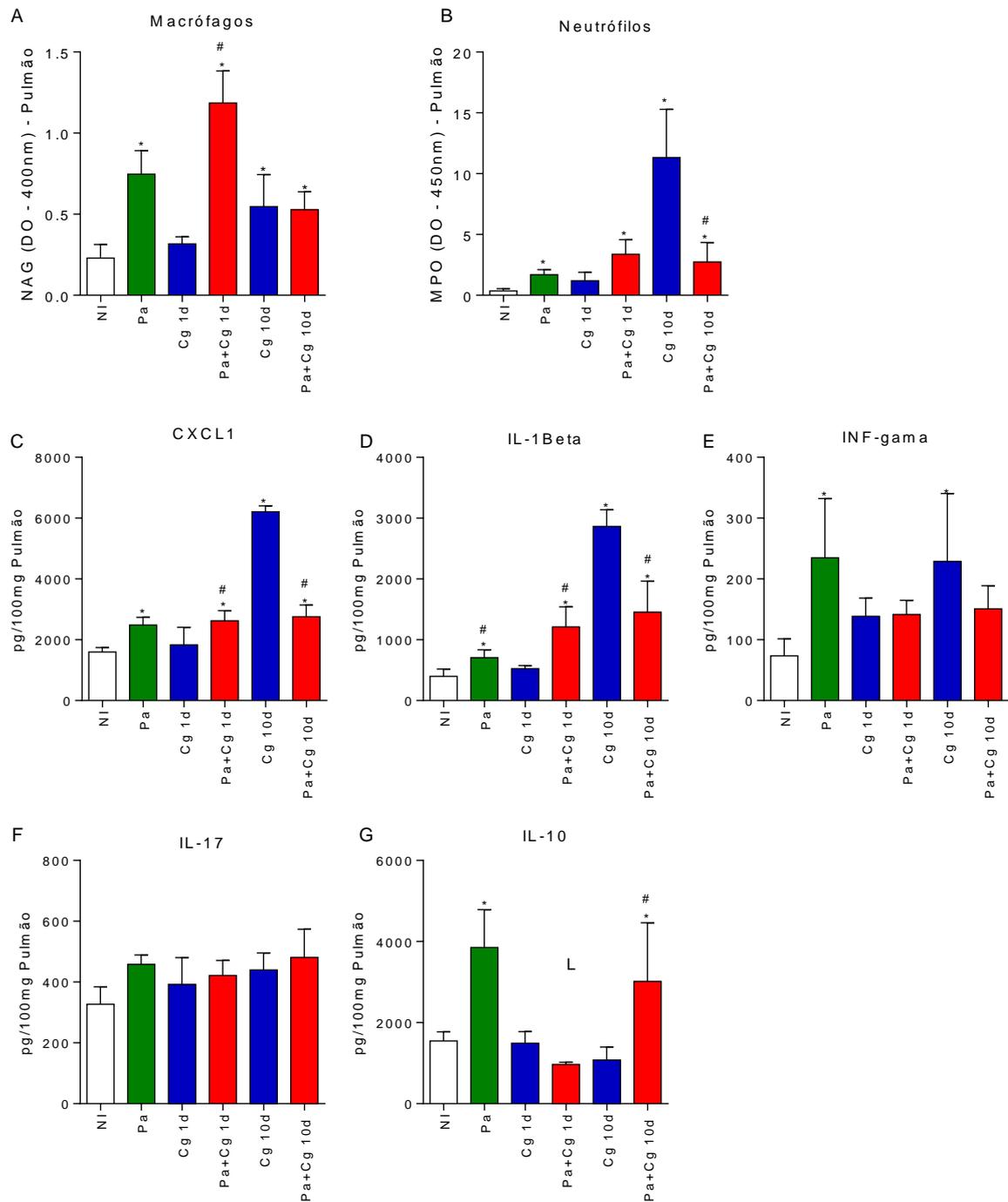


Figura 27: Análise de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar: número relativo de macrófagos (A) e neutrófilos (B) foram determinados indiretamente pela quantificação da atividade das enzimas NAG e MPO, respectivamente; quantificação de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos - níveis de CXCL-1 (C), IL-1 β (D), IFN- γ (E), IL-17 (F) e IL-10 (G). ANOVA/Newman-Keuls multiple comparisons test: * diferenças estatísticas quando comparados com o grupo NI; # diferenças estatísticas quando comparados os grupos Cg X Pa+Cg. Pa: grupo infectado com *P. aeruginosa* e eutanasiado 3 dias após inoculação da bactéria; Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Pa+Cg: grupo infectado com *P. aeruginosa* 3 dias antes da infecção com *C. gattii*. **Cg e Pa+Cg (1d e 10d)**: eutanásia realizada 1 dia e 10 dias após a inoculação do fungo.

5.10 Análise do perfil de recrutamento celular por citometria de fluxo nos lavados bronco-alveolares (LBA) dos animais coinfectados com *P. aeruginosa* e *C. gattii*. Análise de sobrevivência dos animais tratados com inibidor de iNOS.

A análise do LBA é muito utilizada e eficiente para a avaliação das populações e subpopulações celulares presentes nos pulmões. Assim, os LBA dos animais coinfectados e eutanasiados 10d após inoculação com Cg foram analisados por citometria de fluxo, com o objetivo de conhecer o perfil de macrófagos e neutrófilos recrutados durante a coinfeção.

A figura 28 A ilustra os números absolutos de macrófagos, indicando um maior influxo dessas células no grupo Pa3d (condição em que o fungo foi inoculado). A figura 28 B apresenta os valores da intensidade de fluorescência (MFI - *Median Fluorescence Intensity*) para CD11b em macrófagos, demonstrando que há maior expressão dessa molécula nos macrófagos recrutados para os pulmões de animais do grupo Pa3d, indicando um estado de ativação acentuado dessa população celular neste grupo. Já em 28 C e D, é possível observar o percentual e o MFI da subpopulação de macrófagos MHCII+, mostrando que não houve diferença dessas populações nos grupos Pa+Cg10d e Cg10d. Entretanto, o grupo Pa3d, apresentou maior influxo dessa população de macrófagos ativados, tanto em relação ao grupo NI, quanto aos grupos Pa+Cg10d e Cg10d. De forma muito interessante, as figuras 28 E e F mostram a população de macrófagos que apresentaram marcação para a enzima iNOS (óxido nítrico sintase em sua isoforma induzível). A expressão da isoforma induzível desta enzima (iNOS), é capaz de produzir alta concentração de NO (óxido nítrico). Esta enzima, iNOS, está envolvida em vários processos, principalmente na resposta inflamatória, sendo a produção de NO um importante mecanismo de defesa contra inúmeros patógenos (VASCONCELOS et al., 2007). Dessa forma, foi possível observar um importante aumento de macrófagos iNOS+ (28 E e F) no grupo Pa3d.

Com relação aos neutrófilos, foi observado maior influxo de neutrófilos em todos os grupos quando comparados ao grupo NI (28 G). Esse maior influxo de neutrófilos foi caracterizado com uma subpopulação ativada, por meio da detecção de neutrófilos MHCII+, principalmente nos grupos Pa3d e Pa+Cg10d

(figuras 28 H e I). E com relação a neutrófilos com iNOS+, a figura 28 J mostra o percentual de neutrófilos iNOS+, que se encontra maior nos grupos Pa3d e Pa+Cg10d, quando comparados com Cg10d. Os valores de MFI para iNOS+ (28 K) confirmaram os valores significativamente mais elevados nos grupos Pa3d e no grupo coinfestado, quando comparado com o grupo Cg10d.

A análise por citometria confirmou o diferente perfil de células observados na citologia do LBA e sugeriu que macrófagos e, principalmente, neutrófilos que apresentaram iNOS+ estariam envolvidos de forma muito relevante no atraso da letalidade observado no grupo coinfestado (Pa+Cg). Para confirmar essa hipótese, foi realizado uma nova curva de sobrevida para avaliar o efeito de um tratamento com inibidor da enzima iNOS nesse grupo coinfestado. Para isso foi adicionado na água dos animais o fármaco Aminoguanidina (Sigma-Aldrich), na concentração de 1mg/mL, por 20 dias. Os grupos Cg e Pa+Cg não tratados (NT), apresentaram uma média de sobrevida de 22 e 28,5 dias, respectivamente. Sendo Pa+Cg NT com um atraso na letalidade de 6,5 dias em relação ao grupo Cg NT. O grupo Cg tratado com inibidor de iNOS (Cg INIB iNOS) apresentou uma média de sobrevida de 21 dias, sem diferenças significativas em relação ao grupo Cg NT. Entretanto, o grupo Pa+Cg tratado com inibidor de iNOS (Pa+Cg INIB iNOS) apresentou uma média de 13,5 dias de sobrevida, uma diferença de 8,5 dias em relação ao grupo Cg NT, apresentando uma morte precoce em relação aos animais infectados somente com Cg (figura 28 L). Dessa forma, a inibição da enzima iNOS no processo de coinfecção promoveu a reversão (em 60% dos animais) do fenótipo, demonstrando sua importância no processo.

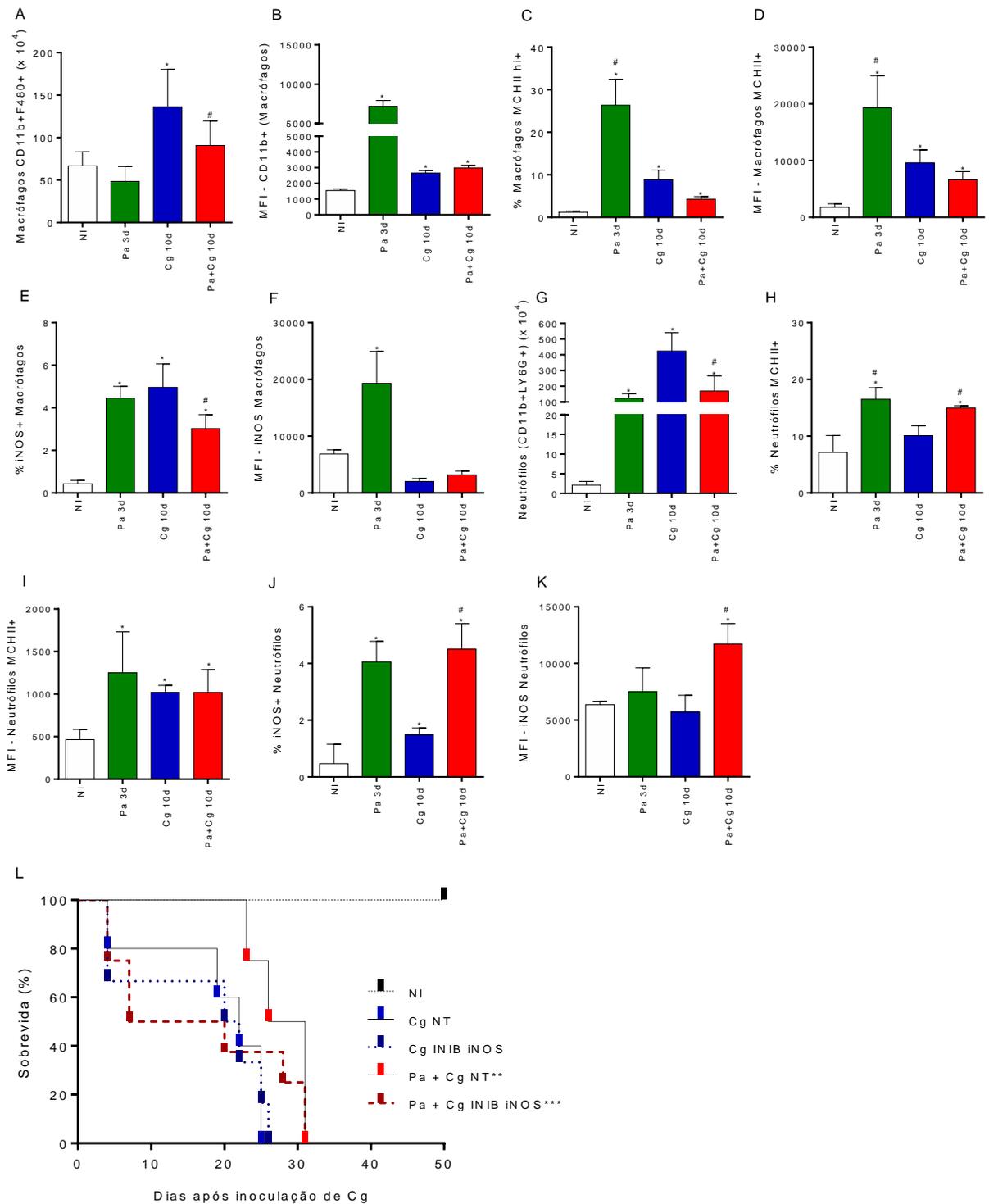


Figura 28: Recrutamento de células nos pulmões dos animais coinfetados com *P. aeruginosa* (Pa) e *C. gattii* (Cg) e curva de sobrevivência dos animais coinfetados e tratados com droga inibidora da enzima óxido nítrico sintase induzível (INIB iNOS).

