

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

Bárbara Alves Miranda

**Estudo da interação entre o fungo *Cryptococcus gattii* e a bactéria
Streptococcus pneumoniae em modelo murino**

Belo Horizonte

2021

BÁRBARA ALVES MIRANDA

**Estudo da interação entre o fungo *Cryptococcus gattii* e a bactéria
Streptococcus pneumoniae em modelo murino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas com ênfase em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Co-orientadora: Dr^a. Marliete Carvalho da Costa

Belo Horizonte

Março de 2021

043 Miranda, Bárbara Alves.

Estudo da interação entre o fungo *Cryptococcus gattii* e a bactéria *Streptococcus pneumoniae* em modelo murino [manuscrito] / Bárbara Alves Miranda. – 2021.

91 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos. Co-orientadora: Dra. Marliete Carvalho da Costa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. *Cryptococcus gattii*. 3. *Streptococcus pneumoniae*. 4. Coinfecção. 5. Camundongos. I. Santos, Daniel de Assis. II. Costa, Marliete Carvalho da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE BÁRBARA ALVES MIRANDA
Nº REGISTRO: 2019654649

Às 14 horas do dia 01 de março de 2021, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelas Dras. Mila Fernandes Moreira Madeira, Ludmila de Matos Baltazar e o Prof. Daniel de Assis Santos – Orientador, para julgar o trabalho final "Estudo da interação entre o fungo *Cryptococcus gattii* e a bactéria *Streptococcus pneumoniae* em modelo murino", da aluna **Bárbara Alves Miranda**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE 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. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira

Dra. Ludmila de Matos Baltazar

Prof. Daniel de Assis Santos [Orientador]

Assinatura eletrônica
Data: 01/03/2021 14:00:00

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do PPGM/UFMG

COLABORADORES

Prof. Dr. Caio Fagundes Tavares

(Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG)

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

(Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG)

Prof. Dr^a. Tatiane Alves da Paixão

(Departamento de Patologia Geral ICB/UFMG)

Dr^a. Luciana Pádua Tavares

(Harvard Medical School / Brigham and Women's Hospital)

Dedico este trabalho à minha família!

Aos meus pais, Clélio, Inez e Nelsinho

Aos meus queridos irmãos Breno, Marcelle, Anna Luiza e Marliete

Ao meu amor Edson

Às minhas lindas e amadas sobrinhas Elis, Melissa e Helena

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Daniel, co-orientadora Dr^a. Marliete e aos colaboradores Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes, Prof. Dr^a. Tatiane Paixão por todo ensinamento, paciência e orientação!

Agradeço ainda por todo apoio moral, emocional e pelos grandes aprendizados aos meus colegas do Laboratório de Micologia.

Agradeço também ao apoio financeiro das agências de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPQ e à UFMG.

Além de todos os professores da Pós-Graduação em Microbiologia que me auxiliaram nesta caminhada.

RESUMO

Cryptococcus gattii (*C. gattii*) e *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) são microrganismos que podem causar pneumonia, alcançar diversos órgãos e chegar ao Sistema Nervoso Central (SNC) causando meningite, podendo levar o indivíduo à morte. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a coinfeção por *S. pneumoniae* e *C. gattii* em modelo murino. Nossos resultados demonstraram que, após a infecção com *C. gattii*, a infecção secundária por *S. pneumoniae* piora significativamente o estado neuropsiquiátrico, o comportamento motor e a função autônoma dos animais, levando à morte precoce. Esses resultados foram associados ao aumento da translocação bacteriana do pulmão para outros órgãos, incluindo o Sistema Nervoso Central e à retenção de *C. gattii* no espaço alveolar e no parênquima pulmonar. Neste sítio foi verificado o influxo elevado de neutrófilos e macrófagos, aumento de níveis de mediadores inflamatórios como TNF, IFN- γ , IL-17, IL-12p70, principalmente, IL-1 β . Além disso, foram observadas lesões histopatológicas pulmonares e aumento significativo na expressão do receptor de fator de ativação plaquetária (PAFR) no parênquima pulmonar o que pode estar associado à intensificação inflamatória e também ao aumento da translocação bacteriana para o SNC. No momento, estudos em modelo murino *knockout* de PAFR e tratamento de animais com inibidor de IL-1 β estão em andamento para propiciar melhor entendimento sobre os mecanismos que levam ao fenótipo observado. Os resultados apontam para a importância do estudo de coinfeções entre microrganismos de diferentes reinos, de forma a propiciar conhecimentos inéditos sobre a progressão de doenças polimicrobianas.

Palavras-chave: Coinfeção, *Cryptococcus gattii*, *Streptococcus pneumoniae*, camundongos.

ABSTRACT

Cryptococcus gattii (*C. gattii*) and *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) are microorganisms that can cause pneumonia, reach several organs, and the Central Nervous System (CNS) causing meningitis and possibly leading to death. The present paper has the objective to characterize the coinfection of *S. pneumoniae* and *C. gattii* in a murine model. The results demonstrated that, in a coinfection process with *C. gattii*, the secondary infection caused by *S. pneumoniae* significantly worsens the neuropsychiatric state, motor behavior, and autonomous function of the animals, leading to an early death. These results were associated with an increase in bacterial translocation from the lung to other organs, including the central nervous system and the retention of *C. gattii* in the alveolar infiltrates and lung parenchyma. This site, was verified the high influx of neutrophils and macrophages, increased levels of pro-inflammatory cytokine secretion such as TNF, IFN- γ , IL-17, IL-12p70, mainly IL-1 β . Also, pulmonary histopathological lesions and a significant increment in the expression of the platelet aggregating factor receptor (PAFR) were observed in the lung parenchyma, which may be associated with inflammatory intensification and also with increased bacterial translocation to the CNS. At the moment, histopathological studies, a murine knockout model of PAFR, and animal treatment with an IL-1 β inhibitor are ongoing to provide a better understanding of the mechanisms that lead to the observed phenotype. These results point to the importance of studying co-infections between microorganisms from different kingdoms, to provide unprecedented knowledge about the progression of polymicrobial diseases.

Keywords: Co-infection, *Cryptococcus gattii*, *Streptococcus pneumoniae*, mice.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – Grau Celsius

µL - Microlitros

ANOVA- Análise de variância

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC – Sigla do inglês, *American Type Culture Collection*

BHE – Barreira hematoencefálica

BSA – Albumina de soro bovino

Ca - Cálcio

CbpA - Proteína A de ligação à colina

CEBIO - Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

D.O. – *Densidade Óptica*

HE - Hematoxilina-Eosina

HIV- Sigla do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*

IgA – Imunoglobulina do tipo A

IL- Interleucina

IFN γ- Interferon γ

LBA – Lavado broncoalveolar

LR – Receptor de laminina

ISF- Fluido intersticial

mg – Miligramas

mL- Mililitros

MHC II- Complexo principal de histocompatibilidade de classe II

MNN – Células mononucleadas

MPO – Mieloperoxidase

NAG- *N*-acetil-β- D- glucosaminidase

NanA – Neuraminidase A

NET – Sigla do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAF- Fator de ativação plaquetária

PAFR – Sigla do inglês, *Platelet Activating Factor Receptor*

PBS – Sigla do inglês, *Phosphate Buffered Saline*

PCho - Adesina fosforilcolina

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pIgR - Receptor de poliimunoglobulina

PMN- células polimorfonucleadas

PRR - Receptores de reconhecimento de padrão

PsaA- Proteína A de superfície de pneumococo

PspC - Proteína C de superfície de pneumococo

qPCR- PCR quantitativa, PCR em tempo real

Rpm – Rotação por minuto

SNC – Sistema Nervoso Central

TA – Temperatura ambiente

TNF- Fator de necrose tumoral

TMB – Tetrametilbenzidina

UFC- Unidade Formadora de Colônias

WHO- Sigla do inglês, *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 (Adaptada) Criptococose.....	18
Figura 2 (Adaptada). Progressão da doença pneumocócica.....	24
Figura 3. Esquema dos modelos de coinfeção testados no trabalho.	37
Figura 4 . Esquema representativo da dinâmica de coinfeção utilizada no trabalho	39
Figura 5 . Curva de sobrevivência para seleção de inóculo de Sp não-letal.....	47
Figura 6 . Clearance bacteriano..	48
Figura 7 . Cinética de coinfeção.	50
Figura 8 . Análise comportamental.....	52
Figura 9 . Animais C57/BL6 com quadro clínico de conjuntivite.....	53
Figura 10 . Avaliação da carga fúngica em grupo mono infectado por Cg.	54
Figura 11 . Análise de carga fúngica e bacteriana em grupos mono e coinfectados.	57
Figura 12 . Contagem total e diferencial de leucócitos..	59
Figura 13 . Quantificação de MPO e NAG no parênquima pulmonar.....	61
Figura 14 . Dosagem de citocinas no LBA.	63
Figura 15 . Dosagem de citocinas no parênquima pulmonar.	65
Figura 16 . Identificação de populações celulares no LBA.	67
Figura 17 . Análise histopatológica dos pulmões.....	69
Tabela 1 . Protocolo SHIRPA.	38

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1. <i>Cryptococcus</i> spp.....	14
1.1.1. Infecção pulmonar e a interação patógeno-hospedeiro.....	17
1.1.2. Infecção cerebral.....	21
1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	23
1.2.1. Infecção pulmonar e a interação patógeno-hospedeiro.....	24
1.2.2. Infecção cerebral.....	27
1.3. Coinfecções.....	28
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. Geral.....	34
3.2. Específicos.....	34
4. METODOLOGIA	35
4.1. Cinética de infecção.....	35
4.1.1. Microrganismos.....	35
4.1.2. Animais experimentais.....	35
4.1.5. Padronização do inóculo de <i>S. pneumoniae</i>	37
4.1.6. Clearance bacteriano.....	37
4.1.7. Padronização do modelo murino de coinfecção.....	37
4.1.8. Protocolo SHIRPA.....	38
4.1.9. Determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	38
4.2. Marcadores inflamatórios.....	40
4.2.1. Contagem total e diferencial de leucócitos.....	40
4.2.2. Processamento dos pulmões para análise de MPO/NAG.....	41
4.2.3. Dosagem da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO).....	41
4.2.4. Atividade de <i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) nos tecidos infectados.....	42
4.2.5. ELISA para quantificação de citocinas.....	42
4.2.6. Imunofenotipagem celular no lavado broncoalveolar.....	43
4.2.7. Análise histopatológica.....	43
4.3. Expressão do Receptor do Fator de Ativação Plaquetária (PAFR).....	44
4.4. Análise estatística.....	45
5. RESULTADOS	46

5.1. A infecção secundária de <i>S. pneumoniae</i> durante a criptococose aumenta a morbidade e mortalidade dos animais	46
5.1.2. Clearance bacteriano.....	47
5.1.3. Cinética de coinfeção.....	48
5.1.4. Análise comportamental e funcional dos animais	51
5.2. A coinfeção altera o curso da criptococose causada por <i>C. gattii</i> e acentua o quadro de infecção bacteriana.....	54
5.2.1. Quantificação da carga microbiana	54
5.3. Durante a criptococose, a infecção secundária por <i>S. pneumoniae</i> altera o recrutamento celular, produção de mediadores inflamatórios e intensifica a resposta inflamatória	58
5.3.1. Contagem total e diferencial de leucócitos	58
5.3.2. Ensaio de MPO e NAG	60
5.3.4. Citometria de fluxo.....	66
5.3.5. Análise histopatológica.....	67
5.4. A coinfeção favorece a super expressão do receptor de ativação plaquetária 70	
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES	77
8. PERSPECTIVAS	78
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	79
ANEXO	91

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. *Cryptococcus* spp

O gênero *Cryptococcus* abriga muitas espécies de leveduras encapsuladas, sendo que *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) e *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) se destacam das demais pela importância na medicina humana e veterinária (Danesi et al., 2021). *C. gattii* e *C. neoformans* são espécies saprófitas e ubíquas, mas se diferem tanto nas características bioquímicas e genéticas quanto nas manifestações clínicas da doença que ambas causam ao hospedeiro humano (Cogliati, 2013). Ao passo que *C. neoformans* possui predileção pelo SNC levando o paciente a um quadro de meningoencefalite, *C. gattii* pode causar uma pneumonia grave e também a quadros de infecção no SNC (Chen et al., 2000; Galanis et al., 2010). A epidemiologia da doença é bem descrita na literatura, indivíduos imunossuprimidos, são mais susceptíveis a uma infecção causada por *C. neoformans*, e *C. gattii* mais comum em indivíduos imunocompetentes. Mas essas diferenças na apresentação clínica da doença podem estar relacionadas também às diferenças dos subtipos moleculares dessas espécies (Mitchell et al., 1995). Porém, recentemente, estudos apontam que cada vez mais *C. gattii* tem sido isolado também em indivíduos imunocomprometidos e causando doença no SNC (Park et al., 2009; Ellabib et al., 2016; Maziarz et al., 2016; Bollam et al., 2020; Xue et al., 2020).

Tais leveduras são cosmopolitas e podem ser encontradas facilmente no meio ambiente, em excretas de aves, no solo e em restos de matéria orgânica em decomposição. Primeiramente, *C. gattii* foi descrito em associação com a espécie de eucalipto *Eucalyptus camaldulensis*, enquanto que *C. neoformans* estava associado com excretas de pombos. Posteriormente não só foram descobertas outras espécies de eucaliptos capazes de abrigar tais leveduras, como também outras espécies de árvores como amendoeiras, mangueiras, alfarrobeiras, pinus, oliveiras, cactos que apresentavam lesões, suculentas entre outras espécies de plantas (Ajello et al., 1958; Hagen et al., 2010; Cogliati et al., 2016)

Logo, confirma-se que materiais vegetais e excretas de aves representam no geral, um importante nicho para essas leveduras podendo ser encontrada em troncos

de árvores, restos de plantas, solo e até mesmo no ar. *C. neoformans* e *C. gattii* estão intimamente bem adaptados não apenas a ambientes rurais, mas também a ambientes urbanizados representando uma grande ameaça a indivíduos saudáveis e imunossuprimidos (Hagen et al., 2010; Cogliati et al., 2016).

Segundo Kwon-Chung e colaboradores (2006), *C. neoformans* é classificado em duas variantes e seus respectivos sorotipos sendo *C. neoformans* var. *grubii* que apresenta os sorotipos A, e *C. neoformans* var. *neoformans* com sorotipos D e o híbrido AD. Já *C. gattii* não apresenta variante e expressa os sorotipos B e C. Cada sorotipo é caracterizado pelas diferenças estruturais do polissacarídeo presente na cápsula dessas leveduras. *C. neoformans* var. *grubii* pode apresentar tipos moleculares diferentes, sendo eles VNI, VNII, VNB correspondendo ao sorotipo A. *C. neoformans* var. *neoformans* possui genótipo do tipo VNIII correspondente ao sorotipo AD e VNIV correspondente ao sorotipo D. Já *C. gattii* revela quatro tipos moleculares sendo VGI representando sorotipos C e B, VGII sorotipo B, VGIII sorotipo C e VGIV sorotipos C e B (Kwon-Chung et al., 2006; Ma e May, 2009). Mais recentemente, um grupo de pesquisadores, utilizando dados de análise de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) e MALDI-TOF (espectrometria de massa), subdividiu este mesmo complexo em sete espécies distintas. Hagen e colaboradores, 2015 sugeriram que o atual *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* como espécies distintas e cinco espécies dentro de *C. gattii*. Mas, no momento, não há um consenso na comunidade científica quanto a essa nova taxonomia (Hagen et al., 2015; Ellabib et al., 2016; Hagen et al., 2017).

Cryptococcus spp. podem causar sérios danos ao ser humano promovendo a criptococose. A doença afeta tanto indivíduos hígidos, ou seja, saudáveis quanto indivíduos imunocomprometidos. O sucesso da infecção é resultado de um conjunto de características eminentes ao fungo, como os fatores de patogenicidade que conferem virulência aos agentes etiológicos da criptococose e características do sistema imune do hospedeiro, levando a altos índices de mortalidade em todo mundo. Uma estimativa mundial feita por Park e colaboradores (2009), calcula que a meningoencefalite criptocócica é responsável por no mínimo 600.000 mortes anuais (Kwon-Chung et al., 2014; Park et al., 2009). Já outra estimativa feita em 2014 demonstrou que a incidência global de meningite criptocócica seja de 223.100 casos,

resultando em 181.100 mortes, em pacientes portadores do vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (Rajasingham et al., 2017).

A prevalência da doença em países da América Latina, avaliada recentemente, aponta que apesar de ser negligenciada em países subdesenvolvidos, a criptococose chama atenção pelo número significativo de mortes anuais. Cerca de 5.000 pessoas são acometidas pela doença e 2.400 mortes por meningoencefalite criptocócica são registradas anualmente nesses países. Do total de 223.100 casos de criptococose, registrados em 2014 de pacientes vivendo com o vírus HIV no mundo, o terceiro maior número de casos foi relato na América Latina, com uma estimativa de 5.300 casos registrados por ano (Rajasingham et al., 2017). Desse total de casos, países como Brasil e Colômbia apresentaram maior incidência da doença, registrando de 1.001 a 2.500 casos, seguido de Argentina e México com uma incidência de 501 a 1.000 casos anuais (Rajasingham et al., 2017). Estudos ainda apontaram que todos os sorotipos já descritos na literatura são encontrados em países da América Latina. No Brasil, entre as micoses sistêmicas, *Cryptococcus* sp. causam o maior número de mortes em pacientes portadores do vírus HIV (Firacative et al., 2018). Em 2008, Leimann e Koifman, relataram no estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre os anos de 2000 a 2004, um total de 696 casos novos registrados de criptococose, representando uma taxa de incidência média anual de 0,45 - 1,3 casos por 100 mil habitantes. Houve predominância do sexo masculino e a presença do vírus HIV foi praticamente a única enfermidade preexistente registrada, estando presente em 61,2% do total de pacientes, e a letalidade foi de 51,8% (Leimann e Koifman, 2008).

Pesquisadores do Rio Grande do Sul, Brasil, realizaram um levantamento de casos de doenças fúngicas entre os anos de 2003-2015. Das 13.707 amostras analisadas, 54% dos pacientes apresentaram quadro clínico de micose sistêmica sendo que a criptococose liderou o *ranking* dessas doenças, representando 73,13% dos casos (Da Silva Fay et al., 2019).

Já no estado de Minas Gerais, alguns trabalhos publicados recentemente, demonstraram que há prevalência do genótipo VNI de *C. neoformans*, seguido do genótipo VGII de *C. gattii* na região do triângulo mineiro, nas cidades de Uberaba e Uberlândia (Andrade-Silva et al., 2018; Damasceno - Escoura et al., 2019). Já na cidade de Belo Horizonte, o perfil molecular observado se confirma, com maior

prevalência do genótipo VNI de *Cn* seguido de VGII, *Cg*. Observa-se ainda, fatores predisponentes associados à criptococose como diabetes, HIV, lúpus, pacientes transplantados e em tratamento para câncer. Pacientes do sexo masculino são acometidos com maior frequência quando comparados com os do sexo feminino. Ainda se observou taxa de mortalidade de 29,8% entre os pacientes HIV positivos (Lima, 2019).

Nos últimos anos, o Brasil tem elevado o número de publicações científicas, atingindo o seu auge em 2010, ano em que cientistas brasileiros foram responsáveis por 20% das publicações relacionados à criptococose em todo o mundo. Sugestivamente, durante esse período houve maior investimento financeiro na área da pesquisa científica por parte do governo brasileiro já que o país estava sob alto crescimento econômico. Essa era de grandes avanços na área das ciências biomédicas trouxe grandes benefícios para o país a respeito do que se conhece hoje sobre a doença. Espera-se que tais investimentos se perpetuem, pois ainda há grandes desafios a serem enfrentados, como a limitada classe de antifúngicos eficazes contra *Cryptococcus* spp., o tratamento, muitas vezes, tóxicos aos pacientes, custos elevados para administração de alguns medicamentos e a alta taxa de resistência de algumas linhagens aos antifúngicos que se conhecem hoje (Albuquerque et al., 2012; Rodrigues et al., 2016).

1.1.1. Infecção pulmonar e a interação patógeno-hospedeiro

A criptococose é uma micose granulomatosa sistêmica causada por *C. gattii* e *C. neoformans*. O contágio se dá a partir da inalação de partículas infectantes presentes no meio ambiente. No tecido pulmonar, *Cryptococcus* sp pode se proliferar e migrar para o SNC. Assim que o patógeno alcança os pulmões, ele se depara com células de defesa do hospedeiro como macrófagos alveolares que desempenham papel importante na resposta imune, por meio da fagocitose. Em partes dos casos, a infecção é contida sem grandes danos ao hospedeiro, em outras situações a infecção pode se configurar como uma doença granulomatosa, pulmonar que se apresenta com sintomas agudos de pneumonia. Quando a resposta imune do hospedeiro não age corretamente para sanar o problema, o patógeno pode se disseminar para o SNC

e sintomas clássicos como cefaleia, neuropatias cranianas, perda da memória e febre podem se desenvolver ao longo do tempo (Figura 1) (Kwon-Chung et al., 2014).

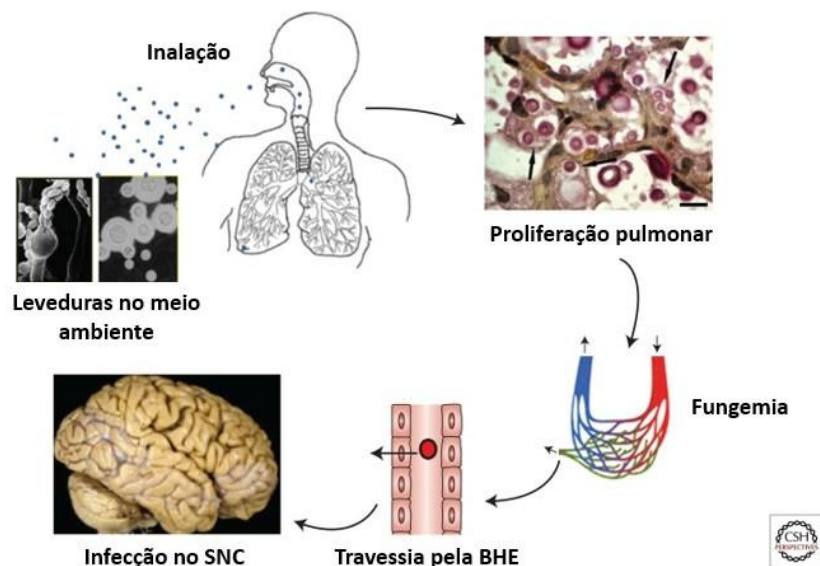


Figura 1 (Adaptada) Criptococose. As células criptocócicas transportadas pelo ar são inaladas pelo hospedeiro e se proliferam no pulmão. Elas podem atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar o SNC, via hematogênica (Kwon-Chung et al., 2014).

A doença afeta principalmente pacientes imunossuprimidos, não apenas portadores do vírus HIV, mas também indivíduos transplantados, com doenças pré-existentes como diabetes, lúpus entre outras comorbidades (Kwong-Chung et al., 2014). Inicialmente, inalados os esporos fúngicos, esses patógenos encontram barreiras físicas naturais do ser humano como mucosa nasal, pelos, secreção e muco entre outros componentes do trato respiratório superior. Vencendo tais barreiras iniciais *Cg* e *Cn* chegam aos pulmões, onde encontram um ambiente pouco favorável ao seu crescimento, em contrapartida esses patógenos possuem fatores de virulência que podem ser determinantes para a colonização deste órgão. Para isso múltiplos rearranjos metabólicos e ativação de vias de sinalização são fundamentais para o sucesso da doença (Zaragoza et al., 2019).

Chegando no pulmão a proliferação fúngica é dependente da disponibilidade de nutrientes como carbono, nitrogênio e micronutrientes como ferro, cobre e zinco. A imunidade nutricional constitutiva esgota, do meio extracelular, os nutrientes essenciais para multiplicação de patógenos criando um ambiente limitador de

micronutrientes para a levedura. (Wang et al., 2009; Potrykus et al., 2014). *Cn* e *Cg* também encontram uma substância surfactante no pulmão, essas leveduras são capazes metabolizar tal substância, rica em moléculas lipoproteicas, contribuindo para a adesão dos microrganismos nos alvéolos pulmonares (Maruvada et al., 2012).

Outro importante passo para a adaptação a este ambiente é o crescimento à temperatura fisiológica do hospedeiro. Assim como todos os eucariotos, a cascata de sinalização sensível à temperatura envolve a enzima fosfatase ativada por Ca^{2+} , mediante a estímulo do ambiente, chamada calcineurina. Essa enzima é um fator diferencial para o crescimento fúngico a 37°C (Chen et al., 2013).

Além de adaptar-se a carência nutricional e temperatura nos pulmões do hospedeiro, as células fúngicas são atacadas por componentes celulares do sistema imunológico. Macrófagos alveolares residentes e células dendríticas são responsáveis pela fagocitose e eliminação do fungo, simultaneamente, células T também são recrutadas para controlar a infecção. Neste momento, as células fúngicas tendem a evadir do sistema imunológico expressando diversos fatores de virulência. Entre eles a produção de cápsula polissacarídica que confere proteção contra a fagocitose, desidratação e radicais livres (Voelz et al., 2010; Huston et al., 2016). Há uma série de sinais externos que são capazes de induzir a formação de cápsula em *Cn* e *Cg*. Cada condição pode induzir um fenótipo específico de cápsula, podendo ser uma resposta frente a estresse nutricional, pH, níveis diversos de CO_2 e redução de íons (Mcfadden et al., 2007; 13 O'meara, et al., 2012).

A variação do tamanho capsular pode ser observada em diferentes genótipos, em *Cg* (Fernandes et al., 2016). Freitas e colaboradores (2019) observaram variações capsulares quando semeadas as espécies de *Cn* e *Cg* em condições de cultivo distintas. Em meios contendo apenas sais e com baixa concentração de glicose, *Cryptococcus* spp. aumentam a espessura capsular e reduzem o diâmetro da célula, havendo variações entre as diferentes linhagens trabalhadas (Freitas, 2019). Outra característica relevante é a variação no tamanho/espessura da cápsula frente à resposta imune do hospedeiro. Logo no primeiro contato com o sistema imune, há um aumento considerável da cápsula comprometendo a fagocitose por macrófagos (Costa et al., 2016). Outro mecanismo utilizado pela levedura para sobreviver a este ambiente inóspito, é a produção de células poliploides denominadas titânicas ou "*titan*

cells". Essa característica confere ao patógeno uma vantagem quanto à fagocitose pelas células de defesa, já que devido ao tamanho considerado exagerado, quando comparado ao tamanho normal da célula fúngica, a fagocitose se torna inviável. Células de *Cryptococcus* spp. cultivadas em laboratório são arredondadas e apresentam entre 5 µm – 7 µm de diâmetro, em condições normais de crescimento. Já as células titânicas são caracterizadas por se apresentarem tamanho superior às células normais, possuírem parede celular mais espessa com alto conteúdo de quitina, sendo superiores a 10µm de diâmetro e por serem poliploides (Crabtree et al., 2012; Dambuza et al., 2018; Zaragoza et al., 2013; Okagaki et al., 2011).

Na iminência de eliminar o patógeno, macrófagos e neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, mas o fungo é capaz de se melanizar. A melanina representa um grupo de pigmentos escuros que estão presentes em diversas espécies de microrganismos. *Cryptococcus* spp. são capazes de produzir tal pigmento o que confere resistência ao patógeno não só quanto ao estresse oxidativo quanto ao uso de antimicrobianos, incidência de radiação UV, solar e gama e na presença de metais pesados. (Casadevall et al., 2000; Nosanchuk et al., 2006).

Durante o decorrer da doença, as células fagocíticas podem desempenhar o seu papel e efetivamente fagocitar os patógenos. Mas ainda nos macrófagos, a levedura pode prolongar a sua sobrevivência dentro dos fagolisossomos por meio da secreção de enzimas como superóxido dismutase, uma oxidase alternativa, flavinohemoglobina denitrosilase, glutathione peroxidase, metaloprotease e tiol peroxidase (Voelz et al., 2010). Ou seja, *Cryptococcus* spp. são patógenos intracelulares facultativos e podem ser fagocitados, se replicarem dentro de macrófagos. As leveduras podem ser ainda expelidas afetando a viabilidade das células fagocíticas ou deixando-as íntegras por meio do evento chamado de vomocitose ou exocitose não lítica (Ma et al., 2006; Alvarez et al., 2006).

Ainda no ambiente pulmonar, quanto à resposta imunológica do hospedeiro, macrófagos residentes alveolares, células dendríticas e *natural killers* promovem a fagocitose da levedura, estas são as primeiras células a atuarem na defesa do organismo. A partir daí há secreção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF), IL-1β, IL-6, IL-17 e IL-22 desencadeando uma resposta imune celular. O aumento da produção de IFN-γ em micoses oportunistas é importante tanto

na imunidade inata quanto na adaptativa (Wormley et al., 2005; Schoffelen et al., 2013). Além disso, neutrófilos também são recrutados, eles se caracterizam por serem células efetoras críticas do sistema imune inato que são recrutadas rapidamente para os locais de inflamação. Neutrófilos são capazes de eliminar os patógenos, principalmente, por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio (Aratani et al., 2006).

O fenótipo M1 de macrófagos classicamente ativados se torna mais intenso logo no início da infecção quando em resposta ao patógeno. Essa linha de defesa gera espécies reativas de oxigênio de nitrogênio sendo efetiva na morte do patógeno. A polarização dos macrófagos é dinâmica e envolve diversos estímulos como a produção de citocinas, macrófagos expressando fenótipo M1 com passar do tempo pode se alterar e o fenótipo M2 passa ser o mais expresso. Tal fenótipo é mediado por citocinas incluindo interleucinas IL-4, IL-13 e IL-10, sendo importante para supressão e regulação de respostas inflamatórias desempenhando papel crucial na reparação tecidual, não apresentando tanta eficácia na atividade antifúngica, como observado no fenótipo M1 (Davis et al., 2013; Leopold et al., 2016; Murray et al., 2017).

1.1.2. Infecção cerebral

O Sistema Nervoso Central possui três barreiras que limitam e regulam a troca de moléculas na interface entre o sangue e o tecido neural, são elas: a barreira hematoencefálica (BHE), o epitélio do plexo coroide e o epitélio aracnoide (Abbot et al., 2004). A BHE, corresponde a uma dessas barreiras e tem como função a seleção de substâncias capazes de chegar no SNC. Ela é composta por células endoteliais que circunscreve os microvasos cerebrais entre o sangue e o fluido intersticial (ISF). Tais células possuem função exclusiva das demais, devido a sua alta seletividade, sendo capazes de controlar o influxo e efluxo de íons e biomoléculas essenciais e potencialmente prejudiciais ao SNC, com o objetivo de se obter um microambiente favorável à função neuronal (Abbot et al., 2006).

Microrganismos podem atravessar a BHE de forma transcelular, paracelular, - e por meio de fagócitos infectados, mecanismo denominado de cavalo de Troia. Não apenas as leveduras criptocócicas atravessam a BHE destas três formas, mas outros microrganismos, como é o caso de *S. pneumoniae*, com exceção para o último evento

que é mais citado mais comum em infecções causadas por bactérias intracelulares como *Listeria monocytogenes* (May et al., 2016).

Porém, ainda é pouco elucidado em quais situações *Cryptococcus* spp. trafegam pelo sangue e migram para o cérebro. Atualmente, sabe-se que existem três vertentes que apontam o motivo de algumas linhagens de *Cryptococcus* spp. apresentarem predileção ao SNC. O primeiro deles é observado em estudos com imagens de microscópio intravital que demonstram que a transmigração do fungo é dependente de urease. A levedura trafega pelo sangue e algumas células ficam presas em capilares de diâmetro inferior ou igual ao da levedura (Shi et al., 2010). As microcélulas, que conseguem trafegar pelos vasos sanguíneos, ao chegarem no SNC ficam aprisionadas mecanicamente nos microvasos, interagem com as células endoteliais secretando urease até chegarem ao microvaso cerebral. Estas células recebem essa denominação pois apresentam um tamanho inferior ao considerado normal, apresentam de diâmetro entre 2 μm - 4 μm . Apresentam parede celular espessa e parece estar adaptada à proliferação celular em células fagocíticas e à transmigração da BHE devido ao seu tamanho (Feldmesser et al., 2001). A degradação enzimática da ureia produz amônia que é uma substância altamente tóxica e que danifica o endotélio dessa região aumentando então a sua permeabilidade e conseqüentemente a transmigração de *Cryptococcus* spp. Especula-se ainda que a urease secretada pela levedura possua especificidade quanto ao seu substrato presente no SNC facilitando a transmigração fúngica (Shi et al., 2010; Shi et al., 2016).

Outro fator que possivelmente contribui para o recrutamento de leveduras criptocócicas para o cérebro é a alta concentração de inositol nessa região. Apesar de ter como fonte primária de energia a molécula de glicose, *Cryptococcus* spp. também utilizam o inositol em seu metabolismo como fonte de carbono. Esse açúcar encontra-se em maior concentração ao redor da BHE quando comparado ao plasma sanguíneo. Mutantes para a expressão de transportadores de inositol fúngico, dificultam parcialmente a transmigração para o SNC. Além disso, estudos comprovaram que altas concentrações de inositol aumentam também a expressão do gene- responsável pela produção de ácido hialurônico (HA)- na cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp. As células endoteliais do hospedeiro possuem receptores de membrana que

reconhecem o HA da levedura promovendo assim a invasão no tecido cerebral (Liu et al., 2013).

Cryptococcus spp. podem também parar, repentinamente, nos capilares do cérebro trafegando pelo sangue, após uma infecção pulmonar. Podem se disseminar de forma extrapulmonar, levando à infecção da corrente sanguínea e posterior disseminação hematogênica para órgãos-alvo. Outros locais menos frequentes também podem ser infectados como olhos, próstata, pele, articulações e ossos (Allen et al., 1982; Rex et al., 1993; Shi et al., 2010; Christianson et al., 2003; Heitor et al., 2019).

A primeira linha de defesa que as leveduras encontram ao chegar no SNC é a micróglia, que são macrófagos residentes do parênquima cerebral e que desempenham papel de vigilância imunológica. Essas células produzem múltiplas citocinas pró-inflamatórias após exposição a *C. neoformans*, incluindo TNF, IL-1 β e IL-6 além de ativar macrófagos expressando MHC Classe II e CD11c (Barluzzi et al., 1998; Aguirre et al., 2002).

1.2. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*), também conhecida como pneumococo é uma bactéria Gram-positiva, com mais de 90 sorotipos, anaeróbia facultativa, que se apresenta em formato oval ou lanceado, pode estar disposta aos pares como diplococos ou em cadeias curtas. *S. pneumoniae* é um patógeno oportunista, que coloniza a cavidade oral e a mucosa do trato respiratório superior dos seres humanos de forma assintomática. Porém, a migração deste patógeno para outras regiões pode causar doenças não invasivas como otite média e sinusite ou invasivas como pneumonia, meningite e sepse (Henriques-Normark e Tuomanen, 2013; Geno et al., 2015).

Esse microrganismo é a principal causa de pneumonia adquirida na sociedade, com índices consideráveis de morbidade e mortalidade no mundo, sendo mais grave entre as crianças e os idosos (Brown, 2012). Em 2013 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 476.000 crianças menores de 5 anos morreram em decorrência de infecções pneumocócicas (OMS, 2013). Geralmente, as crianças são colonizadas com

a bactéria até o sexto ano de vida, a colonização atinge o pico no terceiro ano de vida e se reduz ao longo da vida. Adultos que possuem contato com crianças colonizadas podem se infectar mais facilmente (Henriques-Normark e Tuomanen, 2013). Na população adulta, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças Infecciosas (CDC) os pneumococos foram responsáveis por até 30% da pneumonia adquirida na sociedade (CDC, 2020). Nos EUA, em 2011, foram registrados mais de 35.000 casos de doença pneumocócica invasiva e mais de 4.200 mortes (CDC, 2020).

1.2.1. Infecção pulmonar e a interação patógeno-hospedeiro

A transmissão da doença se dá por meio da inalação de aerossóis e o microrganismo começa então a colonizar a região nasofaríngea. Ao entrar na cavidade nasal, a bactéria se liga às células epiteliais e podem permanecer no local sem causar danos ao hospedeiro de forma assintomática, ou ainda podem se espalhar para diversos sítios como ouvidos, seios da face, pulmão e SNC (Figura 2) (Henriques-Normark e Tuomanen, 2013; Weiser et al., 2018).

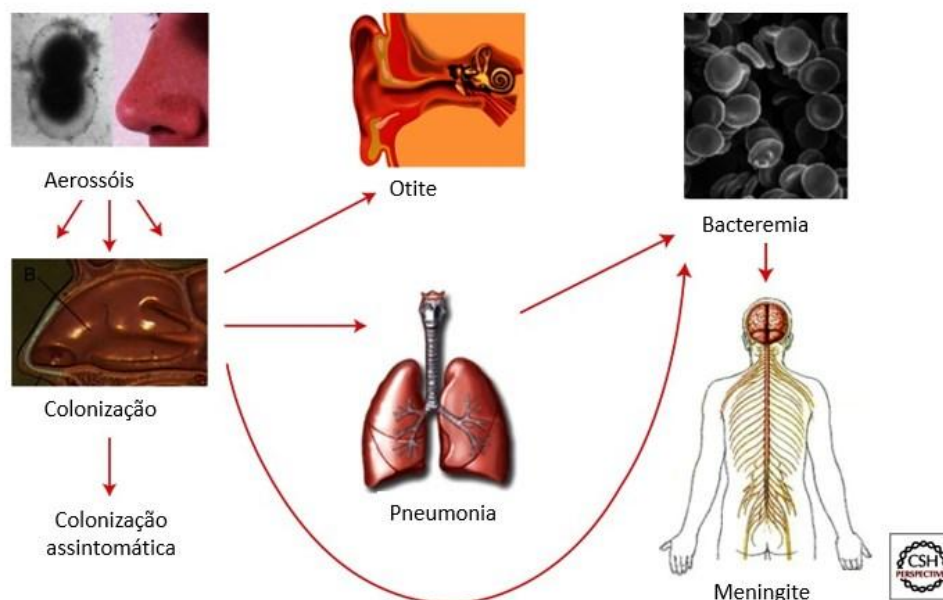


Figura 2 (Adaptada). Progressão da doença pneumocócica. Pneumococos propagados por aerossóis colonizam a nasofaringe. Essa interação mais comum leva à eliminação do microrganismo ou à ativação da imunidade específica do hospedeiro. A progressão para otite média é muito comum em crianças. A doença invasiva envolve a disseminação para os pulmões e a corrente sanguínea. O desenvolvimento mais sério é a meningite (Henriques-Normark e Tuomanen, 2013).

Fatores predisponentes como diabetes, doenças hepáticas, cardiopatias, doenças neoplásicas e renais, infecção pelo vírus HIV entre outras comorbidades aumentam a taxa de letalidade da doença (Brown, 2012; Welte, 2012). Segundo o CDC, crianças infectadas com HIV, com asplenia (mal funcionamento do baço) ou ainda anemia falciforme, apresentam alto risco para doença pneumocócica invasiva (CDC, 2020).

Além dos fatores intrínsecos ao hospedeiro, *S. pneumoniae* apresenta fatores de patogenicidade que contribuem para o sucesso da infecção e para o desenvolvimento de invasivas e não invasivas. Na mucosa do trato respiratório superior o pneumococo pode secretar diversas enzimas como metaloproteinase de zinco que são capazes de clivar moléculas de IgA para evitar a ativação do complemento. Secreção de toxina citoplasmática, pneumolisina, facilita a colonização do microrganismo, pois se liga ao colesterol da membrana plasmática do hospedeiro, induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, formam poros podendo levar a lise da célula endotelial facilitando a invasão no tecido, além de exibir ação bactericida contra bactérias da microbiota residente essa toxina também impulsiona a transmissão da doença (Brooks e Mias, 2018; Mitchell e Dalziel, 2014; Steel 2013; Zafar et al., 2017; Subramanian et al., 2019).

A produção de uma cápsula polissacarídica que sobrepõe a parede celular é outro fator de patogenicidade extremamente importante para a bactéria. A cápsula é uma estrutura antifagocítica, que evita o aprisionamento da bactéria no muco nasal além de facilitar a adesão e colonização de células epiteliais na nasofaringe (Kadioglu et al., 2008; Jonsson et al., 1985; Weinberger et al., 2009). Com base nesta estrutura e nos sorotipos, dois tipos de vacinas pneumocócicas estão sendo usadas, as vacinas pneumocócicas polissacarídicas não conjugadas e as vacinas polissacarídicas conjugadas. A vacinação infantil foi introduzida em diversos países a fim de ser fornecer um melhor efeito protetor para esse grupo vacinal, resultando em uma redução do número de casos de doença pneumocócica invasiva, mas ao longo do tempo as vacinas reduziram a colonização de alguns sorotipos alvos da vacina em crianças saudáveis. O que possibilitou o aumento de casos de infecção com sorotipos não vacinais (Galanis et al., 2016; Lindstrand et al., 2016; Subramanian et al., 2019).

A produção de adesinas e proteínas de superfície são importantes para a colonização e invasão do tecido hospedeiro. Autolisinas, por exemplo, são proteases que degradam a parede celular. A lise da parede celular bacteriana é muito importante para permitir o crescimento e a divisão celular do microrganismo. O pneumococo pode ainda lisar uma parte da sua parede celular para liberação de toxinas importantes para a sua sobrevivência, como ocorre com a secreção de pneumolisinas (Mitchell et al., 2010). As proteínas de superfície como adesina A de superfície pneumocócica (PsaA), proteína A de ligação à colina (CbpA), proteína A de superfície de pneumococo (PspA) e a proteína C de superfície de pneumococo (PspC) estão intimamente relacionadas à aderência e à colonização do tecido hospedeiro. As neuraminidases são também importantes nesse processo de colonização da bactéria. Na presença de ácido siálico – presente na saliva do hospedeiro- *S. pneumoniae* aumenta a produção de neuraminidases que funcionam como adesinas para a formação de biofilme (Trappetti et al., 2009; Brittan et al., 2012). Já as hialuronidases favorecem a translocação do microrganismo, pois degradam o ácido hialurônico do tecido conjuntivo e da matriz extracelular do hospedeiro. Outra estrutura importante, o *pili*, aumenta a adesão a células epiteliais e aumenta a capacidade de causar uma doença invasiva (Mitchell et al., 2010; Amerighi et al., 2016; Weiser et al., 2018; Subramanian et al., 2019).