Citometria de Fluxo: (A) Número de macrófagos totais (CD45 CD11 F4/80+); (B) MFI macrófagos totais (CD11+); (C) e (D) Percentual e MFI de macrófagos ativados (MCHII+), respectivamente; (E) e (F) Percentual e MFI de macrófagos iNOS+, respectivamente; (G) Número de neutrófilos totais (CD11b LY6G+); (H) e (I) Percentual e MFI de neutrófilos ativados (MCHII+), respectivamente; (J) e (K) Percentual e MFI de

neutrófilos iNOS+, respectivamente. ANOVA / Newman-Keuls multiple comparisons test: * diferenças estatísticas quando comparados com o grupo NI; # diferenças estatísticas quando comparados os grupos Cg X Pa+Cg. Pa3d: grupo infectado com *P. aeruginosa* e eutanasiado 3 dias após inoculação da bactéria; Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Pa+Cg: grupo infectado com *P. aeruginosa* 3 dias antes da infecção com *C. gattii*. **Cg e Pa+Cg (1d e 10d)**: eutanásia realizada 1 dia e 10 dias após a inoculação do fungo. MFI (*Median Fluorescence Intensity*).

(L) Curva de sobrevivência de camundongos infectados via intratraqueal com 10^4 células viáveis de Cg e/ou infectados via intranasal com 10^5 células viáveis de Pa 3 dias antes da inoculação de Cg. 24 horas após a inoculação do fungo foi iniciado o tratamento dos animais com a droga Aminoguanidina – Sigma-Aldrich, administrada por via oral, sendo 1mg/mL na água dos animais. *** $p < 0,001$ - diferença estatística em relação aos grupos Cg NT, Pa+Cg NT e Cg INIB iNOS; ** $p < 0,01$ - diferença estatística em relação ao grupo Cg NT, usando Long rank test.

6 Sumário dos Resultados – Pa X Cg

Como sumário podemos destacar que a infecção secundária de Cg em animais previamente infectados com Pa promoveu um atraso na morbidade e letalidade desses animais, devido a uma redução da carga fúngica inicial e atraso na transmigração do fungo para o SNC. Entretanto, esse atraso na letalidade observado nos animais coinfectados foi restrito nos animais infectados com Pa nos tempos de um e três dias antes da inoculação do fungo, tempos que coincidiram com a presença de carga bacteriana recuperada nos pulmões. Além disso, foi necessário a presença da bactéria metabolicamente ativa. A inativação pelo calor não reproduziu os efeitos observados na sobrevivência dos animais. Os ensaios de fagocitose realizados sob diferentes condições, também sugeriram que de fato ocorreu estímulos com a bactéria metabolicamente ativa, produzindo efeitos na fagocitose do fungo, reduzindo o índice fagocítico e aumentando a atividade fungicida dos macrófagos, que pode ser justificada pelos elevados níveis de ROS e PRN também detectados.

As análises do perfil inflamatório mostraram que especialmente os animais coinfectados apresentaram alterações no perfil de macrófagos e neutrófilos ativados, inclusive com maior expressão da enzima iNOS, cuja importância foi confirmada com o tratamento dos animais coinfectados com inibidor de iNOS, revertendo o atraso na progressão da criptococose, e até acelerando o progresso da doença fúngica.

Dessa forma, são propostas duas explicações para os achados deste estudo: a primeira é a possibilidade de uma interação entre os microorganismos Pa e Cg no microambiente pulmonar, em que Pa inibe de forma direta a proliferação de Cg, retardando o desenvolvimento da doença. Esta primeira explicação é sustentada inclusive por trabalhos relacionados à FC, em que frequentemente esses pacientes são colonizados por Pa. Alguns autores acreditam que a presença de Pa nos pulmões, embora seja um fator complicador para a FC, resultando na recorrência de infecções pulmonares crônicas, perda progressiva da função pulmonar e aumento da morbidade e mortalidade, resulta também num fator protetivo contra algumas doenças fúngicas, causadas por *Candida spp.* e *Cryptococcus* (MORADALI; GHODS; REHM, 2017; XU et al., 2017); a segunda explicação, envolvendo as interações entre patógenos e hospedeiro, consiste nos achados relativos a atuação do sistema imune, mostrando que de fato, Cg sendo introduzido num ambiente com uma resposta imune inata já bem estabelecida, como a produzida sob efeito da infecção por Pa, dentro das condições analisadas, foi mais eficientemente contido. E nesse processo, a enzima iNOS mostrou-se como um fator de extrema relevância para a contenção do fungo e atraso na letalidade.

Tópico II: *Cryptococcus gattii* X *Staphylococcus aureus*

7 Resultados e Discussão - SaXCg

7.1 Determinação *in vitro* da atividade de produtos secretados por *S. aureus* contra *Cryptococcus*.

De forma diferente ao que foi observado no ensaio com *P. aeruginosa*, não ocorreu a formação de halos de inibição do crescimento de *Cryptococcus* após cultivo de *S. aureus*, nas condições analisadas, em meio BHI e pela metodologia realizada (figura 29).

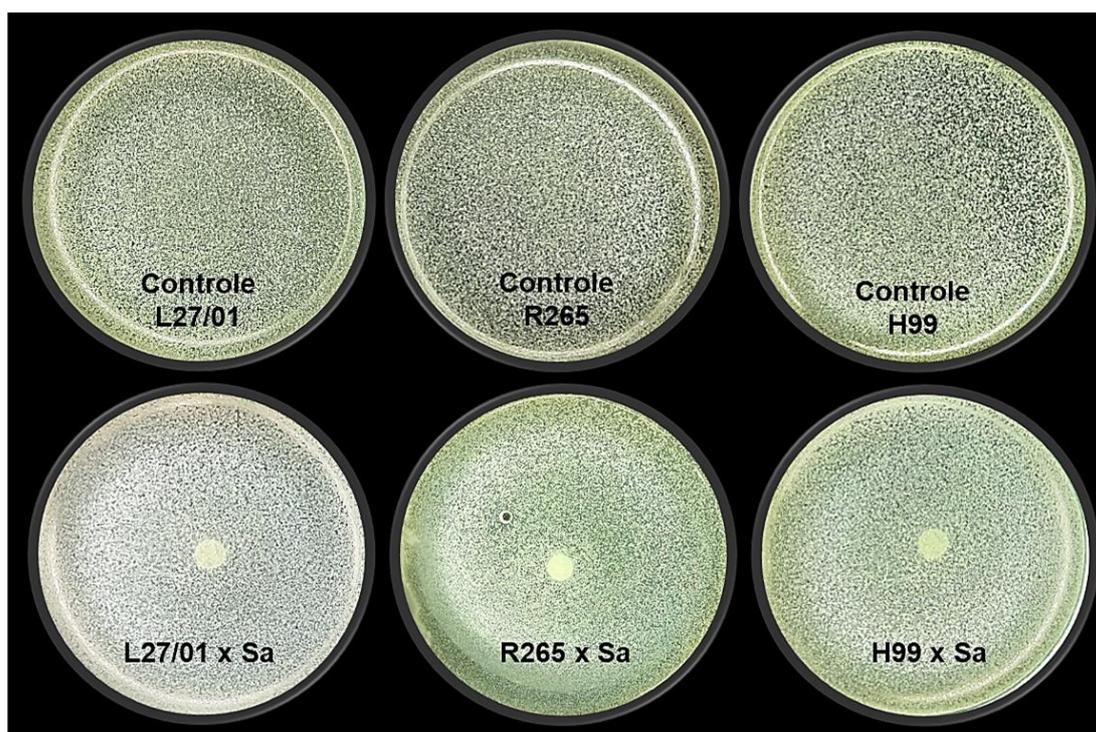


Figura 29: Avaliação da atividade antagonista pela técnica *spot on the lawn* não mostrou inibição do crescimento de *C. neoformans* (H99) e de *C. gattii* (L27/01 e R265) quando cultivados sobre cultura inativa e produtos secretados por *S. aureus* em meio BHI.

Além da técnica *spot on the lawn*, também foi realizado o cultivo de *C. gattii* L27/01 em sobrenadante de cultura de Sa, entretanto também não foi

observado inibição significativa de Cg, quando comparado com o crescimento realizado em meio BHI ou em BHI com salina (figura 30).

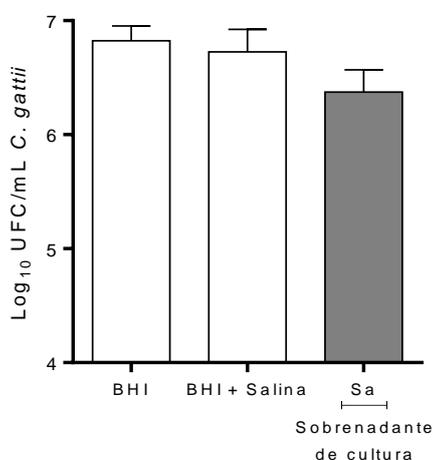


Figura 30: Cultivo de *C. gattii* L27/01 em sobrenadante de cultura de *S. aureus* (ATCC 33591).

Interessante observar que é descrito na literatura que *S. aureus* (Sa) é capaz de estabelecer uma interação antagônica com *C. neoformans*, inibindo o crescimento do fungo por mecanismo dependente do contato célula-célula (FURUYA; IKEDA, 2009; IKEDA et al., 2007). Apesar de Sa ser capaz de secretar grande diversidade de metabólitos e toxinas, os produtos secretados, a partir do cultivo de Sa em meio BHI, não apresentaram atividade inibitória contra Cg.

7.2 Análise de sobrevida dos animais infectados somente com a Sa (ATCC33591)

Para a realização dos ensaios *in vivo*, foi realizado inicialmente uma curva de sobrevida com diferentes inóculos de Sa. A inoculação de 10^9 UFC de *S. aureus* promoveu uma pneumonia aguda e intensa, levando 20% dos camundongos a óbito em menos de 24 horas após inoculação (Figura 31 (A)). Já com os inóculos de 10^7 e 10^5 UFC, os animais ficaram doentes, com sintomas clássicos de pneumonia, apresentando piloereção, hiperventilação, encurvamento de dorso e perda de peso, apresentando melhora nos parâmetros

observados após 3-4 dias de infecção. A perda de peso pode ser evidenciada na figura 31 (B), que mostra uma redução em torno de 10% do peso e recuperação a partir do quarto dia.

Dessa forma, o inóculo de 10^7 UFC foi escolhido para seguimento dos demais experimentos, pois promoveu sinais clínicos mais evidentes nos animais, sem provocar morte. Os animais conseguiram recuperar e tiveram uma sobrevivência compatível com camundongos não infectados.