A bactéria produz ainda peróxido de hidrogênio (H_2O_2) causando danos ao epitélio ciliado da nasofaringe e tendo efeito microbicida contra microbiota residente desta região. Ademais, em uma ação conjunta com a pneumolisina, *S. pneumoniae* pode induzir a apoptose de células neuronais. O H_2O_2 pode se difundir à membrana celular das células hospedeiras causando danos em estruturas como DNA e mitocôndria acarretando em processo apoptótico destas células (Gough e Cotter., 2011).

Com a colonização bem estabelecida no trato respiratório superior, a bactéria pode chegar ao espaço alveolar e colonizar os pulmões. Assim como na infecção de *Cryptococcus* spp. macrófagos alveolares residentes, células dendríticas, *natural killers* e células epiteliais respiratórias constituem a primeira linha de defesa contra a bactéria. Esse reconhecimento inicial é mediado por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), chamando atenção para os receptores do tipo *Toll* que são capazes de detectar lipoproteínas bacterianas e ácidos nucleicos (Medzhitov et al., 2007; Famà et al., 2020).

A partir deste momento, fatores de transcrição como NF- κ B (fator nuclear κ B) estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 β e IL-8 atuando em conjunto com quimiocinas para recrutamento de neutrófilos (Rijneveld et al., 2001; Saïd-Sadier, Najwane, & David M. Ojcius, 2012). A relação sistema imune-hospedeiro pode apresentar duas faces, de um lado a produção de IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias são importantes para o *clearance* bacteriano e, ao mesmo tempo a produção exacerbada dessas moléculas podem ser prejudiciais ao hospedeiro, já que acarreta em dano tecidual e favorece a disseminação do patógeno (Marriott et al., 2012). Em contrapartida, *S. pneumoniae* pode estimular a secreção de pneumolisinas, o que favorece a ligação dessa enzima ao receptor de manose celular (MRC-1) presentes em macrófagos e em células dendríticas induzindo uma resposta pró-inflamatória mais branda, com níveis menores de secreção de TNF, IL-1 β e IL-12, além de um menor recrutamento de neutrófilos, comprometendo assim a resposta imunológica do hospedeiro (Subramanian et al., 2019) favorecendo assim a colonização desse patógeno. Ou seja, *S. pneumoniae* utiliza diversas vias para se multiplicar e causar doença no hospedeiro humano.

Outra estratégia utilizada pelo pneumococo pode ser observada logo após o influxo de neutrófilos da região pulmonar. A bactéria secreta endonucleases que são capazes de degradar NET (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) evadindo da resposta imune do hospedeiro (Hahn et al., 2013). No geral, a infecção pulmonar causada por *S. pneumoniae* é caracterizada por níveis altos de citocinas pró-inflamatórias e intenso recrutamento de neutrófilos. Neste panorama, a resposta inflamatória exacerbada pode favorecer a expressão de receptor de ativação plaquetária (PAFR) presente em células epiteliais do hospedeiro. *S. pneumoniae* pode se ligar à PARF por meio da adesina fosforilcolina (PCho), invadir o tecido pulmonar e se disseminar para os demais órgãos (Cundell et al., 1995; Grigg, 2012; Shukla et al., 2015).

1.2.2. Infecção cerebral

Os mecanismos pelos quais *S. pneumoniae* chega ao SNC causando meningite ainda não são bem elucidados. Assim como *Cryptococcus* spp, a bactéria faz uso de diversos mecanismos de virulência para penetrar no SNC. Nesse ambiente os

patógenos encontram células do sistema imune inato. A micróglia são células imunocompetentes residentes do SNC e são derivadas de células progenitoras do saco embrionário que migram para o SNC durante a embriogênese. Além da micróglia residente ser imunologicamente competente e portanto, ser umas das primeiras linhas de defesa neste ambiente, leucócitos mononucleares, monócitos e macrófagos são recrutados para o SNC em condições patológicas desempenhando papéis complementares aos da micróglia residente (Glezer et al., 2007; Abbot et al., 2010). *S. pneumoniae* pode secretar PCho que se caracteriza por mimetizar PAF podendo se ligar ao receptor celular PAFR e ser translocada por transcitose mediada por receptor (Ring, Weiser, & Tuomanen, 1998). A proteína de ligação à colina (CbpA), e a neuraminidase A (NanA) bacteriana podem se ligar também ao receptor da laminina (LR do inglês *Laminin Receptor*) e à proteína juncional PECAM-1 e serem transportadas da mesma maneira (Uchiyama et al., 2009). *S. pneumoniae* também pode transpor a BHE liberando pneumolisinas juntamente com a produção de peróxido de hidrogênio, levando à degradação da monocamada endotelial e invasão o SNC por meio da via paracelular (Paton, Andrew, Boulnois, & Mitchell, 1993). Adesinas relacionadas ao *pili* também podem ser secretadas e se ligam à PECAM-1 e ao receptor de poliimmunoglobulina (plgR) ocasionando a adesão e invasão para SNC (Orihuela et al., 2009; Iovino et al., 2017; Le Guennec et al., 2020).

Além disso, a resposta inflamatória, ou seja, a secreção elevada de citocinas pró-inflamatórias como TNF, e o grande influxo de neutrófilos gerado durante a infecção, promovem, em conjunto, alterações na permeabilidade da BHE (Le Guennec et al., 2020). Outra via que pode favorecer a translocação bacteriana para o SNC seria o transporte axonal da bactéria via nervo olfatório, uma vez que, a colonização nasofaríngea facilitaria essa rota (Marra et al., 2001 ; Van Ginkel et al., 2003; Dando et al., 2014).

1.3. Coinfecções

Doenças polimicrobianas podem ser causadas por dois ou mais microrganismos podendo se apresentar de forma sinérgica/concomitante ou sequencial e podem envolver infecções agudas ou crônicas. Essa interação ocorre entre microrganismos de diferentes reinos, gêneros, espécies ou variantes fenotípicas dentro

da mesma espécie. Um exemplo clássico de infecção aguda concomitante é o aumento da susceptibilidade de infecções causadas por bactérias respiratórias durante uma gripe causada pelo *Influenza virus* (Morens et al., 2008; Dhanoa et al., 2011; Pasman et al., 2012; Peltola et al., 2005).

As coinfeções, frequentemente, são causadas por diversos agentes oportunistas e que incluem não apenas os fungos como *C. neoformans*, *C. gattii* e *Candida* spp, mas também bactérias como *Mycobacterium tuberculosis*, vírus como Herpes zoster e protozoários como *Plasmodium* spp. (Bakaletz et al., 2004). Ainda pouco elucidado os mecanismos de coinfeção, acredita-se que em uma infecção secundária, considerando um organismo já debilitado e com o sistema imune já ativado, poderia favorecer a expressão de genes de resistência de um segundo patógeno. Esse ambiente torna-se competitivo entre os microrganismos e sabe-se que interações de *Cn* e *Cg* com seu hospedeiro ou predadores naturais, levam à diversidade e à seleção de fatores de virulência relacionados a sobrevivência desse patógeno em meios competitivos, sendo assim é provável que em um estado de coinfeção tenha-se um agravamento da doença e danos maiores ao paciente (Pasman, et al., 2012; Steenbergen, et al., 2001).

Em situações de doenças polimicrobianas, os microrganismos podem exibir relação de cooperação ou de competitividade, como já descrito por *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Esses dois microrganismos são comensais e comuns na microbiota natural de grande parte da população mundial. Uma pré-infecção causada por *Candida albicans* pode favorecer a penetração de *S. aureus* em tecidos de órgãos internos de pacientes. Já *S. aureus* ao secretar proteases potencializa a formação de adesinas produzidas por *C. albicans* na mucosa do hospedeiro, favorecendo a formação de biofilmes (Peters et al., 2010; Peters et al., 2012). Simultaneamente, *C. albicans* em um modelo de coinfeção *in vivo* com *S. aureus* pode favorecer a multiplicação bacteriana interferindo no sistema *quorum sensing* bacteriano (Todd et al., 2019). Em mais um exemplo, durante a infecção causada por *Influenza virus*, *S. aureus* favorece a disseminação de partículas virais durante a coinfeção e, ao mesmo tempo, *S. aureus* adere com maior facilidade na mucosa da nasofaringe do hospedeiro quando na presença do vírus (Nair et al., 2014).

Oliveira e colaboradores (2017) demonstraram que o *Influenza virus* pode alterar a resposta imune do hospedeiro. O grande influxo de neutrófilos e macrófagos, redução de citocinas pró-inflamatórias e da taxa de fagocitose, aumentaram a morbidade e mortalidade em modelo murino. Essa associação resultou em graves danos aos pulmões e alta carga fúngica no SNC dos animais coinfectados (Oliveira et al., 2017). Já em outro trabalho apresentado recentemente, animais infectados por *Pseudomonas aeruginosa* seguida da infecção por *C. gattii* alterou o perfil de recrutamento de neutrófilo, macrófagos e a produção de espécies reativas de nitrogênio, os animais apresentaram carga fúngica reduzida em órgãos alvo e atraso na transmigração do fungo para o SNC. Ou seja, a infecção prévia de *P. aeruginosa* alterou o curso da criptococose em modelo murino (Peres-Emídio, 2020).

Há também diversos relatos de caso na literatura no qual *Cryptococcus* spp e *S. pneumoniae* causam doenças graves e levam indivíduos à morte. Em 1998, relato de uma paciente africana, de 32 anos, positiva para o vírus HIV, com candidíase oral estava sendo tratada há cinco meses com terapia para tuberculose. O diagnóstico de tuberculose foi baseado em ultrassonografia do pulmão e demonstrou lesões arredondadas múltiplas e granulomatosas. Confusão mental foi observada na paciente e a partir desse sintoma, punção lombar revelou infecção por *S. pneumoniae* e *C. neoformans*. Sugestivamente, a paciente tinha criptococose disseminada que foi diagnosticada erroneamente como tuberculose e no início da meningite foi identificada bactéria *S. pneumoniae* e *C. neoformans*. Após a identificação dos dois patógenos a paciente veio a óbito, limitando maiores estudos a respeito dessa interação (John, 1998).

Em 2006, autores relataram um caso de coinfecção envolvendo três microrganismos: *S. pneumoniae*, *C. neoformans* e HIV. Paciente do sexo masculino de 34 anos com descendência africana foi submetido a exames clínicos que possibilitaram a identificação de cocos Gram-positivo dispostos em cadeias coletados do líquido cefalorraquidiano. *S. pneumoniae*, inicialmente, foi a causa da meningite bacteriana observada. No segundo dia de internação, o paciente foi diagnosticado como portador do vírus HIV. E no terceiro dia, com a coleta e análise do lavado broncoalveolar confirmou-se a presença de *C. neoformans* (Nadaud et al., 2007). Já em 2015 foi publicado o relato de um paciente do sexo masculino, afegão, residente no Quetta,

Paquistão, que após sofrer um acidente de carro retornou ao hospital com sintomas de dor de cabeça, enrijecimento da nuca, febre, e secreção pelas narinas. Após punção lombar identificou-se *C. neoformans* por meio da leitura de lâmina microscópica utilizando Tinta Nanquim, e teste de urease positiva. Por meio da coloração de Gram, a morfologia sugeria a presença de *S. pneumoniae*. Nesse paciente o estado imunológico não foi avaliado, não podendo ser afirmado positividade para HIV como nos outros casos citados acima (Saleem et al., 2015).

Inúmeros são os casos de microrganismos colonizando o hospedeiro simultaneamente e causando sérios danos à saúde do ser humano. Torna-se então muito importante compreender a interação desses patógenos, pois tais estudos podem contribuir para investigações futuras, com o intuito de aprimorar o diagnóstico e o tratamento dessas doenças.

2. JUSTIFICATIVA

A criptococose, uma micose granulomatosa, que afeta indivíduos imunocomprometidos e saudáveis e pode causar desde uma simples pneumonia até uma meningoencefalite grave. Dados epidemiológicos apontam que apesar de negligenciada, a doença possui altos índices de mortalidade em todo o mundo. Com distribuição mundial, *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam diversos mecanismos que viabilizam a transmissão, sobrevivência e o sucesso da infecção dentro de seu hospedeiro. Secreção de enzimas, expressão de uma cápsula polissacarídica complexa, melanização e alterações morfológicas são alguns desses mecanismos usados por esse patógeno para o sucesso da infecção. No início da infecção pulmonar, a doença pode ser controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Porém, esgotadas as possibilidades de defesa do indivíduo, essa levedura pode alcançar o SNC, causar uma meningoencefalite grave e ocasionar a morte do hospedeiro.

Já *S. pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva que coloniza a mucosa da nasofaringe de crianças e indivíduos adultos. A bactéria pode desenvolver uma relação de comensalismo com o seu hospedeiro. Porém pode estar associada a diversos casos de otite média, sinusite, pneumonia adquirida na comunidade e meningite, sendo responsável por milhares de mortes anuais em todo o mundo. *S. pneumoniae* apresenta diversos fatores de virulência que proporcionam ao patógeno uma disputa constante contra o sistema imunológico para invadir e colonizar órgãos vitais do hospedeiro. Dentre eles destaca-se cápsula polissacarídica, secreção de enzimas, peróxido de hidrogênio entre outros.

Doenças polimicrobianas ou coinfeções podem ser causadas por dois ou mais microrganismos podendo se apresentar de forma sinérgica/concomitante ou sequencial. Elas são frequentes na comunidade, mas ainda pouco estudadas. Essa interação pode ocorrer entre microrganismos de diferentes reinos, gêneros, espécies ou variantes fenotípicas dentro da mesma espécie. Ambos os microrganismos, *C. gattii* e *S. pneumoniae* compartilham o mesmo sítio de infecção: pulmão e cérebro. Em 2008, a OMS estimou que mais de 400.000 crianças menores de cinco anos vieram a óbito em decorrência de infecções pneumocócicas. Além disso a infecção prévia pelo vírus HIV aumenta as chances de ocorrência de doenças pneumocócicas invasivas. Assim

como *S. pneumoniae*, a infecção causada por *Cryptococcus* spp apresentam índices elevados de mortalidade, em especial, nos indivíduos portadores de HIV. O pneumococo é frequente na comunidade, pacientes portadores de HIV, população em que a criptococose também ocorre em uma frequência elevada, pode ser colonizado por dois ou mais microrganismos simultaneamente. Casos na literatura demonstraram que as coinfeções podem se tornar uma associação perigosa causando grandes prejuízos a esses pacientes e aos demais, principalmente, entre *C. gattii* e *S. pneumoniae* causando danos ao SNC.

Dessa forma, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar a interação entre esses dois microrganismos em modelo murino. Avaliar o processo inflamatório da doença e quais mecanismos são utilizados para que ambos possam invadir o tecido pulmonar e alcançar o SNC é de grande valia para que se possa compreender a influência de um determinado patógeno pode exercer no hospedeiro na presença de outro.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a interação entre *Cryptococcus gattii* (Cg) e *Streptococcus pneumoniae* (Sp) em modelo murino.

3.2. Específicos

- Estabelecer um modelo experimental para testes *in vivo* de coinfeção entre a bactéria *S. pneumoniae* e o fungo *C. gattii*, de modo a:
 1. selecionar um inóculo não letal de *S.pneumoniae* que possibilite a avaliação da coinfeção com *C.gattii*.
 2. avaliar o *clearance* bacteriano em animais mono infectados;
 3. selecionar os tempos ideais de infecção de *S. pneumoniae* em relação à infecção por infecção por *C. gattii*.

- Avaliar a coinfeção desses dois microrganismos em modelo murino, de forma a determinar:
 1. a sobrevivência dos animais;
 2. alterações comportamentais (protocolo SHIRPA);
 3. quantificação da carga fúngica e bacteriana em órgãos alvos;
 4. avaliação do dano tecidual nos pulmões;
 5. avaliação da resposta inflamatória via lavado broncoalveolar e quantificação de citocinas;
 6. identificação do perfil celular nos pulmões e no lavado broncoalveolar;
 7. avaliação da expressão de PARF.

4. METODOLOGIA

4.1. Cinética de infecção

4.1.1. Microrganismos

Para realização das análises, a amostra clínica de *C. gatti* (linhagem L27/01) pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia – ICB-UFMG, foi cultivada em meio ASD (Ágar Sabouraud Dextrose – Difco) a 37°C durante 48 horas e estocadas a 4°C.

Quanto à *S. pneumoniae* foi utilizada a linhagem ATCC® 6303™, sorotipo 3, armazenada em freezer -80°C. O cultivo da bactéria se deu em meio Todd-Hewitt (Acumedia) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado por 12 horas em estufa de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

4.1.2. Animais experimentais

Para todos os experimentos foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 de cinco a seis semanas de nascimento e peso corporal aproximado de 23g. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO), água e ração foram fornecidos *ad libitum* e os ciclos claro/escuro foram mantidos. Previamente a cada ensaio, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com solução de quetamina (80mg/Kg) e xilazina (15mg/Kg) diluídas em PBS (Phosphate Buffer Saline -137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) sob autorização protocolo n° 313/2016.

4.1.3. Preparo do inóculo e infecção intratraqueal por *C. gattii*

Colônias crescidas por 48 horas a 37°C em ASD foram suspensas em PBS 1x homogeneizadas e a contagem das células foi ajustada em Câmara de Neubauer (NEW OPTIK) e a concentração de células viáveis foi obtida após a coloração de Azul de Tripán (Trypan Blue- Sigma Aldrich).

Neste trabalho foi utilizado o modelo de infecção intratraqueal desenvolvido no Laboratório de Micologia (UFMG) (Santos et al., 2014). Uma vez anestesiados, foi feita antissepsia do local da incisão com etanol 70%. Inicialmente, foi realizada 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 tireoide foram afastados usando uma pinça para exposição da traqueia. Para a inoculação utilizou-se micro seringa de 100 µL (Hamilton) carregada com 30 µL de uma suspensão fúngica contendo 1×10^4 leveduras viáveis de *C. gattii*. Animais controles receberam 30 µL de PBS. Após inoculação, a pele foi suturada usando *nylon* 4-0 (BRASUTURE) e os animais foram acompanhados até completa recuperação.

4.1.4. Infecção intranasal por *S. pneumoniae*

Conforme proposto por Tavares e colaboradores (2016), no dia anterior à infecção intranasal *Sp* foi plaqueado em meio Todd-Hewitt suplementado com sangue, como descrito anteriormente, e incubada por 12 horas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida as bactérias foram colocadas em 10 ml de caldo Todd-Hewitt e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ até que fosse atingida a fase exponencial de crescimento - densidade óptica (D.O.) de 0.4 (600 nm). Após centrifugação e duas lavagens com salina 0.9% estéril apirogênica, com o objetivo de se remover o meio de cultura, o *pellet* foi ressuspenso em 1ml de salina. Diluições seriadas foram realizadas para que se obtivesse o inóculo desejado ($10^3 - 10^7$) em 30 µL de solução (Tavares et al., 2016). Para todos os experimentos os inóculos foram confirmados por plaqueamento da suspensão bacteriana. Os animais foram infectados de forma intranasal, após anestesia e animais controles receberam 30 µL de PBS.

4.1.5. Padronização do inóculo de *S. pneumoniae*

Inicialmente, foi avaliada a sobrevivência dos animais infectados com diferentes inóculos bacterianos para que fosse possível estabelecer um inóculo não letal que permitisse avaliar influência da infecção bacteriana na criptococose causada por *C. gattii*. Os animais foram anestesiados e infectados com os seguintes inóculos de *Sp*: 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 UFC de bactéria.

4.1.6. Clearance bacteriano

Após a determinação do inóculo ideal (não letal). Animais foram infectados com 1×10^3 UFC de bactéria e os animais foram eutanasiados para a quantificação de UFC após quatro, sete, dez e quinze dias de infecção com *Sp*. Os animais foram anestesiados, eutanasiados e os órgãos, pulmão e cérebro, foram coletados, pesados e macerados em 1 ml de PBS. Foram plaqueados 50 μ L de homogenato de órgãos em Todd Hewitt suplementado com sangue, as placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 12 horas, para posterior contagem e confirmação microscópica das colônias bacterianas.

4.1.7. Padronização do modelo murino de coinfeção

Padronizado o inóculo não letal de *Sp*, uma nova curva de sobrevivência foi realizada para se estabelecer o melhor modelo de infecção dos animais com os dois patógenos. Sendo assim, animais foram infectados com *Sp* sete e quatro dias antes da infecção de *Cg* e sete e quatro dias depois da infecção fúngica, conforme esquema a seguir.



Figura 3. Esquema dos modelos de coinfeção testados no trabalho. Considera-se o tempo de infecção por *Cg* (Dia 0). Os sinais (-) demonstram que a infecção por *Sp* foi feita anteriormente à infecção por *Cg*. Os sinais (+) sinalizam que a infecção por *Sp* foi feita posteriormente à infecção por *Cg*. Já os números 4 e 7 apontam a quantidade de dias em relação ao dia 0 (infecção por *Cg*).

Os camundongos foram monitorados, diariamente, quanto à sobrevivência, perda de peso e alteração de comportamento por meio do protocolo SHIRPA.

4.1.8. Protocolo SHIRPA

Durante a análise de sobrevivência, a morbidade foi estudada pela determinação do perfil comportamental dos animais utilizando-se o protocolo SHIRPA (Smith Kline/ Harwell/ Imperial College/ Royal Hospital/ Phenotype Assessment- SHIRPA). O teste é composto por três etapas nas quais são avaliadas, respectivamente, perfil comportamental e funcional, análise patológica (manifestações gerais) e análise de disfunção neurológica (Rogers et al., 1997). Para a análise observacional três categorias funcionais foram utilizadas, sendo elas: estado neuropsiquiátrico, comportamento motor e função autônoma. O protocolo baseia-se em testes individuais que fornecem dados quantitativos por meio de escore sobre o desempenho funcional dos animais. Esse desempenho é comparado entre os animais e ao longo do tempo entre os grupos. Conforme descrito por Lackner et al. (2006), em cada categoria foram observados os parâmetros descritos na tabela 1.