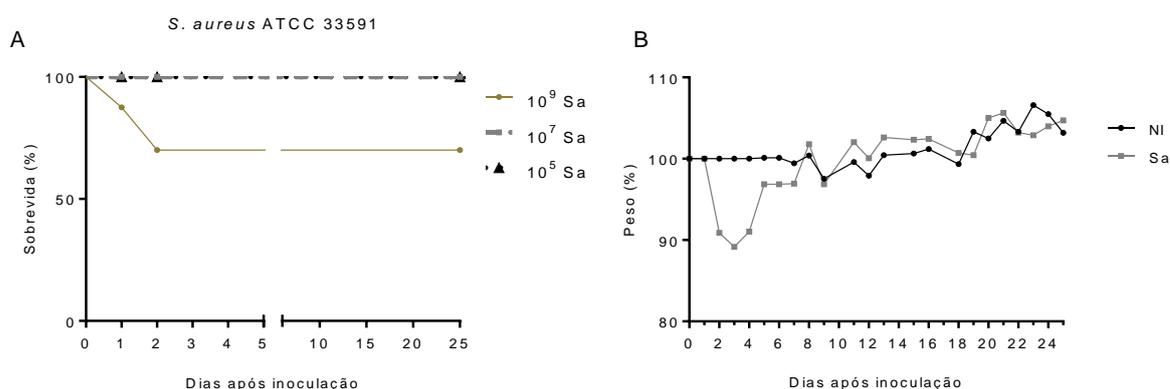


Figura 31: Sobrevida e morbidade de camundongos infectados com inóculos variáveis (10^9 , 10^7 e 10^5) de Sa. (A) Sobrevida de camundongos infectados com inóculos variáveis de Sa. Os animais inoculados com 10^9 foram a óbito dentro das 24 horas após inoculação. O inóculo de 10^7 UFC causou sinais acentuados da doença com melhora a partir de 3-4 dias, evoluindo para total recuperação. (B) Variação de peso de animais infectados com 10^7 UFC de Sa. Animais apresentaram redução em torno de 10% e recuperação a partir de 3-4 dias. NI: Não infectado. Sa: *S. aureus*.

7.3 Cinética de eliminação de *S. aureus* (Sa)

Após análise da sobrevivência e escolha do inóculo inicial, foi realizado um experimento para avaliar a cinética de eliminação da bactéria, com o objetivo de identificar um tempo ideal para realização da coinfeção. Nos experimentos realizados com 1, 4 e 7 DPI, foram recuperadas UFC de Sa nos pulmões, linfonodo drenante de pulmão e LBA (figuras 32 (A), (B) e (C)). Nos pulmões, foram recuperadas UFC de *S. aureus*, em todos os animais de cada grupo, nos tempos 1, 4 e 7 DPI, porém mostrando redução da carga bacteriana nos pulmões com o passar dos dias. Nos linfonodos foram recuperadas UFC em 20% (4 DPI) e 40% (7 DPI) dos animais, enquanto no LBA houve recuperação de UFC em 1 DPI. Em 10 e 15 DPI não houve recuperação de carga bacteriana em nenhum dos órgãos analisados.

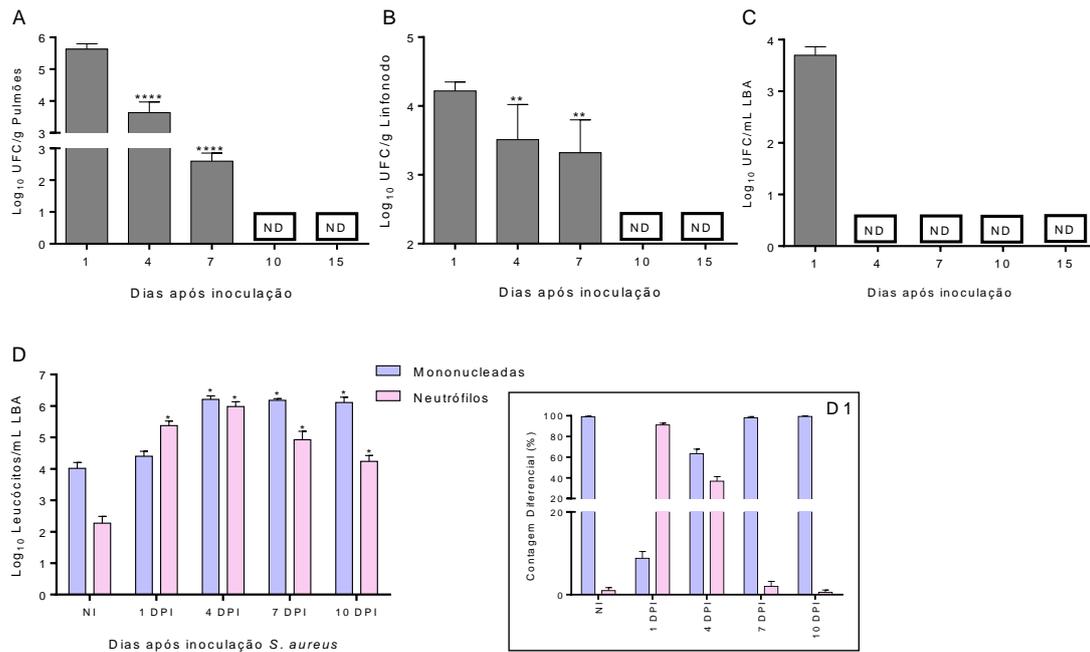


Figura 32: Cinética de eliminação bacteriana em órgãos de camundongos infectados via intranasal com 10^7 UFC de *S. aureus* e sacrificados 1, 4, 7, 10 e 15 DPI. (A) pulmão, (B) linfonodo drenante de pulmão e (C) LBA (lavado bronco alveolar). ANOVA / Tukey's multiple comparisons test: (A) **** $p < 0.0001$ (diferença estatística quando comparados 1DPIx4DPI e 4DPIx10DPI). (B) ** $p < 0.01$ (diferença estatística quando comparados 1DPIx4DPI e 4DPIx10DPI). ND: não detectado. (D) Perfil de recrutamento celular no LBA, em números absolutos, de camundongos infectados com 10^7 células viáveis de *S. aureus* e sacrificados nos dias 1, 4, 7 e 10 DPI; em D1 percentual de células. ANOVA / Newman-Keuls multiple comparisons test: * diferenças estatísticas quando comparados com o grupo NI. DPI: Dias após inoculação.

A análise do perfil de recrutamento celular no LBA, mostrou uma mudança no perfil de células ao longo dos dias analisados. De forma semelhante ao observado nas infecções por *P. aeruginosa*, no primeiro dia após inoculação (1DPI) foi observado uma predominância de neutrófilos. Quarto dia após inoculação, houve um equilíbrio entre neutrófilos e células mononucleadas. Em 7 DPI e 10 DPI houve predominância de células mononucleadas, com muitos linfócitos reativos e macrófagos alveolares esponjosos (figuras 32 D e D1).

O perfil celular no 15 DPI apresentou poucas células com predomínio de células epiteliais, indicando eliminação do processo infeccioso e resolução do processo inflamatório, compatível ao observado nos animais não infectados (dados não mostrados).

7.4 Análise de sobrevivência dos animais coinfetados e análise comportamental (SHIRPA)

Os animais foram infectados com a 10^7 UFC de Sa, 4 dias antes e 4 dias após infecção com 10^4 leveduras viáveis de *C. gattii*, e foram acompanhados diariamente para avaliação da morbidade (SHIRPA) e construção de uma curva de sobrevivência para avaliar a mortalidade.

Os animais infectados somente com a bactéria (Sa) apresentaram uma média de sobrevivência semelhante ao grupo não infectado (NI), apresentando perda de peso imediatamente após inoculação da bactéria, mas com rápida recuperação, em torno de 3 a 4 dias. Os animais infectados somente com *C. gattii* (Cg), tiveram uma média de sobrevivência de 21,5 dias, enquanto o grupo de animais que recebeu a bactéria 4 dias antes (Sa+Cg) apresentou uma média de sobrevivência de 32 dias, sendo 10,5 dias a mais ($p < 0,0001$) que os grupos (Cg) e (Cg+Sa). O grupo de animais que recebeu a bactéria 4 dias após a inoculação do fungo apresentou uma média de sobrevivência de 23 dias, sem diferenças significativas quando comparado ao grupo (Cg) (figura 33(A)). As manifestações iniciais características da criptococose ocorreram acompanhadas com o início da perda de peso, o que pode ser visualizado através do gráfico de variação de peso (figura 33 (B)). Nos grupos Cg e Cg+Sa a perda de peso e os sinais clínicos da doença foram manifestados a partir do 15º dia. O grupo Sa+Cg manifestou esses sinais iniciais da doença a partir do 26º dia.

O aumento da sobrevivência foi acompanhado da redução da morbidade no grupo (Sa+Cg), que mostrou melhoras significativas nos cinco parâmetros avaliados no protocolo SHIRPA, quando comparados com os grupos infectados somente com Cg e com o grupo Cg+Sa (figura 33 C).

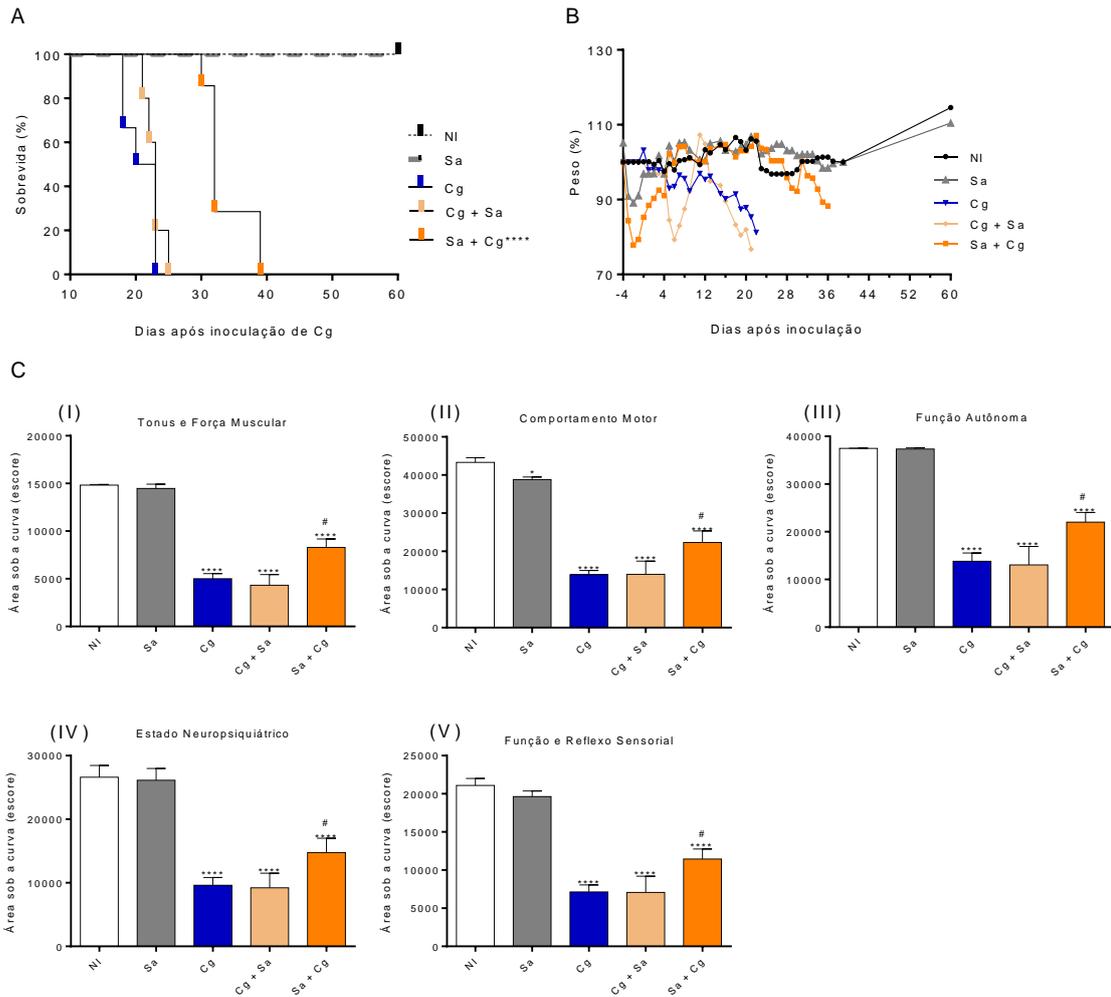


Figura 33: Morbimortalidade de camundongos infectados com Cg ou coinfectados com Sa e avaliação do perfil comportamental (SHIRPA). **(A)** Curva de sobrevivência de camundongos infectados via intratraqueal com 10^4 células viáveis de Cg e/ou infectados via intranasal com 10^5 células viáveis de Sa, 4 dias antes e 4 dias após inoculação de Cg. **** $p < 0,0001$ - diferença estatística em relação ao grupo Cg usando Long rank test. **(B)** Curva de variação de peso dos animais. **(C)** Avaliação do perfil comportamental dos animais realizada através do protocolo SHIRPA, resultados encontrados por análise da área sob a curva das cinco categorias funcionais do escore de gráficos obtidos com o protocolo SHIRPA. (I) Tônus e força muscular; (II) Comportamento motor; (III) Função autônoma; (IV) Estado neuropsiquiátrico; (V) Função e reflexo sensorial. ANOVA / *Tukey's multiple comparisons test*. * $p < 0,05$ e **** $p < 0.0001$ - diferenças estatísticas quando comparado ao grupo NI; # - diferença estatística quando comparado ao grupo Cg. NI: Não infectado. Sa: grupo infectado com *S. aureus*; Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Sa+Cg: grupo infectado com *S. aureus* 4 dias antes da infecção com *C. gattii*; Cg+Sa: grupo infectado com *S. aureus* 4 dias após a infecção com *C. gattii*.

7.5 Mensuração da carga fúngica nos órgãos alvos – pulmões, cérebro e LBA – 1, 3, 10 e 18 dias após inoculação de Cg e análise do perfil de recrutamento celular no LBA.

Foi realizada análise de carga fúngica nos pulmões, cérebros e LBA dos animais coinfectedados, avaliando diferentes períodos da coinfeção. Assim, os grupos de animais foram eutanasiados em diferentes tempos, 1 dia, 3, 10 e 18 dias após inoculação de Cg (grupos Cg1d, Sa+Cg1d; Cg3d, Sa+Cg3d; Cg10d, Sa+Cg10d; Cg18d, Sa+Cg18d); também foi analisado no grupo Cg+Sa (grupo que recebeu Sa 4 dias após a inoculação de Cg e foi eutanasiado no 10d após inoculação de Cg).

Nos grupos Sa+Cg1d e Sa+Cg3d, foi observado significativa redução de carga fúngica nos pulmões e LBA, quando comparados aos grupos Cg1d e Cg3d, respectivamente. Não houve recuperação de UFC de leveduras nos cérebros dos grupos de 1d e 3d (figuras 34 A, B e C).

Após 10 dias de coinfeção, ocorreu também uma redução significativa na carga fúngica recuperada dos pulmões e dos LBA no grupo coinfectedado Sa+Cg10d, quando comparado com os grupos Cg10d e ao grupo Cg+Sa. Com relação a carga fúngica no cérebro, houve recuperação de UFC nos grupos Cg10d e Cg+Sa 10d em 60% dos animais no grupo Cg e 30% no grupo Cg+Sa. No grupo Sa+Cg, além da carga fúngica reduzida nos pulmões, não foram recuperadas UFC do fungo no cérebro (figuras 34 A, B e C).

Nesse período não foram observadas diferenças significativas nas cargas fúngicas recuperadas nos pulmões e LBA dos animais coinfectedados (Sa+Cg18d), quando comparados com o grupo Cg18d (figuras 34 (A) e (C)). Porém, o grupo Sa+Cg18d apresentou carga fúngica no tecido cerebral inferior ao grupo Cg18d (figura 36 (B)), mostrando que, como observado na coinfeção com *P. aeruginosa*, a infecção primária por Sa promoveu uma contenção do fungo, atrasando a transmigração do fungo para o SNC.

A análise de células no LBA mostrou que nos tempos 1d e 3d, o LBA dos grupos Cg1d e Cg3d apresentou aumento de células mononucleadas, quando comparado ao grupo NI, mas com relação aos neutrófilos, não houve diferenças significativas. Os grupos Sa+Cg1d e Sa+Cg3d apresentaram aumento de células

mononucleadas e neutrófilos, e em Sa+Cg3d esse aumento apresentou significância estatística tanto em comparação ao grupo NI, quanto ao grupo Cg 3d (figuras 34 D e D1).

O grupo Sa+Cg10d apresentou um perfil de células diferente ao observado no grupo Cg10d e Cg+Sa10d. Em Sa+Cg10d destaca-se um predomínio de células mononucleadas reativas, enquanto os outros dois grupos apresentaram predomínio de neutrófilos (Figuras 34 D e D1). Em 18d foi observado um influxo de neutrófilos nos grupos Sa+Cg18d e Cg18d, sendo mais relevante em Cg18d, indicando a exarcebação da inflamação, o que resulta em um pior prognóstico para esse grupo.

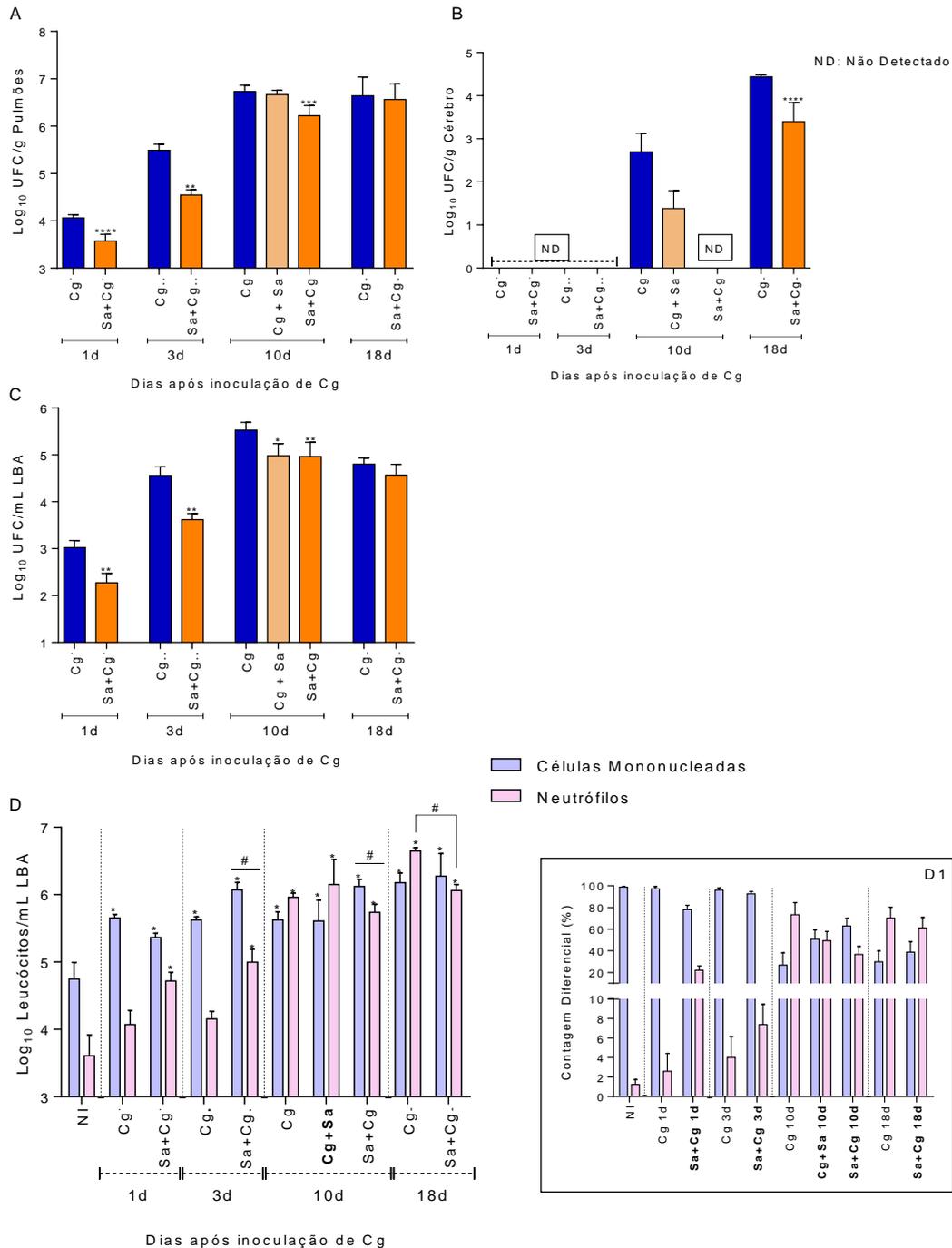


Figura 34: Mensuração da carga fúngica nos órgãos alvos - pulmão, cérebro e LBA - e análise do perfil de células no LBA (lavado bronco alveolar). Os camundongos foram coinfetados, com 10^7 UFC de Sa via intranasal e 10^4 leveduras viáveis de Cg via intratraqueal, e eutanasiados após 1, 3, 10 e 18 dias da inoculação de Cg. Carga fúngica: (A) pulmão, (B) cérebro, (C) LBA - Unpaired t test: os asteriscos representam as diferenças com significância estatística, quando comparados com os respectivos grupos Cg: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (D) Perfil de recrutamento celular no LBA em números absolutos - * $p < 0.001$ - diferenças estatísticas quando comparados com NI; # $p < 0.001$ - diferença estatística quando comparado com Cg. Em (D1) valores percentuais de células no LBA. NI: Não infectado; Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Sa+Cg: grupo infectado com *S. aureus* 4 dias antes da infecção com *C. gattii*; Cg+Sa: grupo infectado com *S. aureus* 4 dias após a infecção com *C. gattii*.

A infecção secundária de *C. gattii*, seguida da infecção aguda por *S. aureus*, mostrou, de forma semelhante à coinfeção com *P. aeruginosa*, uma expressiva redução de morbimortalidade e redução de carga fúngica nos pulmões, LBA e cérebros. O mesmo perfil foi observado pela análise histopatológica dos pulmões, em que foram avaliados o processo inflamatório e a presença do fungo no tecido pulmonar no tempo de 10 dias após inoculação do fungo.

Os exames histopatológicos dos pulmões demonstraram um infiltrado inflamatório difuso e acentuado nos animais infectados somente com Sa (escore 5). Este grupo infectado somente com a bactéria (Sa) foi eutanasiado no quarto dia após inoculação da bactéria e representa a condição do tecido pulmonar no dia 0, condição em que o fungo foi inoculado no grupo coinfectado Sa+Cg. Os demais grupos foram eutanasiados no décimo dia após inoculação de Cg.

No grupo infectado com Cg foi possível observar numerosas leveduras de *C. gattii* nos alvéolos e nas ramificações broncoalveolares (escore 3), além de infiltrado inflamatório multifocal (escore 3). O grupo Cg+Sa apresentou presença de numerosas leveduras (escore 3), semelhante ao grupo Cg, e infiltrado inflamatório difuso e acentuado (escore 5). O grupo Sa+Cg apresentou redução em todos os parâmetros analisados, quando comparado ao grupo Cg, com moderada quantidade de leveduras (escore 2) e infiltrado inflamatório focalmente extenso (escore 2) (Figura 35).

A histopatologia do cérebro também foi realizada para o mesmo tempo de infecção, porém nenhuma alteração histopatológica foi identificada nos grupos avaliados (dados não mostrados).