<i>Categoria funcional</i>	<i>Parâmetros</i>
Estado neuropsiquiátrico	Atividade espontânea.
Comportamento motor	Posição corporal, tremor, ambulação, elevação pélvica, encurvamento de tronco.
Função autônoma	Micção, defecação, taxa de respiração, piloereção, cor da pele, batimentos cardíacos.

Tabela 1. Protocolo SHIRPA. Parâmetros utilizados para avaliação das categorias funcionais.

4.1.9. Determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Baseado nos resultados obtidos nos estudos de tempo de sobrevivência e progressão da doença, novos grupos de animais (n=6) foram infectados por *Sp* quatro

dias depois da infecção por *Cg* e eutanasiados para determinação da carga microbiana em diversos órgãos. Os grupos analisados e a dinâmica de infecção foram:

Grupo 1 *Cg*= Animais monoinfectados com *C. gattii*

Grupo 2 *Cg+Sp*= Animais coinfectados

Grupo 3 *Sp*= Animais monoinfectados com *S. pneumoniae*

Grupo 4 *Ni*= Animais não infectados

O esquema a seguir ilustra a sequência de infecções dos animais e o momento da eutanásia.

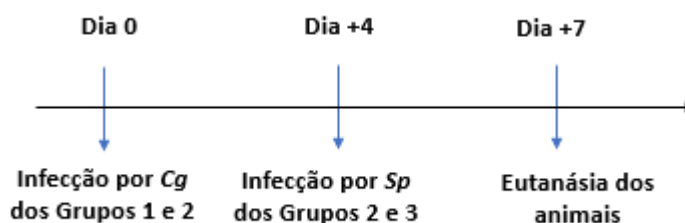


Figura 4. Esquema representativo da dinâmica de coinfeção utilizada no trabalho. Os animais do grupo 1 e 2 receberam carga fúngica (dia 0). Quatro dias após a infecção por *Cg* o grupo coinfectado (grupo 2) e o grupo monoinfectado por *Sp* (grupo 3) receberam carga bacteriana. No sétimo dia após a infecção por *Cg* e terceiro dia após a infecção por *Sp*, todos os animais foram eutanasiados.

No sétimo dia de infecção por *Cg* os órgãos foram removidos, cirurgicamente, pesados e triturados em 1 ml de PBS. O volume de 50µL de cada homogenato dos órgãos e do lavado broncoalveolar (LBA) foi plaqueado para crescimento fúngico, em duplicata, em ASD suplementado com penicilina/estreptomicina (100UI / ml) e cloranfenicol (0,1mg / ml), as placas foram mantidas em estufa a 37°C por 48 horas. A confirmação da presença da levedura foi realizada por microscopia óptica utilizando tinta nanquim e as colônias foram contabilizadas opticamente. Já para a quantificação da carga bacteriana, 50 µL do mesmo homogenato foi plaqueado em Todd Hewitt suplementado com 5% de sangue mais fluconazol (8µg / ml), as placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 12 horas. As colônias foram contabilizadas opticamente, observando aspectos da colônia. *S. pneumoniae* quando cultivada em ágar sangue forma colônias com halo esverdeado resultante da capacidade da bactéria em realizar hemólise parcial do sangue

produzindo bilirrubina e biliverdina (α hemólise). A confirmação da presença da bactéria foi feita pelo método de Gram e analisada em microscópio óptico. Os dados foram expressos em quantidade de UFC/g de órgãos e UFC/ml de lavado. Os órgãos analisados foram: pulmão, fígado, baço e cérebro.

Também foi quantificado UFC em animais infectados apenas com *Cg* e eutanasiados quatro dias após a infecção. Para este ensaio os grupos foram de animais Ni (animais não infectados) e *Cg* 4dias. Os órgãos foram removidos, cirurgicamente, pesados e triturados em PBS, conforme metodologia citada acima. O volume de 50 μ L de cada homogenato dos órgãos e do lavado broncoalveolar foram plaqueados para crescimento fúngico, em duplicata, em ASD suplementado com cloranfenicol (0,1mg / ml), as placas foram mantidas em estufa a 37°C por 48 horas. A confirmação da presença da levedura foi realizada por microscopia utilizando tinta nanquim e as colônias foram contabilizadas opticamente.

4.2. Marcadores inflamatórios

4.2.1. Contagem total e diferencial de leucócitos

Para a contagem total e contagem diferencial de leucócitos, mononucleares e polimorfonucleares, o LBA do ensaio anterior 4.1.9 foi centrifugado a 1200 rotações por minuto (rpm), a 4°C, por 5 minutos, e o *pellet* celular resultante foi suspenso em 100 μ L de BSA (Albumina de soro bovino) 3% (Sigma). Para contagem diferencial entre neutrófilos e leucócitos mononucleares, foram confeccionados esfregaços em Cytospin (Thermo), a 450 rpm, por 5 minutos (Maxeiner et al., 2007), que foram coradas com Panótico Rápido (LABORCLIN), conforme protocolo de coloração sugerido pelo fabricante. Para a realização da contagem diferencial de células no aumento de 100 vezes no microscópio óptico. As células foram diferenciadas em mononucleadas e polimorfonucleadas, através de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células em cada contagem.

4.2.2. Processamento dos pulmões para análise de MPO/NAG

Para os ensaios de MPO/NAG e dosagem de citocinas, os pulmões obtidos após sacrifício foram descongelados e homogeneizados em tampão I (0,1M NaCl; 0,02M NaPO₄; 0,015M NaEDTA) pH 4,7 (1mL/100mg), utilizando um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Após centrifugação (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos), descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido a lise hipotônica (0,75 ml de solução 0,2% de NaCl/100 mg de tecido, durante 30 segundos), para o rompimento de hemácias. Decorrido esse tempo, adicionou-se 0,75 ml de solução de NaCl/100mg 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 tubos *ependorfs*, 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 adicionou-se 800 µL de tampão fosfato (0,05 mol/L de Na₃PO₄ e 0,5% (p/v) de hexadecil-trimetil brometo de amônia (HETAB), pH 5,4) e para o ensaio de NAG adicionou-se salina 0.9% com 0,1% v/v de Triton X-100, sendo coletado o sobrenadante. Após novamente homogeneizada, a amostra foi congelada em freezer -80°C para posterior realização de ensaio enzimático MPO/NAG.

4.2.3. Dosagem da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

Para dosagem da enzima mieloperoxidase, a suspensão obtida no processamento dos pulmões foi submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e centrifugadas por 15 minutos 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 se iniciou pela adição de 25 µl de 3,3'-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 espectrofotômetro (450 nm). A curva padrão, que serve para a comparação das absorbâncias observadas, refere-se à densidade óptica resultante da

reação da atividade de MPO de neutrófilos purificados e igualmente processados, obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, após indução com caseína 5%. Os resultados foram expressos como número relativo de neutrófilos por mg de tecido (Russo et al., 2009).

4.2.4. Atividade de *N*-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) nos tecidos infectados

O acúmulo de macrófagos no tecido pulmonar foi avaliado, indiretamente, pelo ensaio de atividade enzimática da *N*-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG). O material congelado no item 4.2.2 foi utilizado para o ensaio de NAG. O sedimento foi suspenso e homogeneizado em 1ml de salina 0.9% com 0,1% v/v de Triton X-100, centrifugado por 10 minutos a 10.000rpm, e o ensaio foi realizado com o sobrenadante coletado. Os níveis de NAG foram determinados pela alteração na densidade ótica (D.O.) durante leitura em espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 400nm utilizando o substrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminidina (SIGMA) e tampão glicina 0,2M (pH 10,6). Os níveis de NAG foram calculados 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 por mg de tecido.

4.2.5. ELISA para quantificação de citocinas

Para dosagem de citocinas nos pulmões, 100 mg 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. Os lavados broncoalveolares obtidos no sacrifício foram centrifugados 1.200rpm por 10 minutos a 4°C, o *pellet* foi coletado para o ensaio de imunofenotipagem celular e o sobrenadante para quantificação de citocinas.

A partir dos sobrenadantes dos LBA e extratos dos pulmões obtidos foi realizado ensaio de ELISA para dosagem citocinas de IL-1 β , TNF, IFN- γ , IL-17, IL-12p70 conforme orientações do fabricante (R&D System), com modificações como segue: foram transferidos 50 μ L/poço do anticorpo de captura (diluído na concentração recomendada pelo fabricante) para uma placa de ELISA (Maxisorp[®], Nunc). A placa foi selada e incubada por 16-18 horas a temperatura ambiente (TA), para que sensibilização ocorresse nesse período. Após desprezar o anticorpo de captura, os poços da placa foram lavados com tampão de lavagem, repetindo o processo no mínimo 3 vezes. Em seguida, foi realizado o bloqueio da reação com 1% de albumina bovina diluída em PBS por 2 horas à temperatura ambiente, de forma que não houvesse ligação inespecífica durante o ensaio. Após desprezar o tampão de bloqueio, os poços foram lavados e a eles acrescentou-se 50 μ L de lavado broncoalveolar (LBA), e material do pulmão processado, seguido de incubação por 2 horas à TA. Os poços foram lavados e o volume de 50 μ L dos anticorpos de detecção biotinizados diluídos foram adicionados, e a placa incubada por 2 horas à TA. A detecção foi realizada pela incubação com estreptavidina-HRP (R&D Systems) que foi diluída e acrescentada em cada poço. Neste momento, a placa foi protegida da luz e incubada durante 20 minutos a TA. Os poços foram lavados e adicionou-se 50 μ L da solução substrato TMB (R&D Systems) a placa foi incubada durante 20-30 minutos a TA. Finalmente, 50 μ L de solução *stop* (H₂SO₄ 1M) foram adicionados a cada poço. Após 15 minutos, foi então realizada a leitura a 490 nm em leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific). A cor obtida pela reação é diretamente proporcional à concentração da citocina na amostra analisada. As absorbâncias obtidas pela leitura foram comparadas a uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de cada citocina analisada, fornecida no *kit*.

4.2.6. Imunofenotipagem celular no lavado broncoalveolar

Além de verificar carga fúngica e bacteriana no lavado broncoalveolar foi realizada também análise do perfil celular por citometria de fluxo. Para tanto, as células obtidas do lavado foram marcadas com diferentes combinações de anticorpos monoclonais fluorescentes (BD Pharmingen) específicos para classificação das populações celulares. Inicialmente, células únicas foram separadas por tamanho e

granulosidade, de modo que eventos muito pequenos foram excluídos e dentro desta população, foram identificados os leucócitos (CD45^{High}). Dentro desta população, inicialmente estabelecemos os eventos Ly6G^{High} e CD11b^{High} como neutrófilos. Dentre os eventos CD45⁺ restantes, a população de macrófagos foi posteriormente diferenciada de acordo com os perfis de expressão CD11b/CD11c e definidas como: macrófagos residentes alveolares (F4/80+CD11c^{High}) e macrófagos intersticiais (F4/80+CD11c^{Low}) (Vago et al., 2015). Em cada uma dessas populações de macrófagos, foram definidas as que são positivas para CD206 (macrófago expressando o fenótipo M2) e que são positivas para MHC-II (macrófagos expressando o fenótipo M1). A citometria de fluxo foi realizada utilizando BD Canto II (BD Biosciences) com FACS Diva Software (BD Biosciences), e a análise foi realizada utilizando FlowJo Software Versão 10 (Tree Star, Inc., EUA). A estratégia utilizada para o *gating* das populações está ilustrada no anexo.

4.2.7. Análise histopatológica

Para análise histopatológica no pulmão, quatro animais por grupo foram infectados, conforme os grupos descritos anteriormente, e eutanasiados no mesmo tempo que o ensaio 4.1.9 quantificação da carga microbiana. Antes da eutanásia, os animais foram devidamente anestesiados e após a perda total dos reflexos, os órgãos foram removidos. Cérebro e pulmão de cada animal foram fixados em formalina tamponada 10% e embebidos em parafina para a realização de secções histológicas (5 µm) que foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE); e posteriormente examinadas ao microscópio óptico para análise e comparação das alterações teciduais resultantes das infecções propostas para cada grupo. O tipo e intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliado, sendo 0= ausente, 1= discreto, 2= moderado ou 3= intenso.

4.3. Expressão do Receptor do Fator de Ativação Plaquetária (PAFR)

4.3.1. Extração de RNA e análise da expressão de PAFR por qPCR

A quantificação da expressão de PAFR foi determinada em fragmentos de pulmão, que foram submetidos à extração de RNA e *qPCR* (PCR quantitativa) para

avaliar a expressão do gene ativador de PAFR. O RNA total foi extraído de 50mg de tecido pulmonar utilizando TRIzol™ Reagent (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante.

Foi obtido o cDNA, utilizando o *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad), seguindo as recomendações do fabricante. A expressão do gene que codifica PAFR foi avaliada por PCR em tempo real (qPCR) utilizando Fast SYBR™ Green (Thermo Fisher Scientific) e *primers* específicos designados como *forward* 5' - CCTCCCACTGTGGATTGTC TACT - 3' e *reverse* 5' - GCCACGTTGCACAGGAAGT - 3'. Os resultados foram analisados seguindo o método 2^{-ddCt} usando o gene18s do rRNA como o gene endógeno normalizador. Os resultados normalizados foram relacionados ao grupo Ni (animais não infectados) (Menezes-Garcia et al., 2014).

4.4. Análise estatística

As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (One Way ANOVA) com pós teste Tukey- múltiplas comparações. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste T de Student / Mann-Whitney test. Para análises histopatológicas foi utilizado análise de variância ANOVA com pós teste de Kruskal Wallis. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0.05$. As curvas de letalidade, construídas no mesmo *software*, foram comparadas utilizando o teste Log-rank. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad PRISM versão 7.0.

5. RESULTADOS

5.1. A infecção secundária de *S. pneumoniae* durante a criptococose aumenta a morbidade e mortalidade dos animais

5.1.1. Padronização do inóculo de *S. pneumoniae*

Com o objetivo padronizar um inóculo bacteriano não letal que permitisse avaliar como a infecção por *S. pneumoniae* interfere na criptococose, os animais foram infectados com cinco inóculos diferentes (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC) e avaliados quanto à letalidade. A sobrevivência é dependente do inóculo administrado nos animais (Figura 5). Os animais infectados com 10^3 UFC apresentaram o percentual 100% de sobrevivência após a infecção bacteriana (Figura 5. A). O inóculo 10^4 levou à morte de 60% dos animais, assim como o inóculo 10^5 . Os grupos infectados com os inóculos de 10^6 e 10^7 apresentaram taxa de sobrevivência de 20% até o quarto dia de infecção.

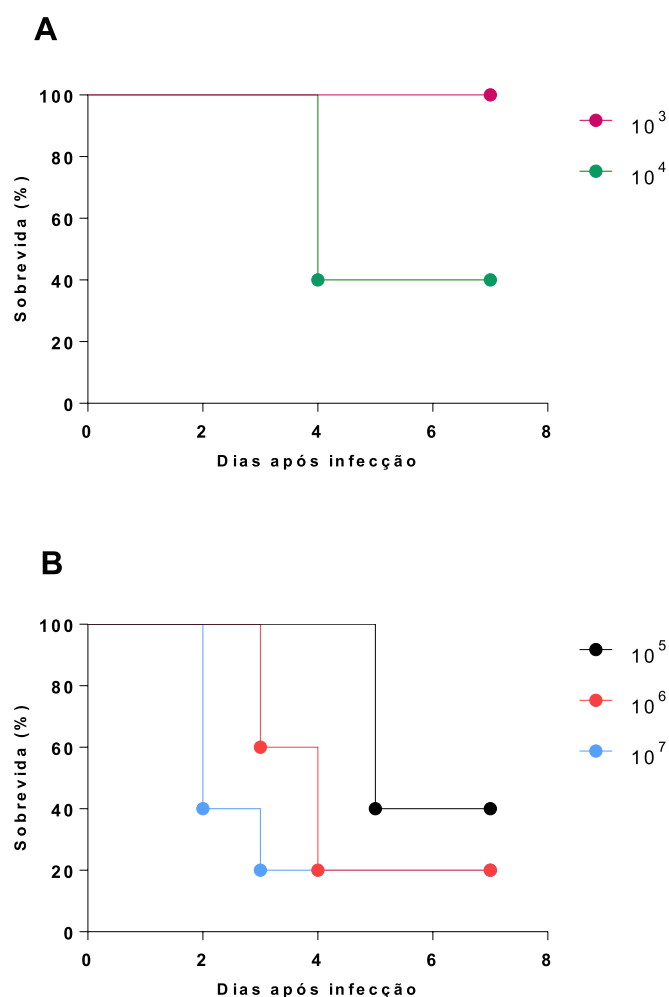


Figura 5. Curva de sobrevida para seleção de inóculo de *Sp* não-letal. Cinco animais C57BL/6 machos por grupo foram infectados via intranasal com diferentes inóculos de *S. pneumoniae*, a sobrevida foi acompanhada diariamente e expressa em porcentagem. (A) Curva de sobrevida de animais infectados com inóculos de 10³ e 10⁴ UFC. (B) Curva de sobrevida de animais infectados com inóculos bacterianos de 10⁵, 10⁶ e 10⁷ UFC. As curvas foram comparadas utilizando o teste Log-rank.

5.1.2. Clearance bacteriano

A fim de se avaliar a eliminação sistêmica da bactéria, os animais foram infectados com a escolha do inóculo no ensaio anterior (10³ UFC) e eutanasiados para a quantificação de UFC no espaço alveolar, pulmão e cérebro. Os animais foram acompanhados e eutanasiados quatro, sete, dez e quinze dias após a infecção bacteriana. Quatro dias após inoculação de 10³ UFC de *Sp*, foi detectada carga

bacteriana em todos os órgãos analisados. Após a chegada ao trato respiratório inferior, a carga bacteriana permaneceu inalterada no espaço alveolar até o último dia analisado (15º dia após inoculação) (Figura 6. A). O mesmo evento foi observado no parênquima pulmonar (Figura 6. B) e, utilizando este inóculo, não foram recuperadas colônias de *Sp* do cérebro a partir do sétimo dia (Figura 6C).

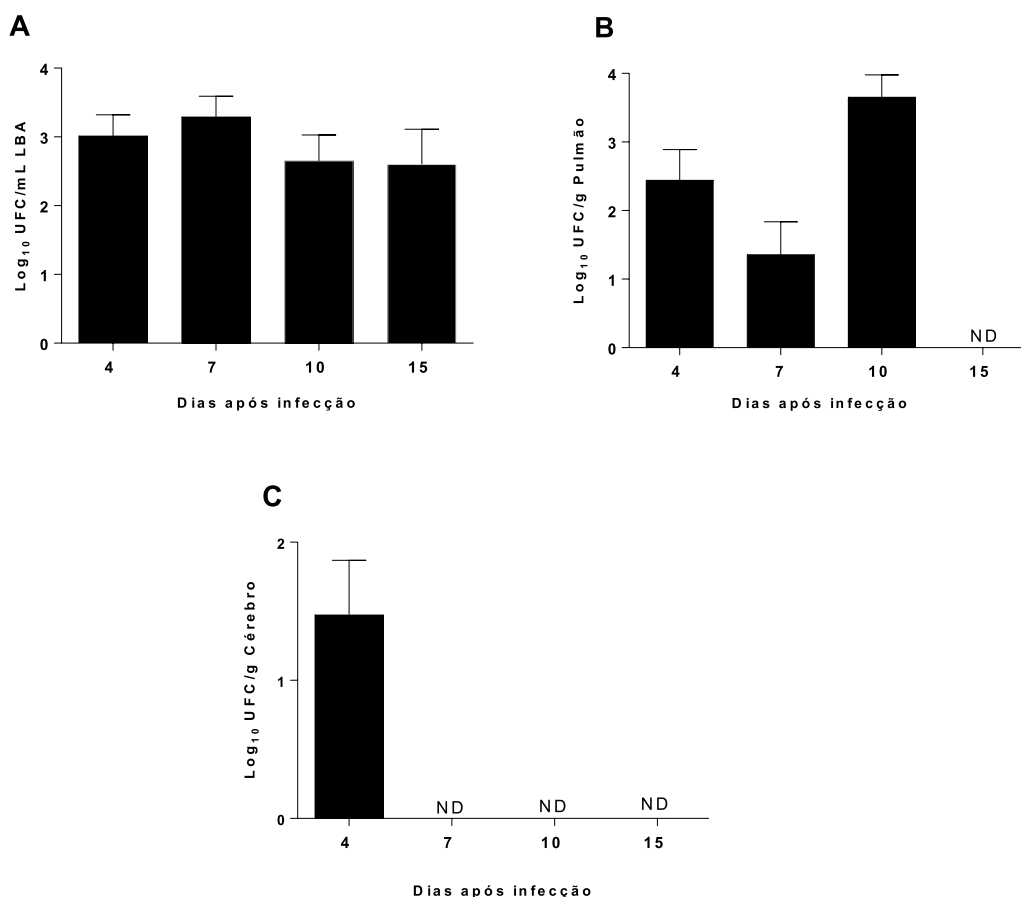


Figura 6. Clearance bacteriano. Cinco animais C57BL/6 machos por grupo foram infectados via intranasal com inóculo de 10^3 UFC de *Sp* para quantificação da carga bacteriana 4, 7, 10 e 15 dias após inoculação. LBA, pulmão e cérebro foram removidos cirurgicamente e em (A) está representada a quantificação de UFC/mL de LBA, em (B) UFC/g de pulmão e em (C) UFC/g de cérebro. Teste utilizado para as análises: ANOVA / Tukey's multiple comparisons test.