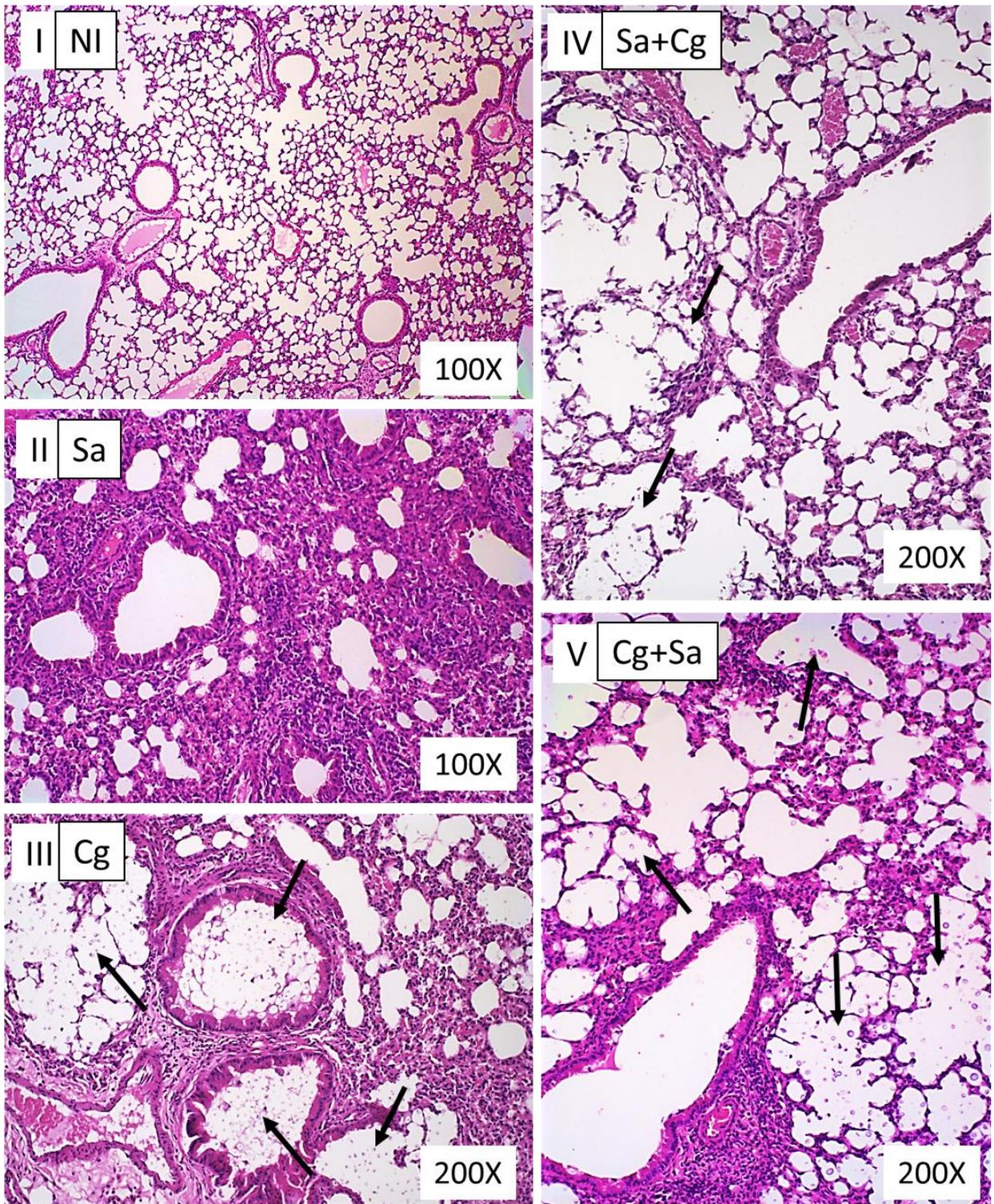


Figura 35: Análise histopatológica dos pulmões de camundongos coinfetados, com 10^7 UFC de Sa via intranasal e 10^4 leveduras viáveis de Cg via intratraqueal. Os animais foram eutanasiados após dez dias de inoculação de *C. gattii* e os pulmões recuperados, apenas grupo Sa (I) foi eutanasiado 4 dias após inoculação da bactéria. As seções histológicas dos pulmões foram coradas com HE e visualizadas a uma amplificação de 100 e 200 X, foram avaliados pelo menos 10 campos por lâmina. A seta em Cg (III) indica a presença de leveduras dentro dos alvéolos, visualizadas como estruturas esféricas ou ovaladas, formando conglomerados, que induzem deformação anatômica dos alvéolos (escore 3). Essas leveduras também podem ser observadas, nos grupos

Cg+Sa (V) (escore 3) e em menor quantidade em Sa+Cg (IV) (escore 2). A presença de infiltrado inflamatório (perivascular, peribronquial, alveolar, intersticial, hemorragia e necrose) pode ser observada nos grupos Sa (escore 5), Cg (escore 3), Cg+Sa (escore 5) e Sa+Cg (escore 2). (I) NI apresentou escore 0 para inflamação e ausência de fungo. NI: não infectado; (II) Sa: grupo infectado somente com *S. aureus* e eutanasiado 4 dias após inoculação de Sa; (III) Cg: grupo infectado com *C. gattii*; (IV) Sa+Cg: grupo infectado com *S. aureus* 4 dias antes da infecção com *C. gattii*; (V) Cg+Sa: grupo infectado com *S. aureus* 4 dias após a infecção com *C. gattii*. Escores inflamação: 0=Ausente; 1=F (Focal); 2=FE (Focalmente Extenso); 3=M (Multifocal); 4=MC (Multifocal a Coalescente); 5=D (Difuso). Escores leveduras fúngicas: 0=Ausente; 1=Discreto; 2=Moderado; 3=Acentuado.

7.6 Análise de sobrevivência dos animais coinfetados com Sa inativada pelo calor (HK: *Heat Killed*) e com Sa em diferentes dias antes da infecção com *C. gattii*

Os animais foram infectados com 10^7 UFC de Sa HK (células inviáveis) 4 dias antes e 4 dias após infecção com 10^4 leveduras viáveis de *C. gattii* (grupos SaHK+Cg e Cg+SaHK respectivamente), e foram acompanhados diariamente, para a construção de uma curva de sobrevivência e avaliação da mortalidade (figura 36 A). Outra forma de análise realizada foi a coinfeção com SaHK e Cg, mas com Cg sendo inoculado 5 horas após a inoculação de SaHK, também nas mesmas concentrações de inóculos (figura 36 B).

De forma semelhante ao observado na coinfeção com *P. aeruginosa*, os grupos coinfetados com a bactéria inativada pelo calor não apresentaram diferenças significativas em relação ao tempo de sobrevivência comparativamente ao grupo infectado somente com o fungo.

Entretanto, o atraso na letalidade, a redução da morbidade e a redução da carga fúngica em órgãos alvos detectados nos animais do grupo Sa+Cg mostraram que a inoculação de Sa quatro dias antes da chegada de Cg nos pulmões também atuou com um fator protetivo, retardando a progressão da criptococose, o que despertou o interesse para analisar um intervalo de dias em que a presença ou os efeitos de Sa nos pulmões poderiam de forma semelhante retardar o desenvolvimento da doença fúngica. Assim, os animais foram coinfetados com Sa nos dias -1, -4, -7, -15, -30 e -80 dias antes da infecção (DAI) por Cg (figura 36 C). Os grupos Sa+Cg -1d, -4d e -7d apresentaram média de sobrevivência significativamente maior que o grupo Cg (37, 33, 34 e 23 dias,

respectivamente), o que representa mais de 10 dias no atraso da letalidade dos animais coinfectedados. Já os animais coinfectedados -15, -30 e -80 DAI não apresentaram alteração significativa na sobrevivida comparativamente ao grupo Cg (figura 36C).

Assim, por meio dessas análises de sobrevividas, foi possível observar que a presença da bactéria nos pulmões (detectadas nos dias 1, 4 e 7 DPI – figura 34 A) foram de extrema importância para a promoção do atraso na letalidade. Além disso, para que esse efeito ocorresse, foram importantes a presença de Sa e a viabilidade das células bacterianas. Outro fator relevante, foi o processo inflamatório presente no microambiente pulmonar do hospedeiro, como visto na análise histopatológica, grupo Sa 4DPI com intenso infiltrado inflamatório (figura 35 (II)) e no LBA, com um aumento expressivo de células mononucleadas reativas e neutrófilos (figuras 32 D e D1).

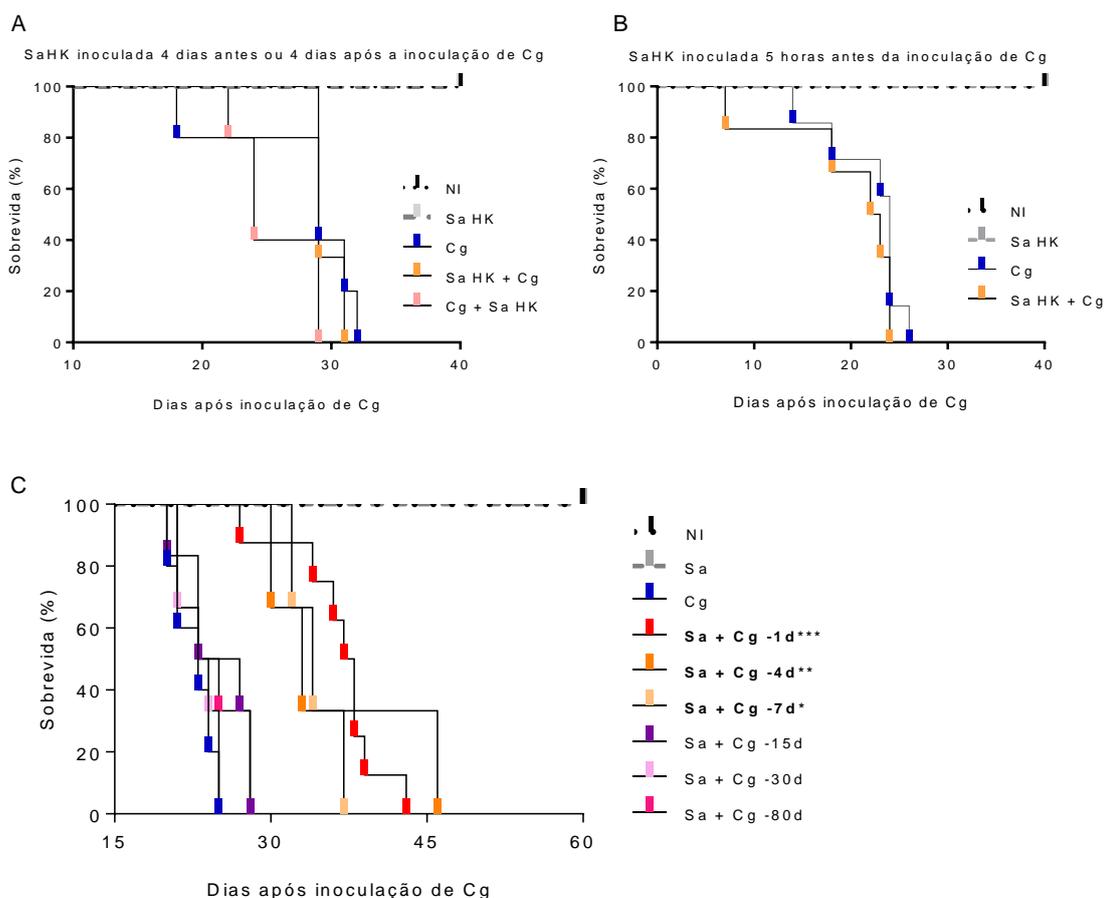


Figura 36: Curvas de Sobrevidas SaxCg.

(A) Curva de sobrevida de camundongos infectados via intratraqueal com 10^4 células viáveis de Cg ou coinfectados via intranasal com 10^7 células inviáveis de Sa (inativadas pelo calor – *Heat killed* (HK)). SaHK: grupo infectado com *S. aureus* HK. Cg: grupo infectado com *C. gattii*; SaHK+Cg: grupo infectado com *S. aureus* HK 4 dias antes da infecção com *C. gattii*; Cg+SaHK: grupo infectado com *S. aureus* HK 4 dias após a infecção com *C. gattii*.

(B) Curva de sobrevida de camundongos infectados via intratraqueal com 10^4 células viáveis de Cg ou coinfectados via intranasal com 10^7 células inviáveis de Sa (inativadas pelo calor – *Heat killed* (HK)). SaHK: grupo infectado com *S. aureus* HK. Cg: grupo infectado com *C. gattii*; SaHK+Cg: grupo infectado com *S. aureus* HK 5 horas antes da infecção com *C. gattii*.

(C) Curva de sobrevida de camundongos infectados via intratraqueal com 10^4 células viáveis de Cg ou coinfectados via intranasal com 10^7 células viáveis de Sa -1, -3, -7, -15, -30 e -80 dias antes de Cg. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ - diferença estatística em relação ao grupo Cg usando Long rank test. NI: Não infectado; Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Sa+Cg -1d: grupo infectado com *S. aureus* 1 dia antes da infecção com *C. gattii*; Sa+Cg -4d: grupo infectado com *S. aureus* 4 dias antes da infecção com *C. gattii*; Sa+Cg -7d: grupo infectado com *S. aureus* 7 dias antes da infecção com *C. gattii*. Sa+Cg -15d: grupo infectado com *S. aureus* 15 dias antes da infecção com *C. gattii*; Sa+Cg -30d: grupo infectado com *S. aureus* 30 dias antes da infecção com *C. gattii*; Sa+Cg -80d: grupo infectado com *S. aureus* 80 dias antes da infecção com *C. gattii*.

7.7 Determinação *in vitro* da influência de *S. aureus* (ATCC-33591) na fagocitose de *C. gattii* (L27/01) por macrófagos derivados de medula óssea - Ensaios de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação do estresse oxidativo (ROS, PRN)

A análise do índice fagocítico mostrou uma fagocitose significativamente menor no grupo Sa+Cg, em relação ao grupo Cg, no tempo de 6 horas. Entretanto, com relação a atividade fungicida dos macrófagos (IPR), não foi observada diferença significativa na recuperação de leveduras fagocitadas no grupo Sa+Cg, quando comparado ao grupo Cg, sugerindo que nas condições analisadas, a presença de Sa reduziu a internalização de Cg pelos macrófagos, mas não interferiu na sua atividade fungicida (figuras 37 A e B).