5.1.3. Cinética de coinfeção

A curva de sobrevivência apresentada na figura (Figura 7. A) demonstra, com exceção dos animais monoinfectados com 10^3 UFC de *Sp* e animais não infectados (Ni), 100% dos animais dos demais grupos sucumbiram à infecção causada por *Cg*,

Sp e coinfectados por *Cg* e *Sp*. A letalidade de 100% do grupo infectado com a bactéria sete dias antes da infecção fúngica foi alcançada no vigésimo primeiro dia após a infecção, ocorrendo mais tardiamente quando comparada ao grupo *Cg*. Para o grupo de animais infectado por *Sp* quatro dias antes da infecção fúngica, 100% dos animais vieram a óbito no vigésimo terceiro dia após a coinfecção. A infecção secundária por *Sp*, ou seja, os animais infectados com a bactéria quatro e sete dias depois da infecção por *C. gattii*, leva à morte de 100% dos animais até o décimo segundo dia de coinfecção. A letalidade nesses dois grupos é significativamente ($p < 0,05$) mais acentuada em relação ao grupo monoinfectado por *Cg*.

Em relação à perda de peso, representada na figura 7. B, os grupos coinfectados, com exceção do grupo (*Cg+Sp +4d*), perderam peso ao longo do tempo, assim como o grupo monoinfectado por *Cg*. Esse último apresentou queda de 24% do seu peso até o décimo sétimo dia de infecção, enquanto que os grupos que receberam bactéria sete dias e quatro dias antes do inóculo fúngico perderam 23%, 18% do seu peso inicial, respectivamente. Já os animais do grupo infectado por *Cg* e em seguida por *Sp* com o intervalo de sete dias (*Cg+Sp +7d*) perderam 17% do peso inicial, até o décimo dia de infecção. Os animais do grupo infectado por *Cg* e quatro dias depois coinfectados por *Sp* (*Cg+Sp +4d*) não foi possível observar perda de peso, pois eles apresentaram sinais clínicos graves rapidamente, levando os animais ao óbito a partir do quinto dia após a coinfecção.

Os resultados apresentados são indicativos de comorbidade nos animais, mais precisamente naqueles grupos que receberam uma infecção primária por *Cg* seguida da infecção por *Sp* com o intervalo de quatro dias. Neste grupo a letalidade de 100% dos animais foi observada em um menor tempo.

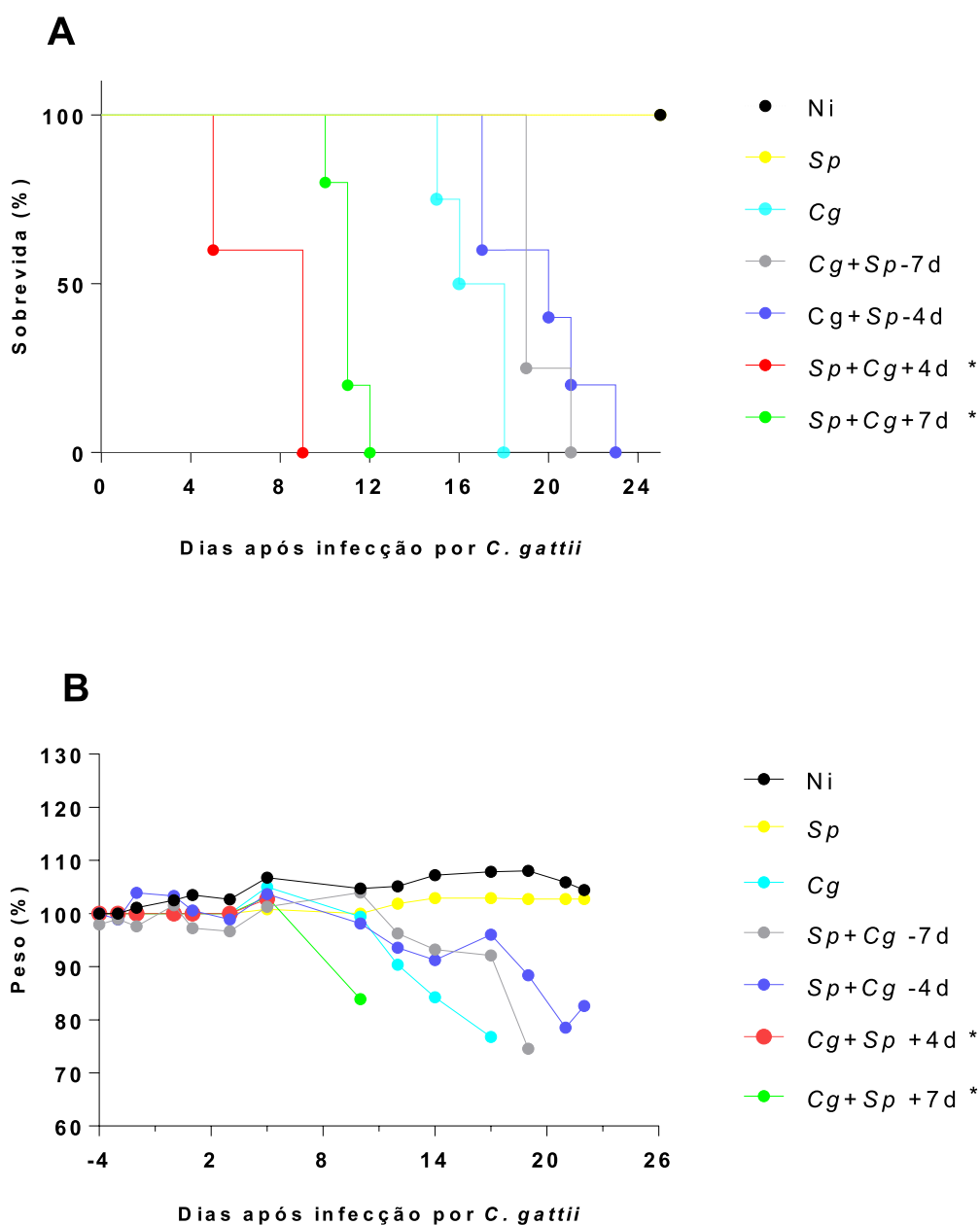


Figura 7. Cinética de coinfeção. Seis animais C57BL/6 machos por grupo foram monoinfectados por *Cg*, *Sp* ou coinfectados por *Cg* e *Sp*. A sobrevivência e o peso foram acompanhados diariamente e os dados foram expressos em percentual de sobrevivência (A) e percentual de perda de peso (B). Nota: Ni (animais não infectados), *Sp* (animais infectados por *Sp*), *Cg* (animais infectados por *Cg*), *Sp+Cg-7d* (animais infectados por *Sp* sete dias antes à infecção por *Cg*), *Sp+Cg-4d* (animais infectados por *Sp* quatro dias antes à infecção por *Cg*), *Cg+Sp+4d* (animais infectados por *Sp* quatro dias depois da infecção por *Cg*), *Cg+Sp+7d* (animais infectados por *Sp* sete dias depois da infecção por *Cg*). A curva de sobrevivência foi comparada utilizando o teste Log-rank. Para análise do gráfico de peso foi realizado cálculo de área sob a curva e ANOVA / Tukey's multiple comparisons test. * diferença estatística em relação ao grupo *Cg*.

5.1.4. Análise comportamental e funcional dos animais

Para avaliação comportamental e funcional, desses animais, foi aplicado o protocolo SHIRPA. O protocolo baseia-se em testes individuais que fornecem dados quantitativos por meio de escore sobre o desempenho funcional dos animais. Esse desempenho é comparado entre os animais e ao longo do tempo entre os grupos. Os animais não infectados obtiveram escores mais elevados por não apresentarem comorbidades. Os animais infectados por *Sp* com o inóculo 10^3 apresentaram o mesmo desempenho do que os animais Ni. Animais infectados por *Sp* quatro dias depois da infecção fúngica, apresentaram maior queda de escore em menor tempo nos parâmetros analisados: comportamento motor (Figura 8. A), estado neuropsiquiátrico (Figura 8. B) e função autônoma (8. C) em relação ao grupo *Cg* ($p < 0,05$). Os grupos de animais infectados por *Sp* e em seguida por *Cg* (*Sp+Cg-7d*; *Sp+Cg-4d*) e os animais infectados por *Cg* seguido da infecção por *Sp* com intervalo de 7 dias (*Cg+Sp+7d*) apresentaram queda no escore nos três parâmetros analisados, porém em maior tempo. Dessa forma o grupo, coinfestado primeiramente por *Cg* e em seguida por *Sp* com 4 dias de intervalo (vermelho), foi selecionado como modelo para as demais análises.

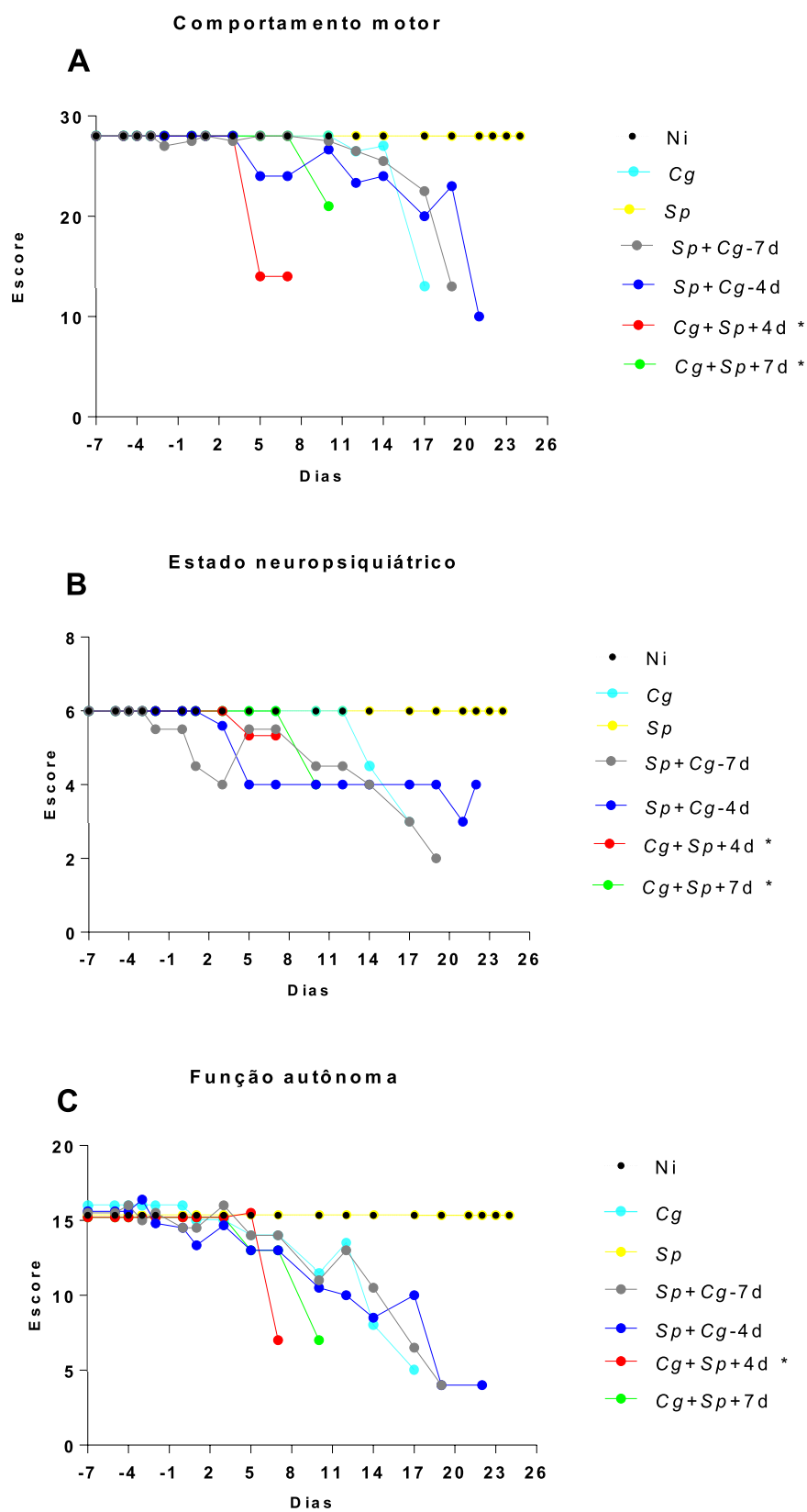


Figura 8. Análise comportamental. Seis animais C57BL/6 machos por grupo foram mono infectados com *Cg*, *Sp* ou co infectados com *Cg* e *Sp* e analisados quanto a morbidade utilizando parâmetros

comportamento motor (A), estado neuropsiquiátrico (B) e função autônoma (C) do Protocolo SHIRPA. Nota: Ni (animais não infectados), Sp (animais monoinfectados por Sp), Cg (animais monoinfectados infectados por Cg), Sp+Cg-7d (animais infectados por Sp sete dias antes à infecção de Cg), Sp+Cg-4d (animais infectados por Sp quatro dias antes à infecção de Cg), Cg+Sp+4d (animais infectados com Sp quatro dias depois da infecção por Cg) e por último o grupo Cg+Sp+7d (animais infectados com Sp sete dias depois da infecção por Cg). Para as análises dos gráficos acima foram realizados cálculo de área sob a curva e ANOVA / Tukey's multiple comparisons test. * diferença estatística em relação ao grupo Cg.

Além dos resultados aqui demonstrados: sobrevida, peso, SHIRPA, durante os ensaios, os animais coinfectados apresentaram sinais clínicos sugestivo de conjuntivite bacteriana causada por *S. pneumoniae* explicitando a morbidade desses animais (Figura 9).

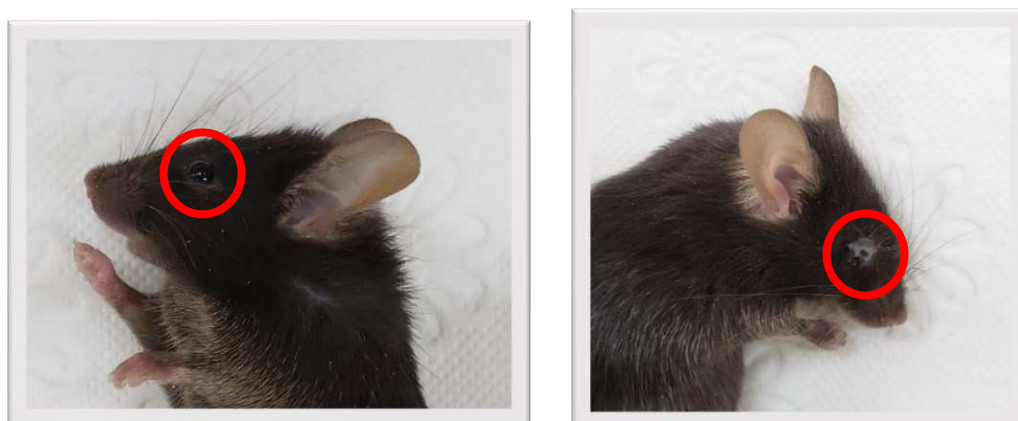


Figura 9. Animais C57BL6 com quadro clínico de conjuntivite. Foto tirada dos animais não infectados (Ni) à esquerda e animais coinfectados à direita. Durante a execução dos ensaios os animais apresentavam sinais clínicos visíveis, sugestivos de conjuntivite bacteriana.

5.2. A coinfeção altera o curso da criptococose causada por *C. gattii* e acentua o quadro de infecção bacteriana.

5.2.1. Quantificação da carga microbiana

Quantificamos a carga fúngica nos animais monoinfectados por *Cg* quatro dias após a infecção. Para isso, um novo grupo de animais recebeu inóculo fúngico e foi eutanasiado no mesmo dia em que um possível grupo infectado por *Cg* receberia o inóculo bacteriano.

No quarto dia de infecção por *Cg*, os animais já apresentaram carga fúngica em todos os órgãos avaliados, e migração do fungo para o SNC, com exceção do baço (Figura 10), confirmando a infecção. A carga fúngica no LBA foi de aproximadamente 10^4 UFC/mL, já no pulmão foi de 10^5 UFC/mL, ou seja, a carga fúngica no parênquima pulmonar é maior do que a do LBA ($p < 0,05$). Com diferenças significativas, a carga fúngica no pulmão foi maior quando comparado ao fígado, ao baço e ao cérebro ($p < 0,05$). Este último órgão apresentou 10^2 UFC/ml. Não há diferença estatística ente a carga fúngica observada no fígado e no cérebro.

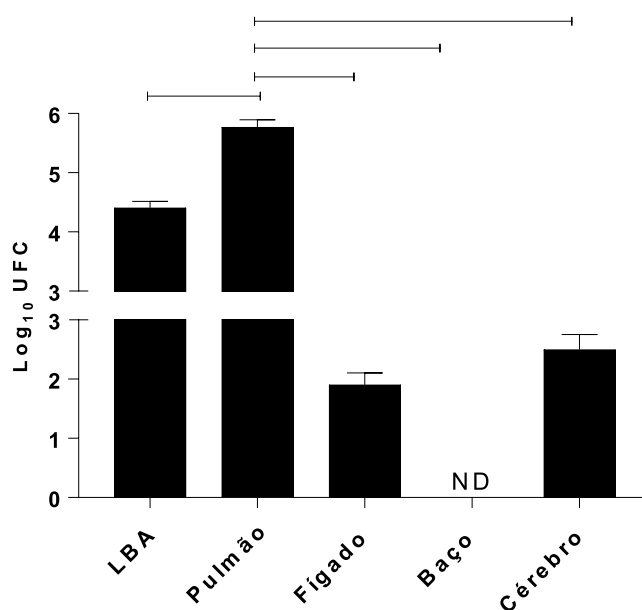


Figura 10. Avaliação da carga fúngica em grupo monoinfectado por *Cg*. Seis animais C57BL/6 machos por grupo foram inoculados por via intratraqueal com 30µL de uma suspensão contendo 1×10^4 *C. gattii*. Após quatro dias de infecção foi quantificada carga fúngica no LBA, pulmão, fígado, baço e cérebro. Os valores foram expressos em Log₁₀ UFC/ml de LBA ou UFC/g de órgão. As barras acima

das colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$). ND: não-detectado. Teste utilizado para as análises ANOVA / *Tukey's multiple comparisons test*.

Estabelecido o melhor protocolo para os estudos de coinfeção, novos animais foram coinfectados para quantificação da carga bacteriana e fúngica no espaço alveolar (LBA), pulmão, fígado, baço e cérebro. Primeiramente os animais foram infectados por *Cg* e quatro dias depois por *Sp*. Os mesmos foram eutanasiados no terceiro dia de coinfeção, pois a curva de sobrevivência apresentada na Figura 7. A demonstra que a partir do quinto dia de coinfeção, há perda de 40% dos animais. Escolhemos então o terceiro dia após a coinfeção para que o número de réplicas não fosse comprometido, além disso, neste dia os animais já apresentavam quadro clínico grave, com piloereção, dificuldade de locomoção e tremor.

No LBA (Figura 11. A) observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) da carga bacteriana no grupo coinfectado em relação ao grupo monoinfectado (barras brancas). No grupo monoinfectado, apenas por *Sp* foi encontrado 10^4 UFC / ml, mas quando observamos o grupo coinfectado, a carga bacteriana aumentou, e, foi encontrado total de 10^6 UFC / ml de fluido alveolar. O mesmo não foi observado com a carga fúngica (barras pretas), pois não houve diferença significativa entre os grupos monoinfectado *Cg* e o coinfectado. No grupo monoinfectado por *Cg* e no grupo coinfectado a carga fúngica encontrada foi de 10^5 UFC / ml. Nesse ensaio, observou-se também que nos grupos monoinfectados, a carga fúngica é significativamente maior do que a carga bacteriana ($p < 0,05$). Ou seja, a carga fúngica (10^5 UFC/mL) é 10 vezes maior do que a bacteriana (10^4 UFC/mL), ($p < 0,05$). O inverso é observado nos grupos coinfectados, enquanto a carga fúngica é similar à aquela encontrada no grupo monoinfectado, a bacteriana, por sua vez, é aproximadamente, 10 vezes maior do que a fúngica no grupo coinfectado ($p < 0,05$).

No pulmão (Figura 11. B), nos grupos monoinfectados, a carga fúngica é significativamente maior do que a carga bacteriana ($p < 0,05$), enquanto no primeiro foi encontrado 10^6 UFC / g, a carga bacteriana foi de aproximadamente 10^5 UFC / g. Assim como observado no LBA, no grupo coinfectado, a carga bacteriana (10^7 UFC / g) superou estatisticamente a fúngica (10^6 UFC / g) ($p < 0,05$). Já em comparação a carga fúngica o grupo coinfectado apresentou menor carga microbiana do que o grupo monoinfectado. O que não foi observado na quantificação bacteriana, os animais

coinfectados apresentaram aumento na carga microbiana ($p < 0,05$). Enquanto que no grupo mono infectado foi observado 10^5 UFC / g de *Sp*, na presença do fungo foi encontrado 10^7 UFC/g de *Sp*.

No fígado (Figura 11. C), nos grupos mono infectados, observou-se 10^1 UFC/g de *Cg* e *Sp* não foi detectado neste órgão. Não foi observado carga bacteriana no grupo mono infectado apenas com *Sp*, o grupo coinfectado apresentou 10^4 UFC/g de bactéria, sendo estatisticamente maior do que o mono infectado ($p < 0,05$). Avaliando a carga fúngica, nos animais infectados apenas por *Cg* foi estatisticamente maior com o grupo coinfectado ($p < 0,05$). Já a carga bacteriana apresentou aumento, no grupo mono infectado não foi detectada bactéria neste órgão, mas na presença do fungo foi encontrado 10^4 UFC/g ($p < 0,05$).

No baço (Figura 11. D) não houve recuperação microbiana nos grupos mono infectados e não houve recuperação fúngica no grupo coinfectado. Observou-se apenas quantificação na carga bacteriana no grupo coinfectado, foi observada diferença estatística entre a recuperação bacteriana no grupo mono infectado e no coinfectado ($p < 0,05$), uma vez que, a bactéria só foi encontrada na presença do fungo.

No cérebro (Figura 11. E), entre os grupos mono infectados, a carga fúngica é maior do que a carga bacteriana, enquanto que no grupo *Cg* foi encontrado 10^2 UFC/g, no grupo *Sp* foi encontrado 10^1 UFC/g ($p < 0,05$). Já nos grupos coinfectados é observado evento inverso, a carga fúngica não foi detectável, já a carga bacteriana foi de aproximadamente 10^3 UFC/g ($p < 0,05$). Comparando a carga bacteriana do grupo mono infectado *Sp* com o coinfectado, observa-se aumento na quantificação desta. Enquanto que nos animais infectados apenas por *Sp* foi recuperado 10 UFC/g na presença do fungo este número sobe para 10^3 UFC/g ($p < 0,05$). Já em relação à carga fúngica, nos grupos mono infectado *Cg* e coinfectado houve diferença significativa, sendo recuperado 10^2 UFC/g de órgão nos animais mono infectados e não sendo recuperado fungo no grupo coinfectado ($p < 0,05$).

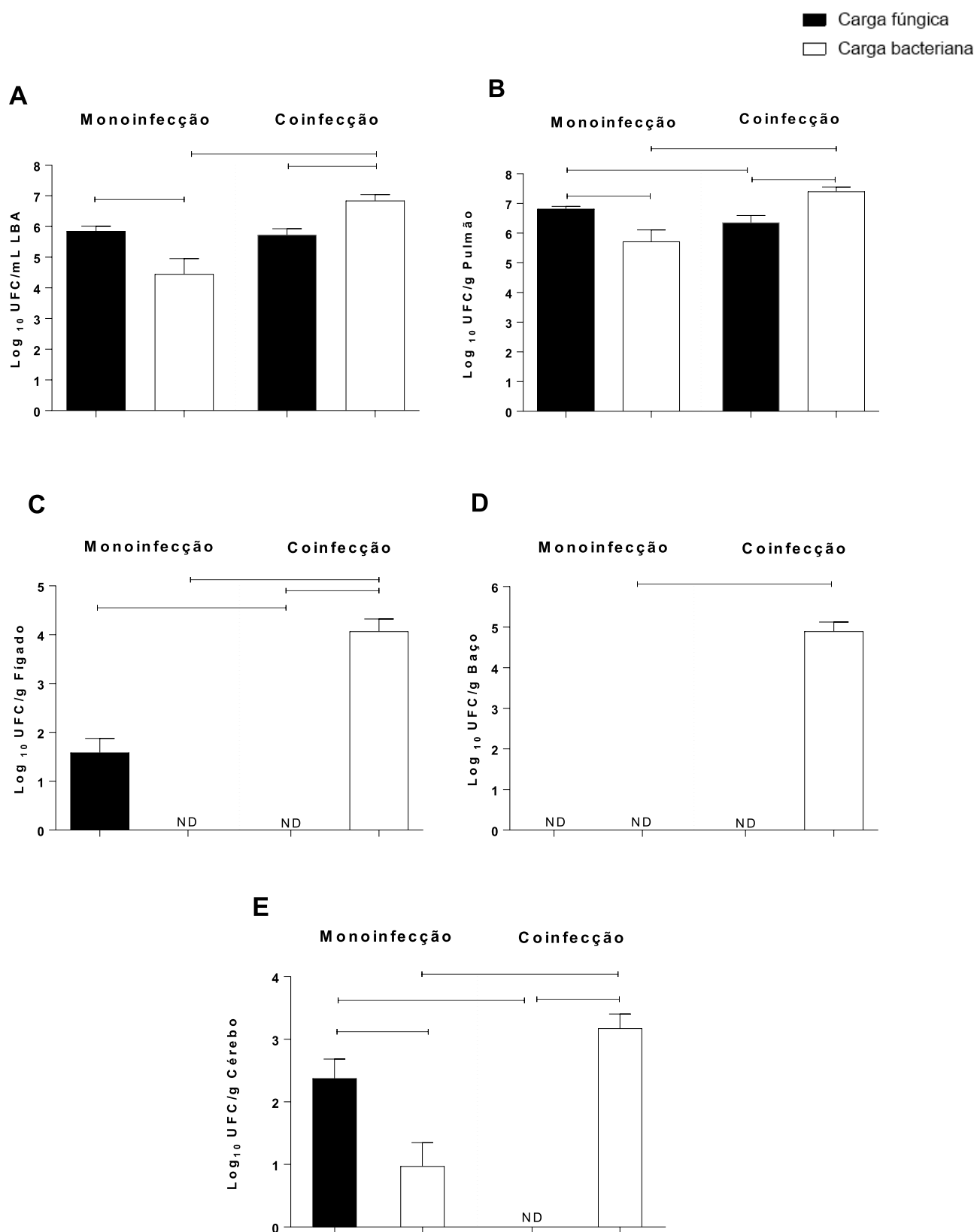


Figura 11. Análise de carga fúngica e bacteriana em grupos mono e coinfecção. Seis animais C57BL/6 machos por grupo foram inoculados por via intratraqueal com 30 μ L de uma suspensão contendo 1×10^4 *C. gattii*. Quatro dias depois os animais foram infectados com uma suspensão de 30 μ L contendo 1×10^3 *S. pneumoniae* via intranasal. Os animais foram eutanasiados no terceiro dia de coinfecção foram obtidos LBA (A), pulmão (B), fígado (C), baço (D) e cérebro (E) para a quantificação da carga microbiana. As colunas em preto representam carga fúngica, colunas brancas representam

carga bacteriana. Os gráficos foram divididos em grupos mono infectados, à esquerda, *Cg* e *Sp*, e grupo co infectado, à direita, *Cg+Sp*. Os valores foram expressos em Log_{10} UFC/g nos gráficos que representam os órgãos: pulmão, fígado, baço e cérebro e para o LBA os valores foram expressos em Log_{10} UFC/ml. ND: não-detectado. As barras acima das colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram feitas usando Test t de Student/ *Mann-Whitney test*.

5.3. Durante a criptococose, a infecção secundária por *S. pneumoniae* altera o recrutamento celular, produção de mediadores inflamatórios e intensifica a resposta inflamatória

5.3.1. Contagem total e diferencial de leucócitos

Os LBA dos animais eutanasiados no ensaio anterior 4.2.1 foram devidamente processados e analisados em microscópio óptico para a obtenção do número total de leucócitos (Figura 12.A) e contagem diferencial (Figura 12.B). O grupo co infectado apresentou maior número de leucócitos no LBA em comparação tanto ao grupo Ni, quanto aos grupos mono infectados *Cg*, *Sp*. Enquanto que nos animais foi encontrado na ordem de 10^6 leucócitos/ml, nos demais grupos foi encontrado 10^5 leucócitos/ml.

A figura 12.B. apresenta as diferenças entre células mononucleadas (MN) e polimorfonucleadas (PMN) dentro dos grupos analisados. Tanto no grupo Ni, *Cg* e *Sp* as células mononucleadas se apresentam em maior quantidade do que as polimorfonucleadas ($p < 0,05$), não houve diferença estatística entre essa população celular do grupo Ni com os demais grupos mono infectados (*Cg* e *Sp*), sendo encontrado aproximadamente, 10^5 células mononucleadas/ml em cada um dos grupos analisados. Ao observar as células polimorfonucleadas nestes mesmos grupos, o grupo Ni apresentou menor quantidade de neutrófilo no LBA. Os grupos *Cg* e *Sp*, para essa mesma população celular, apresentaram 10^5 e 10^4 PMN/ml, respectivamente.

No grupo co infectado este perfil é alterado. A quantidade de células PMN é 10 vezes maior do que a população de células MN ($p < 0,05$). Houve diferença significativa entre a contagem de MN entre os grupos Ni, *Cg*, *Sp* e o grupo *Cg+Sp* ($p < 0,05$), sendo nesse último observada maior quantidade de MN do que nos demais grupos ($p < 0,05$). A população de PMN também foi maior estatisticamente quando

comparada com os grupos Ni, Cg e Sp ($p < 0,05$), atingindo o total aproximado de 10^6 células PMN / ml.

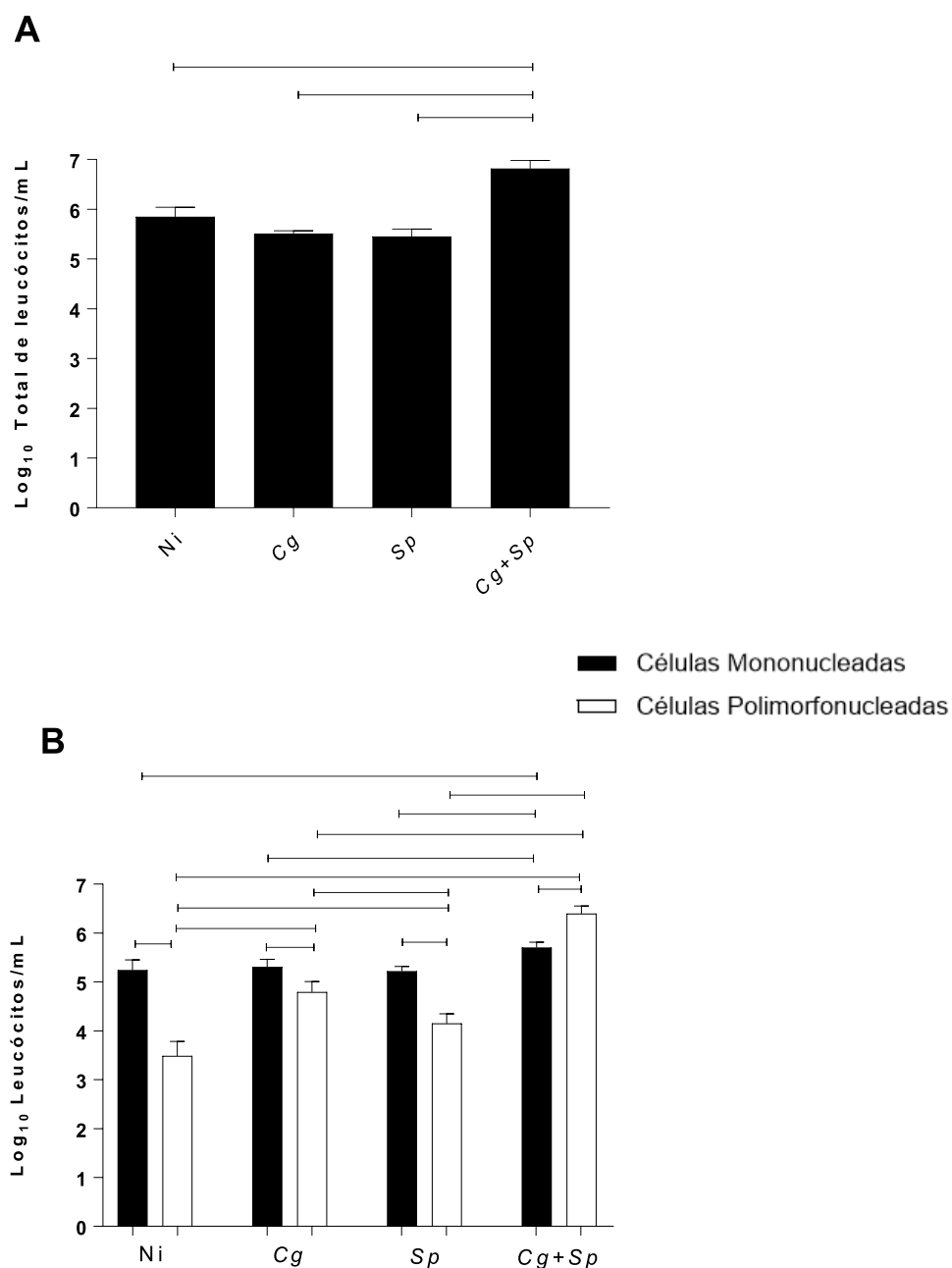


Figura 12. Contagem total e diferencial de leucócitos. Seis animais C57BL/6 machos por grupo foram inoculados por via intratraqueal com 30 μ L de uma suspensão contendo 1×10^4 *C. gattii*. Quatro dias depois os animais foram infectados com uma suspensão de 30 μ L contendo 1×10^3 *S. pneumoniae* via intranasal. Os animais foram eutanasiados no terceiro dia para obtenção do LBA, processamento e contagem total (A) - ANOVA / *Tukey's multiple comparisons test*- e diferencial de leucócitos (B) -T test de *Student*. Ni: não infectado; Cg: animais mono infectados com *C. gattii*; Sp: animais mono infectados com *S. pneumoniae* e o grupo Cg+Sp: animais co infectados com Cg e Sp. As barras acima das colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$). Os dados são expressos em Log₁₀ de leucócitos / mL de LBA.

5.3.2. Ensaio de MPO e NAG

Para análise da resposta inflamatória os níveis de MPO e NAG do pulmão foram quantificados. Dos mesmos grupos de animais analisados anteriormente quanto a contagem de células no LBA, foram obtidos pulmões para processamento (Figura 13). O número relativo de neutrófilos foi medido, indiretamente, pela atividade da enzima MPO (Figura 13. A). O grupo coinfectado apresentou maior número relativo de neutrófilos quando comparado ao grupo Ni. Já em relação aos grupos mono infectados com *Cg* e eutanasiados quatro e sete dias depois desta infecção, houve uma redução do influxo de neutrófilos. O grupo *Cg* 7d apresentou maior número relativo de neutrófilo quando comparada ao grupo *Cg* 4d e ao grupo *Cg* 7d ($p < 0,05$).

O número relativo de macrófagos foi medido, indiretamente, pela atividade de NAG (Figura 13. B). O número de macrófagos foi maior no grupo coinfectado quando comparamos com os demais grupos, Ni, *Cg* 4d, e *Sp* ($p < 0,05$). A quantificação de MPO e NAG, demonstrou que no grupo coinfectado é mais marcante recrutamento de macrófagos do que neutrófilos (Figura 13).

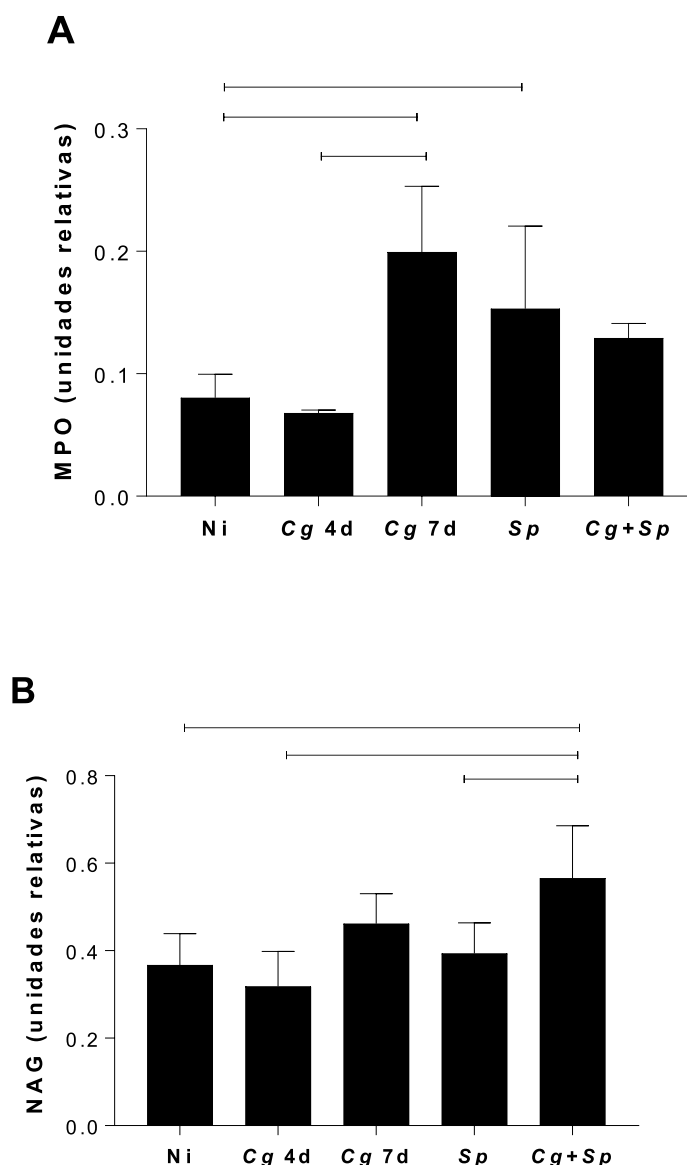


Figura 13. Quantificação de MPO e NAG no parênquima pulmonar. Seis animais C57/BL6 machos por grupo foram inoculados por via intratraqueal com 30 μ L de uma suspensão contendo 1×10^4 UFC de *C. gattii*. Quatro dias depois, os grupos de animais (*Cg+Sp* e *Sp*) foram infectados com uma suspensão de 30 μ L contendo 1×10^3 UFC de *S. pneumoniae* via intranasal. O grupo *Cg 4d* foi eutanasiado quatro dias depois da inoculação fúngica; o grupo monoinfectado *Cg 7d* foi eutanasiado após sete dias da inoculação de *Cg*; e os grupos que receberam inóculo bacteriano foram eutanasiados três dias após a inoculação bacteriana. Os pulmões desses animais foram processados, analisados e quantificada a população de neutrófilos e macrófagos indiretamente, por meio de números relativos das enzimas MPO (A) e NAG (B). As análises estatísticas foram feitas usando ANOVA / *Tukey's multiple comparisons test*. Os dados são expressos em unidades arbitrárias e as barras acima das colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

5.3.3. Quantificação de citocinas no LBA e nos pulmões

Com objetivo de aprofundar o conhecimento sobre resposta inflamatória no modelo de coinfeção foram medidos os níveis das citocinas como IL-1 β , TNF, IFN- γ , IL-17 e IL12p70 tanto em LBA (Figura 14) quanto no parênquima pulmonar (Figura 15). Em linhas gerais, os níveis de todas as citocinas inflamatórias analisadas foram significativamente elevados nos grupos coinfectados em relação aos grupos mono infectados ($p < 0,05$) e ao Ni ($p < 0,05$) no LBA (Figura 14. A).

Na Figura 14.A, a produção da interleucina IL-1 β foi estatisticamente maior no grupo coinfectado do que os grupos mono infectados *Cg* e *Sp* e também no grupo não infectado Ni ($p < 0,05$). O fator de necrose tumoral (TNF) representado na figura 14 B, não foi detectável nos grupos não infectados e nos grupos mono infectados *Cg* e *Sp*, já no grupo coinfectado houve produção dessa citocina, sendo maior neste grupo do que nos demais Ni, *Cg* e *Sp* ($p < 0,05$).

Para IFN- γ (Figura 14.C), houve diferença estatística no grupo coinfectado que apresentou maior produção dessa citocina quando comparado com os grupos não infectado e mono infectado com *Cg* e *Sp* ($p < 0,05$). Na figura 14.D, não foi detectado produção de IL-17 no grupo mono infectado *Cg*, mas houve produção significativa no grupo coinfectado quando comparado ao grupo não infectado e mono infectado com *Sp* ($p < 0,05$).

E, por último, a produção de IL-12p70, no grupo coinfectado aumentou quando comparado com o grupo não infectado, e os mono infectados *Cg* e *Sp*, sendo estatisticamente maior que os demais ($p < 0,05$). Não foram detectados níveis expressivos dessa citocina nos animais não infectados e no mono infectado com *Cg*.