As análises de ROS e PRN indicaram aumento na produção de ambas as espécies reativas nos grupos Cg e Sa+Cg, em relação ao grupo controle, somente macrófagos (M0). Com relação ao grupo Sa, houve aumento somente em ROS (figuras 37 C e D).

A realização do ensaio de fagocitose com a presença da bactéria inativada pelo calor (grupo SaHK+Cg) mostrou, de forma semelhante, uma redução no índice fagocítico de *C. gattii*, após 24 horas de incubação, quando comparado ao grupo Cg (figura 37 F). Entretanto, a atividade fungicida dos macrófagos no grupo SaHK+Cg se mostrou reduzida em relação ao grupo Cg (figura 37 G). Com relação a ROS e PRN, foram observados aumento dessas espécies reativas nos grupos SaHK, Cg e SaHK+Cg, porém apenas em relação ao grupo controle M0, em relação ao grupo Cg, não ocorreram alterações significativas, mesmo tendo sido considerado um tempo de incubação de 24 horas após infecção (figura 37 H e I).

Também foi realizado um co-cultivo nas mesmas condições estabelecidas no ensaio de fagocitose, para avaliar a possibilidade de uma interação direta entre os dois microorganismos. Entretanto, nos tempos de 3 e 6 horas, não foi observado inibição do crescimento fúngico pela bactéria, mostrando crescimento de ambos nos tempos de 3 e 6 horas (figura 37 E).

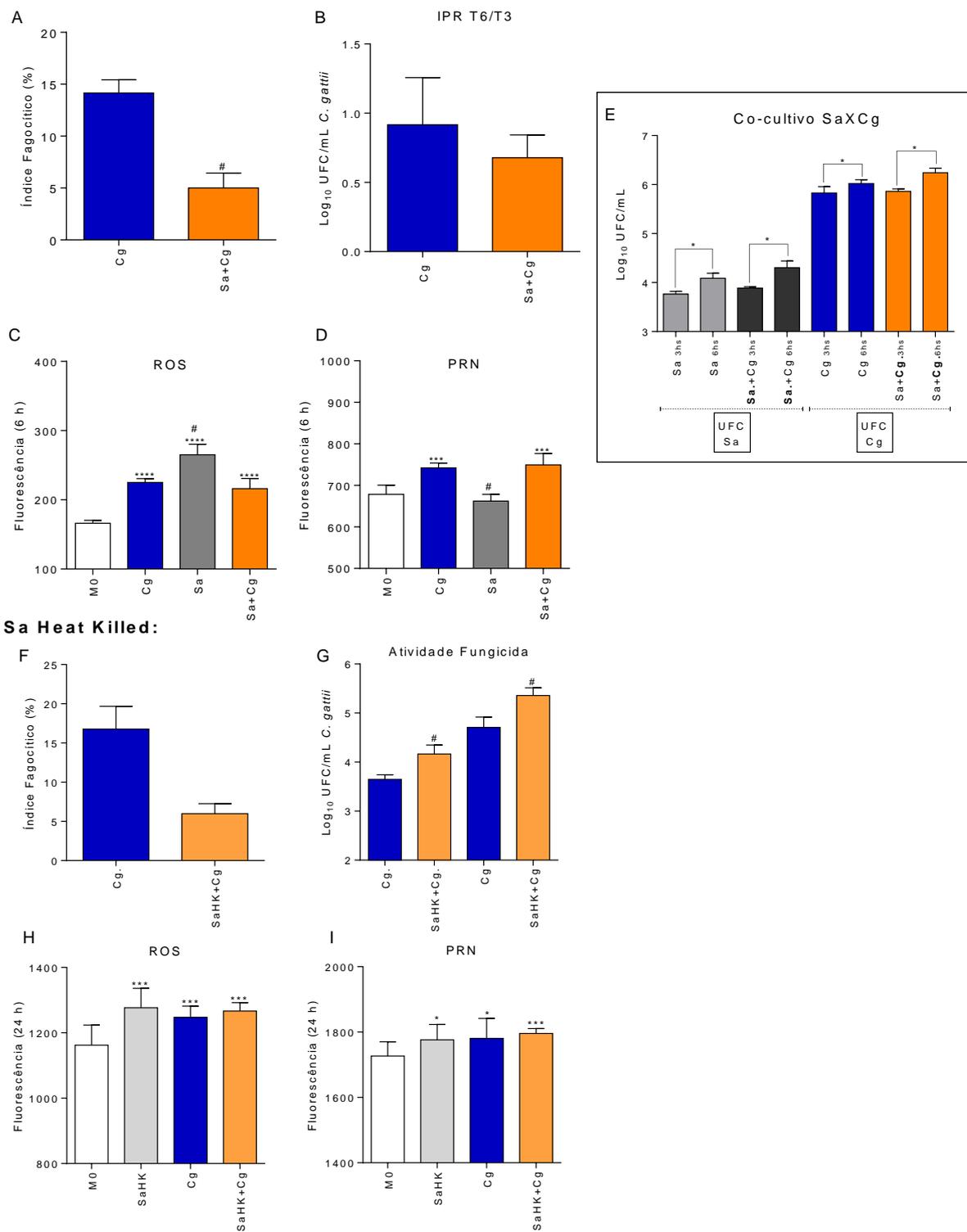


Figura 37: Ensaio de fagocitose *in vitro*, proliferação intracelular (IPR) e produção de espécies reativas (ROS e PRN) – realizados na presença de *S. aureus* (Sa e Sa+Cg) e realizados com *S. aureus* (Sa) inativada pelo calor (*heat killed* – HK) - SaHK. (A) Índice fagocítico percentual após 3h e 6h de incubação com *C. gattii*. (B) Relação da proliferação intracelular (IPR) *in vitro* de *C. gattii* internalizados entre os tempos de 6 e

3 horas. **(C)** e **(D)** Produção de espécies reativas de oxigênio - ROS (C) e nitrogênio – peroxinitrito - PRN (D) após 6h de infecção por *C. gattii*. **(F)** Índice fagocítico percentual após 3h e 24h de incubação com *C. gattii* (Cg). **(G)** Atividade fungicida dos macrófagos após incubação de 3 e 24 horas com PaHK e/ou Cg. **(H)** e **(I)** Produção de espécies reativas de oxigênio - ROS (H) e nitrogênio - PRN (I) após 24h de infecção por PaHK e/ou Cg. Foram formados grupos de macrófagos BMDMs infectados somente com *C. gattii* (grupo Cg); infectados com *C. gattii* após infecção prévia com Sa (grupo Sa+Cg) e infectados somente com Sa (grupo Sa); infectados com *C. gattii* após infecção prévia com SaHK (grupo SaHK+Cg), infectados somente com SaHK (grupo SaHK) grupo controle somente macrófagos BMDMs (grupo M0). *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 e ****p<0.0001 diferenças estatísticas em relação ao grupo M0 e # diferença estatística quando comparado ao grupo Cg. **(E)** Co-cultivo realizado entre Sa X Cg – perfil de crescimento de Sa e Cg quando co-cultivados nos tempos de 3 e 6 horas. *p<0.05 quando comparados os crescimentos de Sa ou Cg entre 3 e 6 horas.

A fagocitose por macrófagos e neutrófilos é o principal mecanismo pelo qual a infecção por *S. aureus* é controlada pelo hospedeiro. Entretanto, a literatura vem mostrando que essas células constituem um importante reservatório para essa bactéria, garantindo a sobrevivência, a disseminação e inclusive conferindo resistência aos antibióticos. Dessa forma, essas bactérias podem também induzir mecanismos citoprotetores, alterando a expressão gênica dos macrófagos e alterando o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, de forma semelhante a alguns parasitas intracelulares obrigatórias. Os mecanismo fagocíticos estabelecidos durante a infecção por *S. aureus*, ainda não estão bem esclarecidos (GREENLEE-WACKER et al., 2014; KOZIEL et al., 2009; ROWE et al., 2020).

Os ensaios de fagocitose, nas condições realizadas, não contribuíram para elucidar os efeitos observados na progressão da criptococose como infecção secundária a Sa, uma vez que não foram observados aumento na atividade fungicida dos macrófagos. Entretanto, esses ensaios deverão ser realizados sob outra perspectiva, como por exemplo na presença de opsoninas ou em tempos de incubação mais prolongados.

7.8 Análise NAG, MPO nos pulmões dos animais coinfectados.

A dosagem de NAG no tecido pulmonar mostrou um aumento significativo no influxo de macrófagos no grupo coinfectado, quando comparado ao grupo Cg, especialmente nos tempos de 1 e 3 dias após a inoculação de Cg (figura 38 A). Com relação ao influxo de neutrófilos (figura 38 B), a dosagem de MPO mostrou-se aumentada para Cg e Pa+Cg em todos os tempos de infecção analisados, destacando um influxo maior no décimo dia. Essas análises corroboraram com o perfil celular observado no LBA.

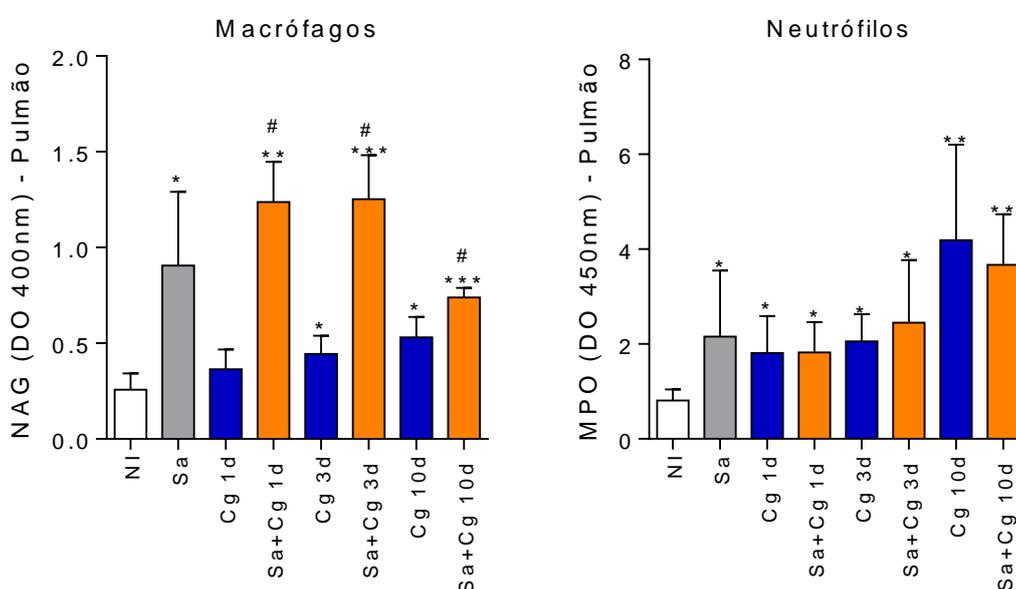


Figura 38: Análise de NAG e MPO no tecido pulmonar: número relativo de macrófagos (A) e neutrófilos (B) foram determinados indiretamente pela quantificação da atividade das enzimas NAG e MPO, respectivamente. ANOVA/Newman-Keuls multiple comparisons test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$: diferenças estatísticas quando comparados com o grupo NI; # diferenças estatísticas quando comparados os grupos Cg X Sa+Cg. Sa: grupo infectado com *S. aureus* e eutanasiado 3 dias após inoculação da bactéria; Cg: grupo infectado com *C. gattii*; Sa+Cg: grupo infectado com *S. aureus* 3 dias antes da infecção com *C. gattii*. Cg e Sa+Cg (1d, 3d e 10d): eutanásia realizada 1 dia, 3 dias e 10 dias após a inoculação do fungo.

Ainda estão sendo realizadas análises dos mediadores inflamatórios, com o objetivo de compreender os efeitos observados durante a infecção por Cg seguida de Sa, com perspectivas de esclarecer os mecanismos responsáveis pelo atraso na letalidade, contituindo um fator protetivo.

8 Sumário dos Resultados – Sa X Cg

De forma semelhante aos resultados obtidos com *P. aeruginosa* (Pa), a infecção secundária de Cg em animais previamente infectados com Sa promoveu um atraso na morbidade e letalidade desses animais, ainda mais significativo que o observado com Pa. Os animais coinfetados com Sa+Cg apresentaram uma média de sobrevida duas vezes maior que na coinfeção com Pa+Cg. O que também foi associado a uma redução da carga fúngica e atraso na transmigração do fungo para o SNC.

O atraso na letalidade observado foi restrito nos animais infectados com Sa nos tempos de um, quatro e sete dias antes da inoculação do fungo, tempos que coincidiram com a presença de carga bacteriana recuperada nos pulmões. Também foi necessário a presença da bactéria metabolicamente ativa. A inativação pelo calor não reproduziu os efeitos observados na sobrevida dos animais. Nos ensaios de fagocitose, nas condições realizadas, não foram observados aumento da atividade fungicida dos macrófagos na presença da bactéria metabolicamente ativa ou inativada pelo calor, nem detecção dos níveis de ROS e PRN diferentes dos encontrados no grupo Cg.

Entretanto, o perfil de recrutamento celular encontrado no LBA, que foi confirmado pela dosagem de NAG e MPO no tecido pulmonar, mostrou uma alteração no recrutamento de celular, com predomínio de células mononucleadas reativas no grupo coinfetado, sugerindo que, de fato, Cg sendo introduzido num ambiente com uma resposta imune inata já bem estabelecida, foi mais eficientemente contido. As análises dos mediadores inflamatórios e perfil de células envolvidos nessa resposta estão em andamento.

9 CONCLUSÕES

- A infecção secundária por Cg em animais previamente infectados com a bactéria Pa ou com Sa provocou um atraso na morbidade e na letalidade desses animais, devido a uma redução da carga fúngica e atraso na transmigração do fungo para o SNC.
- Pa é capaz de reduzir a morbidade e letalidade da criptococose por um mecanismo que envolve alteração do perfil de recrutamento de macrófagos e neutrófilos e produção de espécies reativas de nitrogênio, além de estabelecer relações antagônicas com Cg no microambiente pulmonar, conferindo à infecção prévia por Pa como um fator de contenção de Cg, retardando o desenvolvimento da criptococose por um mecanismo dependente de iNOS.
- A coinfeção de Cg com Sa também reduziu morbidade e letalidade da criptococose, porém os mecanismos ainda estão sendo investigados. O grupo coinfectado também apresentou alteração do perfil de recrutamento de macrófagos e neutrófilos e os mediadores inflamatórios estão sendo investigados.
- Este estudo é pioneiro em demonstrar um modelo experimental *in vivo* de coinfeção entre as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* e o fungo *C. gattii* e, certamente, contribuiu ampliando a compreensão da patogênese da criptococose, além de fornecer novos modelos experimentais. Tem a perspectiva de incentivar novas pesquisas que venham ampliar a compreensão das interações estabelecidas entre os diferentes reinos, e, como consequência, contribuir na descoberta de novos alvos para a ação de drogas ou “desarme” dos patógenos.

BIBLIOGRAFIA

- ABDUL-HUSSEIN, Z.; ATIA, S. Antimicrobial Effect of Pyocyanin Extracted from *Pseudomonas aeruginosa*. **iMedPub Journals**, v. 6, n. 6:3, p. 4–7, 2016.
- ALHAZMI, A. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. **International Journal of Biology**, v. 7, n. 2, p. 44–67, 2015.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173–1185, 2015.
- ASHKAR, A. A.; ROSENTHAL, K. L. Toll-like Receptor 9, CpG DNA and Innate Immunity. **Current Molecular Medicine**, v. 2, p. 545–556, 2002.
- BAKALETZ, L. O. Developing Animal Models for Polymicrobial Diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. July, p. 552–568, 2004.
- BALLOK, A. E.; O'TOOLE, G. A. **Pouring salt on a wound: *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors alter Na⁺ and Cl⁻ flux in the lung** **Journal of Bacteriology ASM**, 2013.
- BARDOEL, B. W. et al. *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 8, 2011.
- BEKEREDJIAN-DING, I.; STEIN, C.; UEBELE, J. The Innate Immune Response Against *Staphylococcus aureus*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 2015.
- BELLINGHAUSEN, C. et al. Viral-bacterial interactions in the respiratory tract. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 12, p. 3089–3102, 2016.
- BENIE, C. K. D. et al. Characterization of virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine meat, fresh fish, and smoked fish. **European Journal of Microbiology and Immunology**, 2017.
- BERUBE, B. J.; WARDENBURG, J. B. *Staphylococcus aureus* α -toxin: Nearly a century of intrigue. **Toxins**, v. 5, p. 1140–1166, 2013.
- BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS**

Yeast Research, v. 16, n. fov106, p. 1–12, 2016.

BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. **Journal of Pathogens**, 2011.

BLEVES, S. et al. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 534–543, 2010.

BORA, L. Anticandidal activity of medicinal plants and *Pseudomonas aeruginosa* strains of clinical specimens. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, p. 276–280, 2016.

BOSCH, A. A. T. M. et al. Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 1, 2013.

BREALEY, J. C. et al. Viral bacterial co-infection of the respiratory tract during early childhood. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 10, p. 1–11, 2015.

CAO, H. et al. Comparative genome and transcriptome analysis reveals distinctive surface characteristics and unique physiological potentials of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–17, 2017.

CHATTERJEE, M. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, p. 48–58, 2016.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: A resurgent fungal pathogen. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 564–570, 2011.

CHEMANI, C. et al. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 2065–2075, 2009.

CHEN, L. et al. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological Research**, v. 172, p. 19–25, 2015.

CHEN, L. et al. Type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with biofilm formation but not environmental adaptation. **MicrobiologyOpen**, v. 9, n. 3, p. 1–10, 2020.

CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, C. *Cryptococcus gattii* Infections. v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.

CHENG, A. G. et al. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, 2010.

CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence : a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 9, p. 541–548, 2007.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. **The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans***. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 87

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* : An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica / Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, n. ID 675213, p. 1–23, 2013.

CORDERO, R. J. B. et al. Enhanced virulence of *Histoplasma capsulatum* through transfer and surface incorporation of glycans from *Cryptococcus neoformans* during co-infection. **Scientific Reports / Nature Publishing Group**, v. 6, n. 21765, p. 1–16, 2016.

CORNELIS, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1637–1645, 2010.

CROSS, A. S. et al. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 6, p. 4112–4120, 2003.

CROUSILLES, A. et al. Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? **Future Microbiology**, 2015.

CRUMP, J. A. et al. Invasive Bacterial and Fungal Infections Among Hospitalized HIV-Infected and HIV-Uninfected Adults and Adolescents in Northern Tanzania. **Clinical Infections Diseases**, v. 52, p. 341–348, 2011.

DHAMGAYE, S.; MURRAY, G. L.; PELEG, A. Y. The influence of bacterial interaction on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 6, n. 7, p. 677–678, 2015.

DOBLER, L. et al. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing estA in a simple medium. **PLoS ONE**, 2017.

DRISCOLL, J. A.; BRODY, S. L.; KOLLEF, M. H. **The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections** **Drugs**, 2007.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931–940, 2012.

EL SOLH, A. A.; ALHAJHUSAIN, A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 229–238, 2009.

ENGELTHALER, D. M. et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest : Whole- Population Genome Analysis Provides Insights into Species Evolution and Dispersal. **mBIO.asm.org**, v. 5, n. 4, p. 1–18, 2014.

ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: A dangerous trip from the environment to the brain. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1–15, 2018.

EVANGELISTA, S. S. .; OLIVEIRA, A. C. *Staphylococcus aureus* metilicilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem REBEN**, v. 68, n. 1, p. 136–143, 2015.

FAVARO, M. et al. A multi-target real-time PCR assay for rapid identification of meningitis-associated microorganisms. **Molecular Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 74–79, 2013.

FERRARI, C. K. B. et al. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: From effective defense to immunity evasion mechanisms. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 59, n. 6, p. 441–448, 2011.

FILLOUX, A. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An essay on diversity, evolution, and function. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. JULY,

p. 1–21, 2011.

FIRACATIVE, C. et al. The status of cryptococcosis in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1–23, 2018.

FOURNIER, B.; PHILPOTT, D. J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 18, n. 3, p. 521–540, 2005.

FRANCO-PAREDES, C. et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 348–355, 2015.

FURUYA, H.; IKEDA, R. Interaction of triosephosphate isomerase from the cell surface of *Staphylococcus aureus* and α -(1-3)-mannooligosaccharides derived from glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 155, n. 8, p. 2707–2713, 2009.

GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: Phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 147–161, 2012.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, 2013.

GIARDINA, P. et al. Laccases: A never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 369–385, 2010.

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

GREENLEE-WACKER, M. C. et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by Human Neutrophils Prevents Macrophage Efferocytosis and Induces Programmed Necrosis. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 10, p. 4709–4717, 2014.

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

HALDER, P. K.; ROY, C.; DATTA, S. Structural and functional characterization of type three secretion system ATPase PscN and its regulator PscL from *Pseudomonas aeruginosa*. **Wiley Proteins**, v. 87, p. 276–288, 2019.

HALL, S. et al. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Toxins**, v. 8, n. 236, p. 1–14, 2016.

HARRIS, L. J. et al. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 6, p. 384–387, 1989.

HAUSER, A. R. **The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by injection** **Nature Reviews Microbiology**, 2009.

HAUSER, A. R. *Pseudomonas aeruginosa*: So Many Virulence Factors, So Little Time. **Crit. Care Med.**, v. 39, n. 9, p. 2193–2194, 2011.

HOOD, R. D. et al. A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. **Cell Host and Microbe**, 2010.

HUSEBY, M. et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8719–8726, 2007.

IKEDA, R. et al. Contribution of the mannan backbone of cryptococcal glucuronoxylomannan and a glycolytic enzyme of *Staphylococcus aureus* to contact-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4815–4826, 2007.

IKEDA, R. Possible participation of the Rho/Rho-associated coiled-coil-forming kinase pathway in the cell death of *Cryptococcus neoformans* caused by *Staphylococcus aureus* adherence. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 8, p. 552–557, 2011.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**, v. 15, n. 327, p. 291–295, 2010.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **NATURE IMMUNOLOGY**, v. 16, n. 4, p. 343–353, 2015.

JAIN, S.; MAHAJAN, V.; KUMAR, A. ScienceDirect Unusual case of coexistent

pulmonary cryptococcosis and tuberculosis in an immuno-competent host. **Indian Journal of Rheumatology**, p. 4–7, 2016.

JAVIER, B. et al. Pulmonary coinfection by *Pneumocystis jiroveci* and *Cryptococcus neoformans*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 80–82, 2012.

JIMENEZ, P. N. et al. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology ASM**, v. 76, n. 1, p. 46–65, 2012.

JOHN, M.; COOVADIA, Y. Meningitis due to a Combined Infection with *Cryptococcus neoformans* and *Streptococcus pneumoniae* in an AIDS Patient. **J. Infect.**, v. 36, n. 2, p. 231–232, 1998.

KAKEYA, H. et al. Three cases of concurrent infection with *Mycobacterium tuberculosis* and *Cryptococcus neoformans*. **Internal medicine**, v. 53, n. 15, p. 1685–92, 2014.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. **Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis** *Medecine et Maladies Infectieuses*, 2006.

KONG, C.; NEOH, H. M.; NATHAN, S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. **Toxins**, v. 8, n. 72, p. 1–21, 2016.

KOZIEL, J. et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 2009.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 3, p. 193–203, 2011.

LAARMAN, A. J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. **The Journal of Immunology**, v. 188, p. 386–393, 2012.

LACEY, K. A.; GEOGHEGAN, J. A.; MCLOUGHLIN, R. M. The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as

Vaccine Antigens. **Pathogens**, v. 5, n. 22, 2016.

LACKNER, P. et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 32, n. 2, p. 177–188, 2006.

LAU, G. W. et al. **The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection****Trends in Molecular Medicine**, 2004.

LEE, V. T. et al. Activities of Pseudomonas aeruginosa effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1695–1705, 2005.

LINS, R. X. et al. ExoU modulates soluble and membrane-bound ICAM-1 in Pseudomonas aeruginosa-infected endothelial cells. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 2, p. 154–161, 2010.