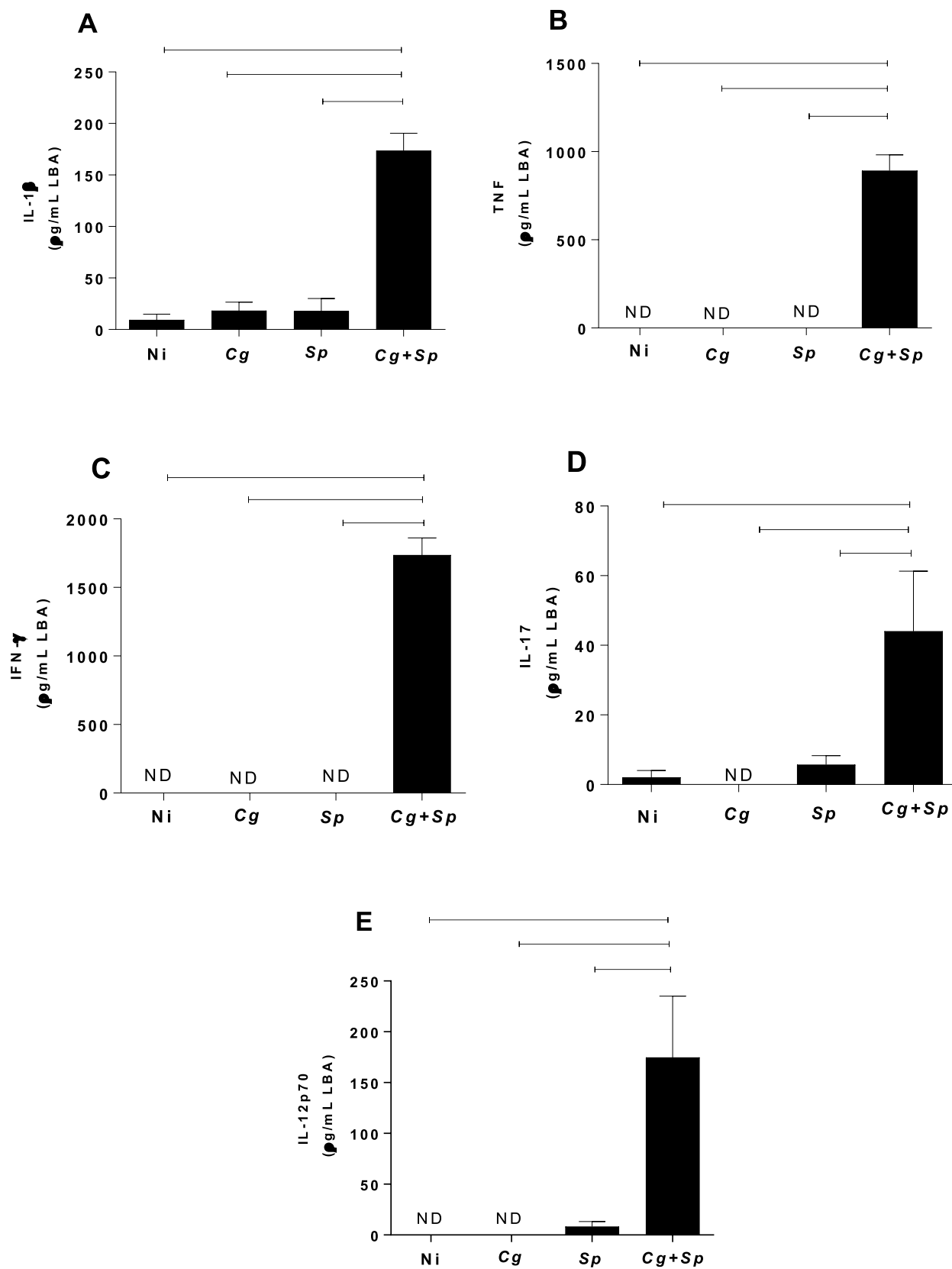


Figura 14. Dosagem de citocinas no LBA. Seis animais C57BL/6 machos por grupo foram inoculados por via intratraqueal com $30\mu\text{L}$ de uma suspensão contendo 1×10^4 UFC de *C. gattii*. Quatro dias depois,

os grupos coinfectados e monoinfectado por *Sp*, foram infectados com uma suspensão de 30 μ L contendo 1×10^3 UFC de *S. pneumoniae* via intranasal. Os animais foram eutanasiados no terceiro dia de coinfecção para obtenção do LBA. O infiltrado alveolar foi preparado para quantificação das citocinas IL-1 β (A), TNF (B), IFN- γ (C), IL-17(D) e IL-12p70 (E). Ni: animais não infectados; *Cg*: animais infectados por *C. gattii*; *Sp*: animais infectados por *S. pneumoniae*; *Cg+Sp*: animais coinfectados conforme cinética descrita acima. Os dados são expressos em pg / mL de LBA e as barras acima das colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram feitas usando ANOVA / *Tukey's multiple comparisons test*.

No parênquima pulmonar, IL-1 β também se apresenta elevada no grupo coinfectado. A produção dessa citocina foi estatisticamente maior neste grupo do que nos demais, não infectado, monoinfectado *Cg* e *Sp* ($p < 0,05$) (Figura 15.A). Não há diferenças significativas na produção de TNF entre os grupos analisados. No grupo não infectado e no monoinfectado *Sp* a produção de TNF foi menor (Figura 15.B).

Na figura 15.C foi expressa a produção de IFN- γ , não houve diferença significativa entre os grupos. No grupo Ni não foi detectado secreção de IFN- γ , no grupo monoinfectado *Cg*, *Sp* e no coinfectado houve produção dessa citocina, sem diferença. O grupo *Cg* apresentou aumento significativo na produção de IL-17 no pulmão quando comparado com o grupo Ni ($p < 0,05$) e com o grupo coinfectado ($p < 0,05$). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos *Sp*, Ni e o grupo coinfectado.

O mesmo acontece quando analisamos IL-12p70. A produção da citocina do grupo monoinfectado *Cg* foi estatisticamente maior quando comparado com os grupos Ni ($p < 0,05$) e coinfectado ($p < 0,05$). Nos grupos Ni, monoinfectado *Sp* e *Cg+Sp*, a produção se equiparou e não houve diferença estatística entre os grupos.

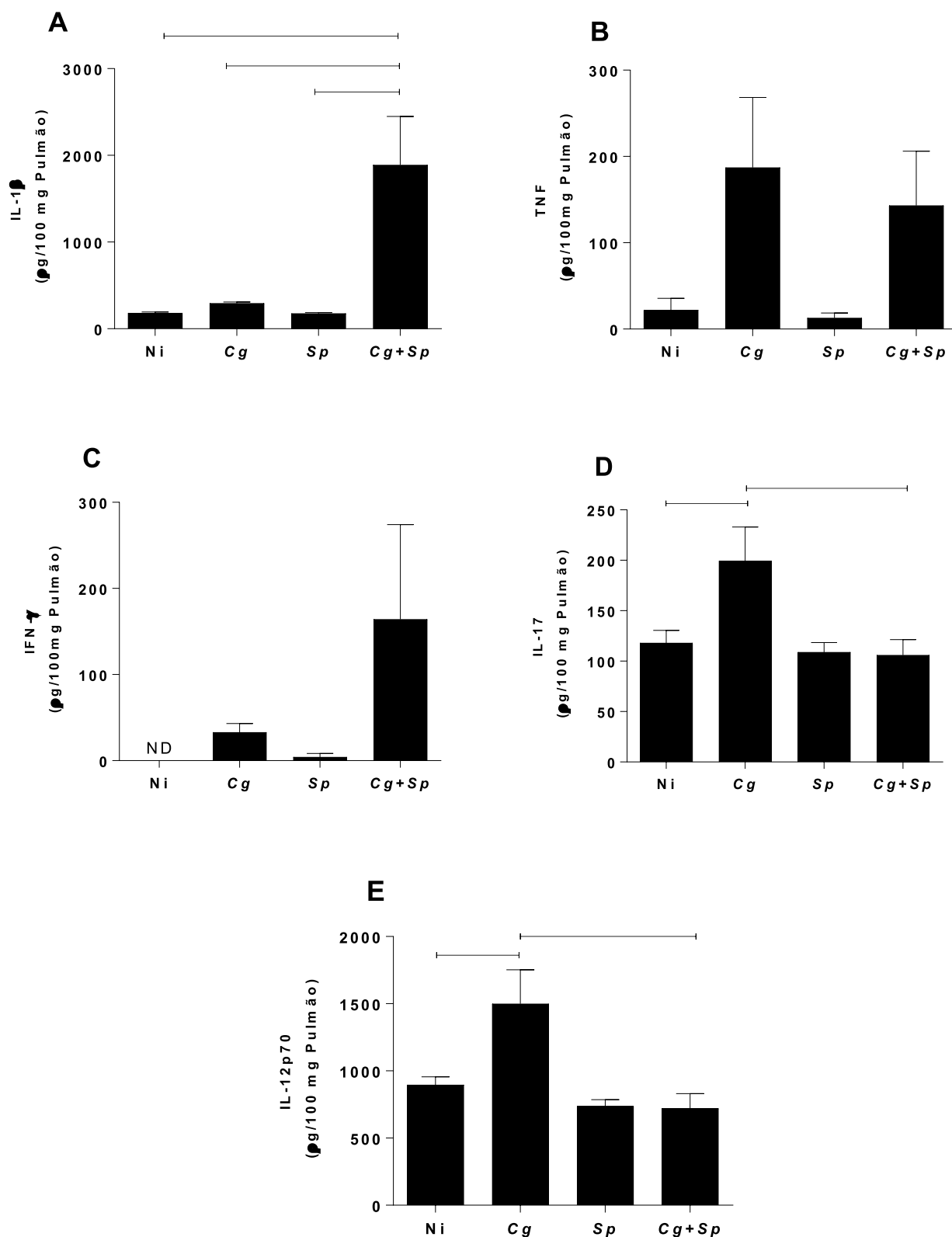


Figura 15. Dosagem de citocinas no parênquima pulmonar. Seis animais C57/BL6 machos por grupo foram inoculados por via intratraqueal com 30 μ L de uma suspensão contendo 1×10^4 por *C. gattii*. Quatro dias depois, os grupos coinfetados e monoinfetado por *Sp*, foram infectados com uma suspensão de 30 μ L contendo 1×10^3 UFC de *S. pneumoniae* via intranasal. Os animais foram

eutanasiados no terceiro dia de coinfeção para obtenção dos pulmões. Os órgãos obtidos foram devidamente processados para quantificação das citocinas IL-1 β (A), TNF (B), IFN- γ (C), IL-17 (D) e IL-12p70 (E). Ni: animais não infectados; Cg: animais infectados por *C. gattii*; Sp: animais infectados por *S. pneumoniae*; Cg+Sp: animais coinfectados conforme cinética descrita acima. Os dados são expressos em pg / 100 mg de pulmão e as barras acima das colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram feitas usando ANOVA / Tukey's multiple comparisons test.

5.3.4. Citometria de fluxo

Para identificação da população celular e avaliação da resposta inflamatória ativada nessa cinética foi realizada citometria de fluxo do LBA. O influxo de neutrófilo (Figura 16.A) nos animais coinfectados foi significativamente maior quando comparado com o grupo monoinfectado Sp, Cg e com o grupo não infectado ($p < 0,05$). Enquanto que Ni, Cg e o grupo Sp, apresentaram 10^4 células/mL, no grupo coinfectado foi observado um influxo 100 vezes, com um total de 10^6 células/mL. Não houve diferença estatística entre os grupos Ni, Cg e Sp.

Observou-se também aumento no número de macrófagos alveolares nos animais coinfectados (Figura 16.B). Os macrófagos estavam em maior número neste grupo, sendo estatisticamente maior do que os grupos Ni, Cg e Sp ($p < 0,05$). Com o mesmo perfil, o grupo coinfectado apresentou maior número de macrófagos intersticiais, sendo estatisticamente superior ao grupo Ni, Cg e Sp ($p < 0,05$) (Figura 16.C). Entre os últimos grupos citados não houve diferença significativa na quantificação de macrófagos intersticiais.

Na Figura 16.D, observa-se que no grupo coinfectado, o percentual de macrófagos do tipo M1 foi significativamente menor quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$): apenas 7,4% da população de macrófagos intersticiais foi positiva para o marcador MHC-II, enquanto que nos grupos Ni esse percentual foi de 25,3%; Cg de 31,1% e Sp 29,7%. O grupo Sp obteve maior percentual quando comparado com Ni, com diferença de 4,4%. E Cg apresentou um aumento de 1,4% em relação a Sp. Em relação ao recrutamento de macrófagos do tipo M2, identificados pela expressão de CD206, não houve diferença estatística entre os grupos analisados. O grupo Ni apresentou 61% dos macrófagos do tipo M2, Cg com 49%, Sp 56,4% e o grupo coinfectado 46,1% expressando este fenótipo.

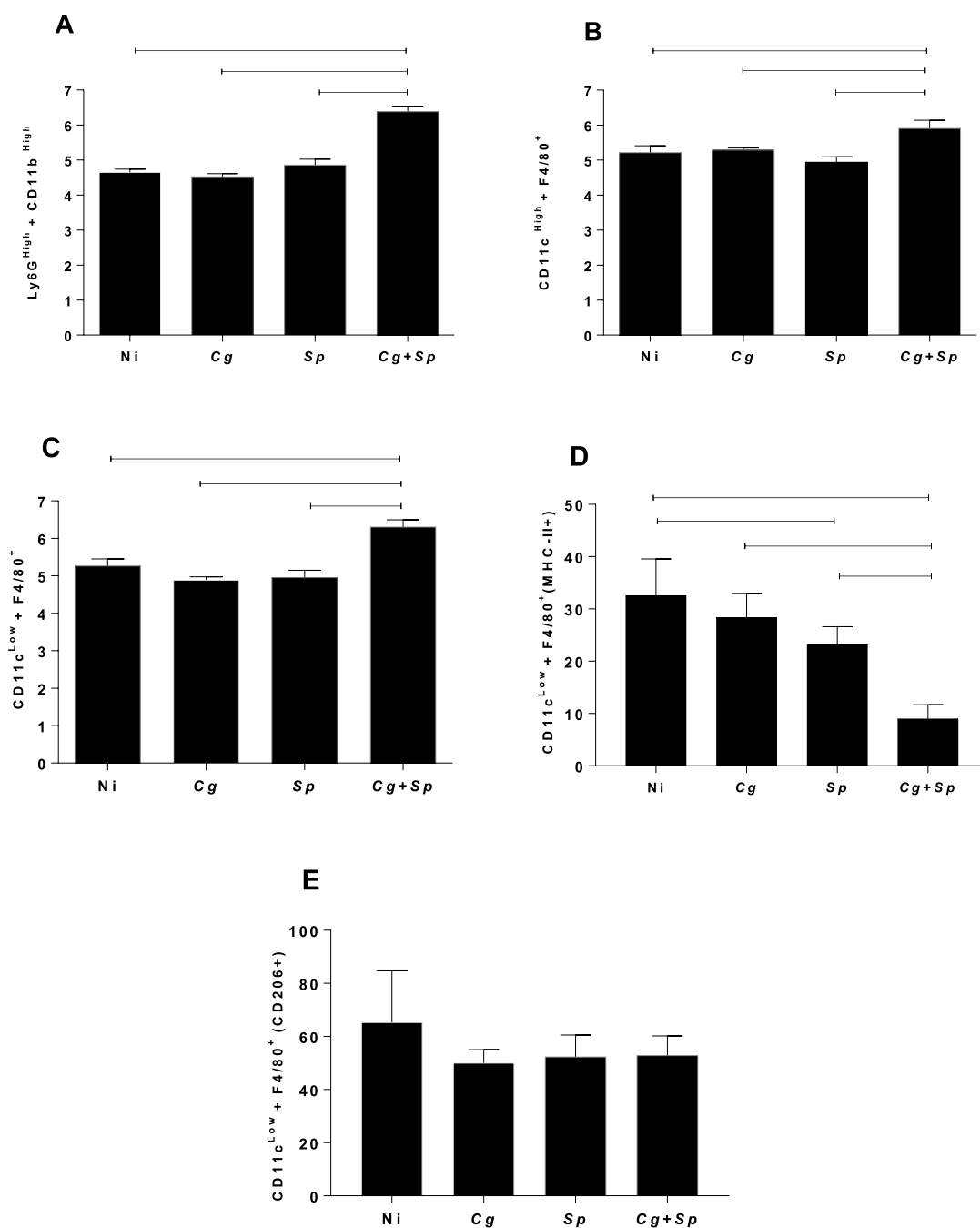


Figura 16. Identificação de populações celulares no LBA. Seis animais C57BL/6 machos por grupo foram inoculados por via intratraqueal com 30 μ L de uma suspensão contendo 1x10⁴ UFC por *C. gattii*. Quatro dias depois, os grupos coinfectados e mono infectado por *Sp*, foram infectados com uma suspensão de 30 μ L contendo 1x10³ UFC por *S. pneumoniae* via intranasal. Os animais foram eutanasiados no terceiro dia de coinfectação para obtenção de células do LBA. As células obtidas foram marcadas com diferentes combinações de anticorpos monoclonais fluorescentes específicos para classificação das seguintes populações celulares: número de neutrófilos totais Ly6G^{High} + CD11b^{High} (A), macrófagos alveolares residentes CD11c^{High} + F4/80⁺ (B), macrófagos intersticiais CD11c^{Low} + F4/80⁺ (C), macrófagos classicamente ativados ou M1 CD11c^{Low} + F4/80⁺ (MHCII⁺) (D) e macrófagos alternativamente ativados ou M2 CD11c^{Low} + F4/80⁺ (CD206⁺) (E). Ni: animais não infectados; Cg: animais infectados por *C. gattii*; Sp: animais infectados por *S. pneumoniae*; Cg+Sp: animais coinfectados conforme cinética descrita acima. Os dados são expressos em número de células por

volume de LBA (Log10 células / mL) para neutrófilos, macrófagos alveolares e macrófagos intersticiais; e em % de MHC II e CD206, para macrófagos M1 e M2, respectivamente. As barras acima das colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram feitas usando ANOVA / *Tukey's multiple comparisons test*.

5.3.5. Análise histopatológica

Para a análise histopatológica foram avaliados o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório. De acordo com as análises histopatológicas, foi observada diferença significativa estatística ($p < 0,05$) dos animais coinfectedos quando comparados aos animais não infectados e ao grupo Cg 4d quando avaliado a formação de edema e de fibrina (Figura 17 A). Na figura 17 B, o escore de inflamação foi significativamente ($p < 0,05$) maior nos animais coinfectedos quando comparados aos animais Ni, Cg 4d, Cg 7d e Sp.

Na figura 17C, pode-se observar que animais Ni, monoinfectados por Cg 4 dias e Sp apresentam aspecto considerado normal do tecido pulmonar, sem formação de exsudato ou infiltrado inflamatório dos alvéolos pulmonares. Nos animais Cg 7 dias, observa-se um infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal moderado e sem perda da parede alveolar. E no grupo coinfectedo é possível observar infiltrado inflamatório difuso intenso, no lúmen dos alvéolos, com áreas multifocais de necrose e perda da parede alveolar.

A histopatologia do cérebro também foi realizada, porém nenhuma alteração histopatológica foi identificada em nenhum grupo avaliado para esse tempo de infecção, sem nenhuma diferença entre os grupos (dados não mostrados).

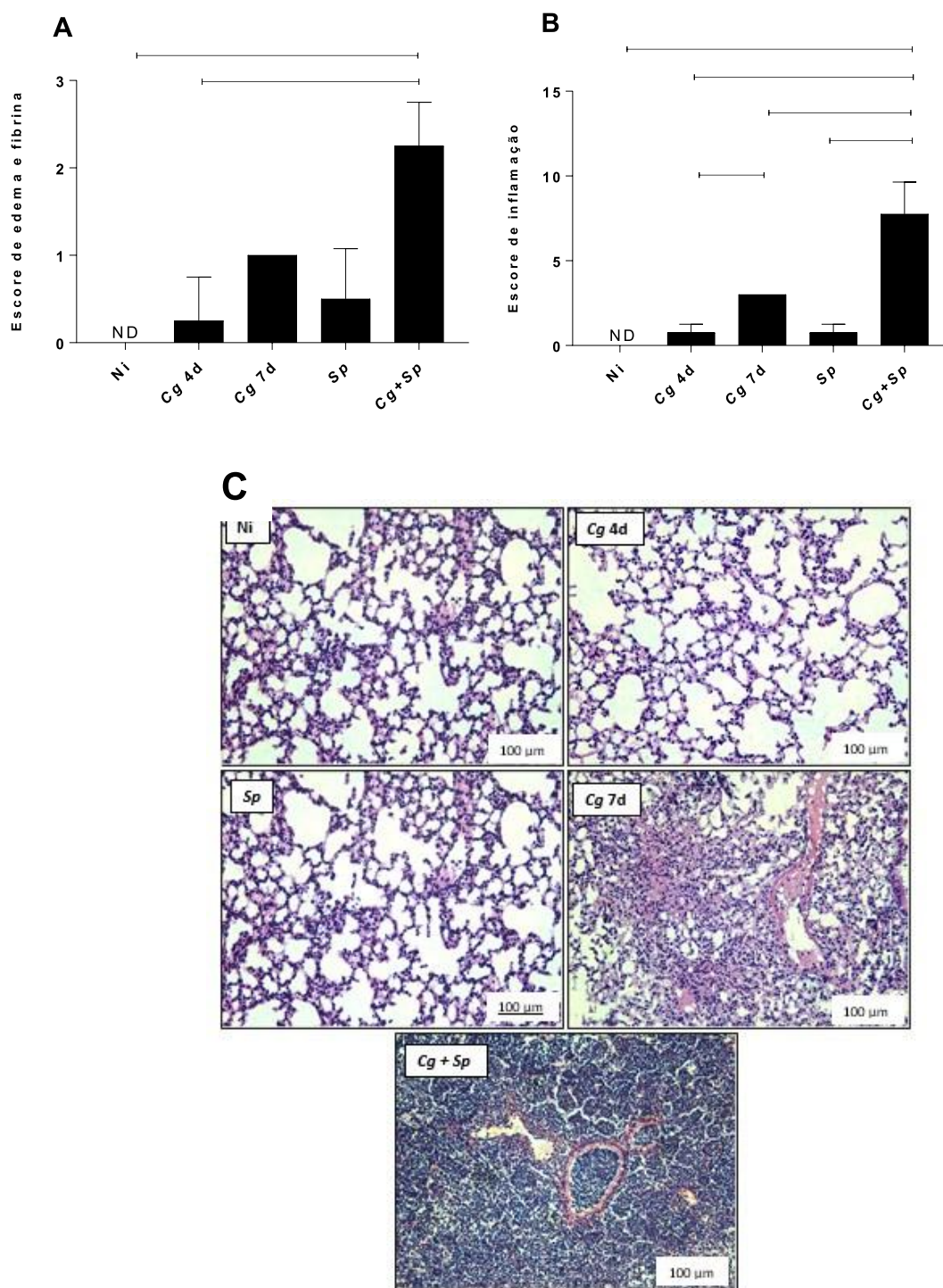


Figura 17. Análise histopatológica dos pulmões. Quatro animais C57/BL6 machos por grupo foram inoculados por via intratraqueal com 30µL de uma suspensão contendo 1×10^4 *C. gattii*. Quatro dias depois, os grupos coinfectados e monoinfectado por *Sp*, foram infectados com uma suspensão de 30 µL contendo 1×10^3 *S. pneumoniae* via intranasal. Os animais foram eutanasiados no terceiro dia de coinfeção para obtenção dos pulmões, os órgãos foram fixados em formalina tamponada 10% e embebidos em parafina. Em (A) escore histopatológico de edema e fibrina nos pulmões (B) escore histopatológico de inflamação nos pulmões. Para (A) e (B) as secções histológicas foram examinadas ao microscópio óptico para análise e comparação das alterações teciduais resultantes das infecções

propostas para cada grupo. Em (B) painel histopatológico, as seções histológicas dos pulmões foram coradas com HE e visualizadas a uma ampliação de 20X, foram avaliados pelo menos x campos por lâmina. A análise estatística para esses estudos foi ANOVA / *Kruskal Wallis*.