LOVEWELL, R. R.; PATANKAR, Y. R.; BERWIN, B. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of Pseudomonas aeruginosa. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 306, p. L591–L603, 2014.

MA, H. et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 12980–12985, 2009.

MA, H.; MAY, R. C. **Chapter 5 - Virulence in Cryptococcus Species**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 67

MAGDITCH, D. A. et al. DNA Mutations Mediate Microevolution between Host-Adapted Forms of the Pathogenic Fungus Cryptococcus neoformans. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 10, 2012.

MALLOY, J. L. et al. Pseudomonas aeruginosa protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 288, p. L409–L418, 2005.

MAN, W. H.; DE STEENHUIJSEN PITERS, W. A. A.; BOGAERT, D. The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. **Nature**

Reviews Microbiology, v. 15, n. 5, p. 259–270, 2017.

MANFREDI, R.; CALZA, L.; CHIODO, F. Dual *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* fungaemia in an AIDS presenter : a unique disease association in the highly active antiretroviral therapy (HAART) era. v. 51, n. June 2002, p. 1135–1137, 2017.

MARTINEZ-LONGORIA, C. A. et al. Severe meningoencephalitis co-infection due to *Cryptococcus neoformans* and *Mycobacterium tuberculosis* in a child with systemic lupus erythematosus. **International Journal of Infections Diseases**, v. 33, p. 106–108, 2015.

MATSUMOTO, K. **Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis****Biological Chemistry**, 2004.

MAXEINER, J. H. et al. A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. **Nature protocols**, v. 2, n. 1, p. 105–112, 2007.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus* : from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 2, p. 106–117, 2016.

MAYER-HAMBLETT, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Phenotypes Associated With Eradication Failure in Children With Cystic Fibrosis. **Clinical Infections Diseases**, 2014.

MAYER, F. L.; KRONSTAD, J. W. Disarming fungal pathogens: *Bacillus safensis* inhibits virulence factor production and biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **Mbio.Asm.Org**, v. 8, n. 5, p. e01537-17, 2017.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.

MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2012–2019, 2005.

MEDZHITOV, R. TOLL-LIKE RECEPTORS AND INNATE IMMUNITY. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 135–145, 2001.

MEYERS, D. J.; BERK, R. S. Characterization of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* as a potent inflammatory agent. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 659–666, 1990.

MIKKELSEN, H.; MCMULLAN, R.; FILLOUX, A. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

MOLLOY, S. F. et al. Cryptococcal meningitis: A neglected NTD? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–7, 2017.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 39, 2017.

MULCAHY, L. R.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microb. Ecol.**, v. 68, n. 1, p. 1–12, 2014.

NADAUD, J. et al. Méningite bactérienne chez le patient VIH positif : pensez aux co-infections! Bacterial meningitis in HIV patient: think about co-infections! **Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation**, v. 26, p. 85–87, 2007.

NAIR, N. et al. Impact of *Staphylococcus aureus* on Pathogenesis in Polymicrobial Infections. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 6, p. 2162–2169, 2014.

NIVENS, D. E. et al. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. **Journal of Bacteriology**, 2001.

OLIVEIRA, L. V. N. et al. Influenza A Virus as a Predisposing Factor for Cryptococcosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 419, 2017.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 0, p. 32–37, 2014.

PARKER, D.; PRINCE, A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection **Seminars in Immunopathology**, 2012.

PASMAN, L. The Complication of Coinfection. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 85, p. 127–132, 2012.

PERFECT, J. R. Cryptococcus neoformans: A sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 395–404, 2005.

PERFECT, J. R. The Impact of the Host on Fungal Infections. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. S39–S51, 2012.

PFALLER, M. A. et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 1437–1441, 1988.

PIER, G. B.; GROUT, M.; ZAIDI, T. S. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator is an Epithelial Cell Receptor for Clearance of Pseudomonas aeruginosa from the Lung. **Source: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 22, p. 12088–12093, 1997.

PISCITELLI, A. et al. Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. **Current Genomics**, v. 12, n. 2, p. 104–12, 2011.

PLATA, K.; ROSATO, A. E.; WEGRZYN, G. Staphylococcus aureus as an infectious agent: Overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p. 597–612, 2009.

PLOTKOWSKI, M. C. et al. Contribution of the platelet activating factor signaling pathway to cerebral microcirculatory dysfunction during experimental sepsis by ExoU producing Pseudomonas aeruginosa. **Pathogens and disease**, v. 73, 2015.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil : a review from 1996 to 2006. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–521, 2009.

PRIEBE, G. P. et al. Construction and characterization of a live, attenuated aroA deletion mutant of Pseudomonas aeruginosa as a candidate intranasal vaccine. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 3, p. 1507–1517, 2002.

QUIAN, J. et al. Meningitis por Cryptococcus neoformans en niños y

adolescentes infectados por virus de la inmunodeficiencia humana. **Rev Chilena Infectol**, v. 29, n. 5, p. 554–557, 2012.

RABIN, S. D. P.; HAUSER, A. R. Pseudomonas aeruginosa ExoU, a toxin transported by the type III secretion system, kills Saccharomyces cerevisiae. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4144–4150, 2003.

RADA, B.; LETO, T. L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: Relevance in Pseudomonas aeruginosa airway infections. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 73–81, 2013.

RADÓ, J. et al. Characterization of environmental pseudomonas aeruginosa using multilocus sequence typing scheme. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 1457–1466, 2017.

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

RELLA, A. et al. Pseudomonas aeruginosa Inhibits the Growth of Cryptococcus Species. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5–6, p. 451–461, 2012.

RITA COSTA, A. et al. Staphylococcus aureus virulence factors and disease. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.)**, 2013.

RODRIGUES, M. L. Funding and Innovation in Diseases of Neglected Populations: The Paradox of Cryptococcal Meningitis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016.

RODRIGUES, M. L. Neglected disease, neglected populations: the fight against Cryptococcus and cryptococcosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 7–8, 2018.

ROGERS, D. C. et al. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. **Mammalian genome**, v. 8, n. 10, p. 711–713, 1997.

ROHATGI, S.; PIROFSKI, L. Host immunity to Cryptococcus neoformans. **Future Microbiol.**, v. 10, n. 4, p. 565–581, 2015.

ROWE, S. E. et al. Reactive oxygen species induce antibiotic tolerance during systemic *Staphylococcus aureus* infection Sarah. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 282–290, 2020.

SAITO, F.; IKEDA, R. Killing of *Cryptococcus neoformans* by *Staphylococcus aureus*: the role of cryptococcal capsular polysaccharide in the fungal-bacteria interaction. n. November, p. 603–612, 2005.

SALEEM, F.; FASIH, N.; ZAFAR, A. CASE REPORT *Cryptococcus neoformans* and *Streptococcus pneumoniae* co-infection in post- traumatic meningitis in a patient with unknown HIV status. **J Pak Med Assoc**, v. 65, n. 10, p. 1122–1124, 2015.

SALIBA, A. M. et al. ExoU contributes to late killing of *Pseudomonas aeruginosa* - Infected endothelial cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 25–26, 2003.

SALIBA, A. M. et al. Implications of oxidative stress in the cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 2, p. 450–459, 2006.

SANTIAGO-TIRADO, F. H. et al. Trojan horse transit contributes to blood-brain barrier crossing of a eukaryotic pathogen. **mBio**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2017.

SANTOS, A. L. DOS et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SANTOS, J. R. A. et al. Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–14, 2014.

SCHULTZ, M. et al. Impairment of host defence by exotoxin A in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 822–827, 2001.

SCHULTZ, M. J. et al. The effect of *Pseudomonas* exotoxin A on cytokine production in whole blood exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, p. 227–232, 2000.

SHAVER, C. M.; HAUSER, A. R. Relative contributions of *Pseudomonas*

aeruginosa ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. **Infection and Immunity**, 2004.

SIDDIQI, O. K. et al. Molecular Diagnosis of Central Nervous System Opportunistic Infections in HIV-Infected Zambian Adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 12, p. 1771–1777, 2014.

SKALSKI, J. H.; LIMPER, A. H. Fungal , Viral , and Parasitic Pneumonias Associated with Human Immunodeficiency Virus. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 37, n. 2, p. 257–266, 2016.

SMITH, L. M. et al. The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. December 2014, p. 702–713, 2015.

SOARES, B. M. et al. *Cryptococcus gattii*: In Vitro Susceptibility to Photodynamic Inactivation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 2, p. 357–364, 2011.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. **Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*** **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005.

SORRELL, T. C. et al. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var . *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 1, p. 57–67, 2016.

STREETER, K.; KATOULI, M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. **Infection, Epidemiology and Medicine**, 2016.

SUN, Y. et al. ExoS and ExoT ADP-ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. **J Immunology**, v. 15, n. 188(4), p. 1884–95, 2012.

TAVARES, L. P. et al. Inhibition of Phosphodiesterase-4 during Pneumococcal Pneumonia Reduces Inflammation and Lung Injury in Mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, p. 1–11, 2016.

TENFORDE, M. W. et al. Advanced human immunodeficiency virus disease in

Botswana following successful antiretroviral therapy rollout: Incidence of and temporal trends in cryptococcal meningitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 5, p. 779–786, 2017.

TEOH-CHAN, C. H. et al. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Med. Microbiol.**, v. 8, n. May 1974, 1975.

THOMER, L.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Multiple ligands of von willebrand factor-binding protein (vWbp) promote *Staphylococcus aureus* clot formation in human plasma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 39, p. 28283–28292, 2013.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, 2015.

TRAVASSOS, L. H. et al. Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 44, p. 36714–36718, 2005.

TRUNK, K. et al. The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. **Nature Microbiology**, 2018.

TUPE, S. G. et al. Possible mechanism of antifungal phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas* sp. against dimorphic fungi *Benjaminiella poitrasii* and human pathogen *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 39–48, 2014.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. **Quimica Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VITKAUSKIENĖ, A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. **Medicina (Kaunas)**, v. 4646, n. 77, p. 490–5, 2010.

WAGER, C. M. L. et al. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. February, p. 1–16, 2016.

WARYAH, C. B. et al. Diversity of virulence factors associated with west australian methicillin-sensitive staphylococcus aureus isolates of human origin. **BioMed Research International**, 2016.

WEISCHENFELDT, J.; PORSE, B. Bone marrow-derived macrophages (BMM): Isolation and applications. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 3, n. 12, p. 1–7, 2008.

WERTHEIM, H. F. L. . et al. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p. 751–762, 2005.

WETTSTADT, S. et al. Delivery of the Pseudomonas aeruginosa phospholipase effectors PldA and PldB in a VgrG- And H2-T6SS-dependent manner. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JULY, p. 1–18, 2019.

WHITSETT, J. A. Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 5, p. 565–569, 2002.

WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. Pseudomonas aeruginosa: Host defence in lung diseases. **Respirology**, v. 15, p. 1037–1056, 2010.

WILLIAMSON, P. R. The relentless march of cryptococcal meningitis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. **Global Health Observatory (GHO) data**

http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/.

XU, L. Q. et al. Isolation and determination of four potential antimicrobial components from Pseudomonas aeruginosa extracts. **International Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 13, p. 1368–1374, 2017.

YANG, C.-L.; WANG, J.; ZOU, L.-L. Innate immune evasion strategies against Cryptococcal meningitis caused by Cryptococcus neoformans (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, p. 5243–5250, 2017.

YOUSEFI-AVARVAND, A. et al. The Frequency of Exotoxin A and Exoenzymes

S and U Genes Among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz, Iran. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 4, n. 3, p. 167–73, 2015.

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043–2057, 2008.

ZARAGOZA, O. Multiple disguises for the same party: the concepts of morphogenesis and phenotypic variations in *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 181, p. 1–9, 2011.

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: Cells with a giant impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 409–413, 2013.

ANEXO 1

Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais
CEUA 77/2018

Para: das@ufmg.br, dasufmg@gmail.com

De: ceua@prpq.ufmg.br

Data: 07/05/2018 03:05 PM

Assunto: Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 77/2018 (CEUA-UFMG)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 77/2018

Título do projeto: Caracterização da influência das bactérias *Saphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* na progressão da criptococose murina experimental.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Daniel de Assis Santos

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado com recomendação na reunião do dia 07/05/2018. Validade: 07/05/2018 à 06/05/2023 Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.

Belo Horizonte, 07/05/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3409-4516

www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