5.4. A coinfeção favorece a super expressão do receptor de ativação plaquetária

5.4.1. Expressão do receptor de ativação plaquetária (PAFR)

Com o aumento significativo das citocinas inflamatórias, investigamos a expressão de receptor do fator de ativação plaquetária - PAFR. Para isso, os pulmões dos animais foram processados e foi realizado qPCR (Figura 18). O grupo coinfectado apresentou aumento significativo na expressão desse receptor, quando comparado com o grupo Ni, Cg 7d, Cg 4d e Sp ($p < 0,05$). Entre os grupos controles, não infectados e os monoinfectados não houve diferença significativa na expressão de PAFR.

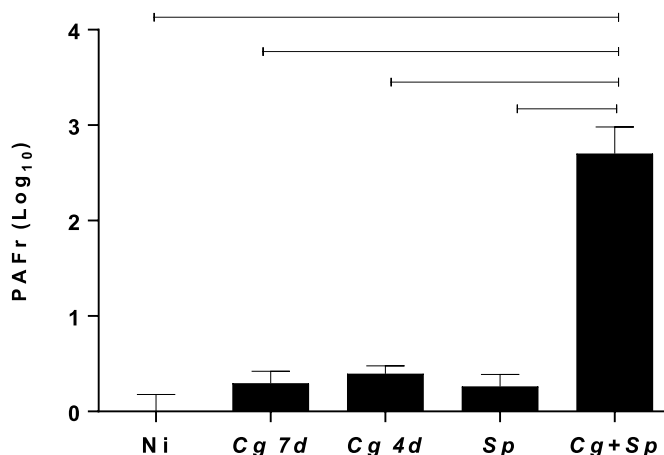


Figura 18. Expressão de PAFR no parênquima pulmonar. Quatro animais C57BL/6 machos por grupo foram inoculados por via intratraqueal com 30 μ L de uma suspensão contendo 1×10^4 *C. gattii*. Quatro dias depois grupos animais (Cg+Sp e Sp) foram infectados com uma suspensão de 30 μ L contendo 1×10^3 *S. pneumoniae* via intranasal. O grupo Cg4d foi eutanasiado quatro dias depois da inoculação com Cg; o grupo monoinfectado Cg7d foi eutanasiado após sete dias da inoculação de Cg; e os grupos que receberam inóculo bacteriano foram eutanasiados três dias após. Os pulmões desses animais foram processados e analisados quanto a expressão do gene PAFR. Os valores apresentados em Log₁₀ sinalizam o aumento de vezes da expressão de PAFR em relação ao grupo Ni ($2^{\Delta\Delta CT}$). ANOVA / *Tukey's multiple comparisons test*. As barras acima das colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A ocorrência de coinfeções em humanos é, vastamente, relatada na literatura. Um exemplo clássico e bastante frequente de infecção aguda concomitante é o aumento da susceptibilidade a infecções causadas por bactérias respiratórias durante uma gripe causada por *Influenza virus* (Morris et al., 2017). As interações fungo / bactéria podem apresentar resultado negativo, positivo ou neutro para ambas as partes. *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, inibe o crescimento de *C. neoformans* por meio da produção de piocianina *in vitro* (Rella et al., 2012). O mesmo ocorre com *C. gattii* na presença da bactéria *in vitro*, e em modelo murino, a presença de *P. aeruginosa* melhora o quadro clínico de camundongos infectados com *C. gattii* (Peres-Emídio, 2020).

Cryptococcus. gattii é uma levedura cosmopolita, apresenta diversos fatores de virulência e pode causar danos graves ao hospedeiro. A criptococose, micose causada por esse patógeno, por meio da inalação de esporos fúngicos presentes no meio ambiente, é responsável por altos índices de mortalidade em todo mundo, principalmente, em indivíduos portadores do vírus HIV (Rajasingham et al., 2017). Após a inalação de células fúngicas infectantes a levedura invade o espaço alveolar e o parênquima pulmonar. A colonização neste sítio pode causar pneumonia nos hospedeiros, e ainda, as leveduras podem alcançar o SNC levando o paciente ao quadro clínico de meningoencefalite criptocócica (Kwon-Chung et al. 2014). *C. gattii* está, geralmente, relacionado à infecção pulmonar granulomatosa em pacientes imunocompetentes, sendo considerado um patógeno primário, mas que também pode, em uma imunossupressão subjacente, ser fatal para o hospedeiro (Harris et al., 2011; Kwon-Chung & Saijo, 2015).

A bactéria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae* é um microrganismo comensal que coloniza a cavidade oral e a mucosa do trato respiratório superior dos seres humanos de forma assintomática, que pode se comportar como patógeno oportunista e causar doenças. Os sinais clínicos de infecção causada por *S. pneumoniae* podem variar de sinusite e otite média a doenças invasivas como pneumonia e meningite (Henriques-Normark e Tuomanen, 2013; Geno et al., 2015). Assim como na criptococose, a bactéria é responsável por índices elevados de

mortalidade no mundo. Os afetados são principalmente crianças, que são os principais portadores assintomáticos, ou adultos e idosos por meio de pneumonia adquirida na comunidade (Brown, 2012; WHO, 2012). Este pneumococo possui diversos fatores de virulência que desafiam o sistema imune do hospedeiro e que são essenciais para o alcance ao SNC (Weiser et al., 2018).

Os dois microrganismos citados acima, *C. gattii* e *S. pneumoniae* compartilham a mesma via de transmissão da doença e os mesmos sítios de infecção: pulmão e cérebro. Além disso, um importante fator predisponente para a criptococose é a infecção pelo vírus HIV, favorecendo a possibilidade de uma coinfeção tripla como observado em diversos relatos de casos na literatura (John, 1998; Nadaud *et al.*, 2007; Saleem et al., 2015; Matee & Matre, 2001; Millogo et al., 2004). *C. gattii* é capaz de infectar indivíduos saudáveis e trabalhamos com a hipótese de que a infecção concomitante por *S. pneumoniae* pode acarretar em danos mais graves em modelo murino de coinfeção com esses dois microrganismos.

Neste trabalho foi estabelecido um modelo *in vivo*, utilizando-se camundongos C57/BL6, para que fosse possível avaliar a coinfeção entre *C. gattii* e *S. pneumoniae*. O modelo de infecção causada por *C. gattii*, com o inóculo de 10^4 UFC, foi pré-estabelecido em vários estudos do Laboratório de Micologia (Oliveira et al., 2017; Costa et al., 2018) e reproduzido neste trabalho. O modelo de infecção causada por *S. pneumoniae* foi testado em relação à letalidade de diferentes inóculos (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7) administrados via intranasal, previamente, a ensaios de coinfeção. Com o resultado obtido concluiu-se que para avaliar o impacto da infecção de *S. pneumoniae* na infecção causada por *C. gattii*, foi escolhido o inóculo não-letal de 10^3 UFC de *S. pneumoniae*.

Além do inóculo, inicialmente foi necessário também estabelecer uma cinética de coinfeção. Para isso testou-se diferentes tempos de coinfeção (infecção bacteriana quatro ou sete dias antes da infecção por *C. gattii*, e infecção bacteriana quatro ou sete dias após infecção por *C. gattii*). A infecção concomitante de *S. pneumoniae* durante a criptococose aumenta a morbidade e mortalidade dos animais. Os animais que receberam o inóculo bacteriano quatro dias depois do inóculo fúngico, ou seja, a infecção por *S. pneumoniae* durante a criptococose murina conferiu a este modelo alterações significativas nos sinais clínicos dos animais. Alterações

comportamentais, funcionais, neurológicas e morte precoce confirmam que tanto o modelo de coinfeccção quanto a cinética são aplicáveis para compreensão da hipótese levantada neste trabalho. Relatos na literatura já apontaram que essa associação entre os patógenos pode ser fatal para os pacientes, principalmente, para os portadores do vírus HIV, isso demonstra a importância de se avaliar o processo de coinfeccção entre esses dois patógenos (Jhon, 1998; Matee & Matre, 2001; Millogo et al., 2004; Nadaud et al., 2007; Saleem et al., 2015).

A primeira investigação feita no modelo estabelecido foi carga microbiana no processo de coinfeccção. A carga fúngica no LBA foi a mesma nos grupos mono infectado *Cg* e para o grupo coinfectado. No baço não foi detectado UFC nos grupos mono e coinfectados. No pulmão, fígado e cérebro ocorreu diminuição da carga fúngica nos animais coinfectados. Ainda, não houve translocação do fungo para o SNC no grupo coinfectado. Isso sugere que, na presença da bactéria, o fungo diminui a multiplicação e, *C. gattii* se restringe ao ambiente pulmonar, mais precisamente no parênquima pulmonar. Trabalhos publicados pelo nosso grupo, demonstram que a linhagem L27-01 de *C. gattii* alcança o SNC em menos de seis horas após a infecção intratraqueal, o que foi observado no grupo mono infectado *C. gattii* com sete dias de infecção e no grupo mono infectado *C. gattii* com 4 dias de infecção. Sugerindo, mais uma vez, que a presença da bactéria tem um importante papel na contenção da transmigração de células fúngicas (Costa et al., 2018). Ou ainda o perfil encontrado nos macrófagos, tipo M2, favorece a formação de tecido cicatricial, granulomas, podendo se tornar uma barreira física para a transmigração fúngica.

A carga bacteriana no grupo coinfectado aumentou em todos os órgãos analisados em relação ao grupo controle mono infectado com *S. pneumoniae*. Ou seja, a presença prévia de *C. gattii* pode favorecer a disseminação e multiplicação da bactéria. Com esse resultado foi possível sugerir que o agravamento do quadro patológico, observados na curva de sobrevivência e análise comportamental dos camundongos coinfectados, foi associado à elevada carga bacteriana e translocação do espaço alveolar para o parênquima pulmonar e para o SNC. Tais análises sustentam o resultado do *clearance*, onde com este mesmo inóculo bacteriano, a depuração bacteriana ocorre no cérebro e no pulmão, sendo observado apenas carga

bacteriana no LBA no 15º dia, ou seja, na ausência do fungo a tendência de eliminação bacteriana é iminente. Estudos encontrados na literatura corroboram os nossos resultados, em modelo murino de coinfeção pneumocócica durante a fase aguda da infecção causada pelo *Influenza virus* observou-se aumento da carga bacteriana e agravamento do quadro de pneumonia e mortalidade dos animais (Smith et al., 2013; Sharma-Chawla et al., 2016).

Poderia a inoculação de um segundo microrganismo levar a intensificação inflamatória de uma resposta já presente? Dessa forma decidimos avaliar a resposta inflamatória no hospedeiro murino coinfectado. No caso de inoculação de *S. pneumoniae* após quatro dias de *C. gattii*, sim. A resposta inflamatória foi alterada pela presença da bactéria durante a coinfeção. O grupo coinfectado apresentou maior influxo de células com quantificação mais elevada de leucócitos totais em relação aos demais grupos monoinfectados.

Os níveis de MPO e NAG do pulmão foram quantificados no parênquima pulmonar. O acúmulo de neutrófilos no parênquima foi medido, indiretamente, por meio da atividade da enzima MPO, e o acúmulo de macrófagos foi indicado, indiretamente, pela quantificação de NAG (Russo et al., 2009; Xavier et al., 2010). Observa-se aumento do influxo de neutrófilos com o passar do tempo (de quatro para sete dias) no grupo monoinfectado com *C. gattii* e a presença da bactéria interfere neste processo. A população de macrófagos é maior em todos os grupos analisados em relação ao quantitativo de neutrófilos e a presença de *S. pneumoniae* eleva numericamente a quantidade dessas células.

No lavado broncoalveolar o recrutamento de neutrófilos foi maior no grupo coinfectado, utilizando citometria de fluxo como metodologia de análise. Durante a contagem diferencial de células, no grupo *Cg7* foi encontrada menos células polimorfonucleadas quando comparada ao grupo coinfectado. Sendo assim, dois métodos para a quantificação de neutrófilo (citometria de fluxo e contagem diferencial de leucócitos) demonstraram que no grupo coinfectado, há maior infiltrado neutrofílico do que o grupo *C. gattii*. A carga fúngica no parênquima pulmonar é maior do que no lavado broncoalveolar, sugerindo papel fundamental dos neutrófilos no controle da infecção fúngica nesse sítio.

S. pneumoniae também induziu aumento na liberação de citocinas inflamatórias nos camundongos já infectados com *C. gattii*: TNF, INF γ , IL-1 β , IL-17, IL-12p70. Nossos resultados se respaldam por dados encontrados na literatura. Durante a pneumonia pneumocócica, as citocinas TNF e IL-1, são rapidamente induzidas após exposição microbiana. Com um papel importante no *clearance* bacteriano, IL-1 β estimula o recrutamento de neutrófilo, o que também foi observado nos nossos resultados (Kafka et al., 2008). Jones e colaboradores (2005) demonstraram que a deficiência combinada de TNF e de IL-1 reduz a resposta imune inata do hospedeiro ao patógeno *S. pneumoniae* nos pulmões (Jones et al., 2005).

PAFR é um receptor acoplado à proteína G, que quando ativado pelo mediador químico de inflamação PAF (fator de ativação plaquetária) torna-se um potente ativador de fosfolipídios envolvido em muitas funções leucocitárias. PCho (adesina fosforilada de *Sp*) é um componente bioativo do fator de ativação plaquetária (PAF) e, por mimetismo molecular, PCho se liga ao receptor de PAF acoplado à proteína G (PAFR) e desencadeiam internalização da bactéria mediada por β -arrestina nas células hospedeiras. No caso específico de *S. pneumoniae*, o cruzamento de barreira celulares é dependente de PAFR e esse processo é crucial no desenvolvimento de doença invasiva (Iovino et al., 2013; Loh, Gao & Tuomanen, 2017). Em camundongos coinfectedos, a presença prévia de *C. gattii* parece influenciar na super expressão deste importante receptor após inoculação de *S. pneumoniae* ao modelo. Diversos estudos demonstram que tanto TNF quando IL-1 β estão relacionados à expressão de PAFR o que sustenta a nossa hipótese. Warren e colaboradores (1990) demonstraram que a neutralização de TNF intrapulmonar com anticorpos anti-TNF reduz a permeabilidade vascular pulmonar, assim como o recrutamento de células PMN e os níveis de PAFR no parênquima pulmonar (Warren et al., 1990; Warren, 1992). Na alveolite aguda, IL-1 β intrapulmonar amplifica a produção local de PAF além de modular diferentes aspectos durante o recrutamento de neutrófilos (Warren et al., 1992). Ou seja, a participação de PAFR na permeabilidade vascular como resultado da secreção de IL-1 β e acúmulo de neutrófilos no pulmão é bem conhecida na literatura (Lee et al., 2000).

Além de considerar a hipótese de que a coinfeção diminui a função normal das células inflamatórias que protegem contra *S. pneumoniae*, consideramos também

a probabilidade de a coinfeção induzir aumento na expressão do receptor de adesão bacteriana no epitélio das vias aéreas. Sendo assim, PAFR estaria associado a disseminação de *S. pneumoniae* para SNC e outros órgãos. Nesse sentido, uma perspectiva deste trabalho é utilizar camundongos *knockouts* para investigar o papel desta molécula no fenótipo observado.

A análise histopatológica do tecido pulmonar demonstra que a coinfeção induziu a uma resposta inflamatória mais intensa, no lúmen dos alvéolos, com danos teciduais necróticos e perda da parede alveolar. Cada uma dessas citocinas analisadas poderia contribuir para exacerbação complexo imune, promovendo maior influxo de neutrófilos, conforme observado na análise das células do lavado broncoalveolar. A combinação de *C. gattii* e *S. pneumoniae* levou aumento da expressão do receptor do fator de ativação de plaquetas, recrutamento de neutrófilos e aumento na carga bacteriana com conseqüente lesão epitelial e declínio na função pulmonar. Apesar de induzir aumento no número de macrófagos alveolares residentes e recrutamento de macrófagos intersticiais, a funcionalidade destas células poderia estar alterada, diminuindo a eficácia das células no controle rápido da multiplicação microbiana, possibilitando o estabelecimento da infecção invasiva aguda. Nossos dados apontam alteração da funcionalidade desses macrófagos, estando polarizados para o perfil M2 e não para o perfil M1.

Em soma, todos esses fatores resultam em elevadas taxas de carga bacteriana no SNC, alteração no perfil comportamental, letalidade precoce nos animais coinfectados. Estes dados permitem traçar inúmeras hipóteses e pontos a serem ainda investigados.

7. CONCLUSÕES

- O modelo murino de coinfeção proposta no trabalho é ideal para se avaliar a interação entre os dois microrganismos.
- A infecção prévia por *C. gattii* seguida de pela infecção por *S. pneumoniae* com o intervalo de quatro dias reproduziu os sinais clínicos tanto da criptococose quanto de pneumonia e meningite causada por *S. pneumoniae*.
- Os animais apresentaram, alterações comportamentais, funcionais e neurológicas.
- A infecção prévia por *Cg* e secundária por *Sp* favoreceu o aumento da carga bacteriana no lavado broncoalveolar, pulmão e cérebro. Enquanto que *Cg* não alcançou o SNC, ficando restritos ao lavado broncoalveolar e ao pulmão.
- A inflamação possui um papel importante no processo de coinfeção, foi observado aumento do influxo de macrófagos e neutrófilos, bem como aumento significativo da citocina pró-inflamatória IL-1 β , TNF, IFN- γ , IL-17 e IL12p70 no lavado broncolaveolar e no parênquima pulmonar, principalmente a secreção de IL-1 β .
- Alteração no perfil de ativação de macrófagos intersticiais no grupo coinfectado conduzindo a expressão do fenótipo M2.
- PAFR tem expressão aumentada no parênquima pulmonar.

8. PERSPECTIVAS

- Tratamento com inibidor de IL-1 β para verificar se a presença dessa citocina está relacionada ao aumento de sobrevivência dos animais.
- Estudos em modelo murino knockout de PAFR para verificar se *S. pneumoniae* faz uso desse receptor para alcançar o SNC e se este evento é compatível com a carga microbiana encontrada no pulmão e no cérebro confirmam este evento.
- Verificar se os resultados *in vivo* podem ser observados por meio da análise de transmigração de *C. gattii* e *S. pneumoniae*. para o SNC durante a coinfeção, através de modelo celular *in vitro* de barreira hematoencefálica.
- Imunohistoquímica para verificar a co-localização dos microrganismos e para avaliar os anticorpos recrutados;
- Avaliar a expressão de PCho;
- Quantificação de quimiocinas para avaliar se os neutrófilos corretamente ativados.
- Ensaio de fagocitose em animais *knockout* a fim de se avaliar se os macrófagos estão corretamente ativados.
- Ensaios de fibrose a fim de se avaliar o perfil dos macrófagos M1 ou M2.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBOTT, N. Joan. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. **Neurochemistry international**, v. 45, n. 4, p. 545-552, 2004.

ABBOTT, N. Joan; RÖNNBÄCK, Lars; HANSSON, Elisabeth. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. **Nature reviews neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 41, 2006.

ABBOTT, N. Joan *et al.* Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 1, p. 13-25, 2010.

ALBUQUERQUE, Priscila C.; RODRIGUES, Marcio L. Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. **Future microbiology**, v. 7, n. 3, p. 319-329, 2012.

AGUIRRE, Karen; MILLER, Shannon. MHC class II-positive perivascular microglial cells mediate resistance to *Cryptococcus neoformans* brain infection. **Glia**, v. 39, n. 2, p. 184-188, 2002.

AJELLO, Libero *et al.* Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. **American Journal of Hygiene**, v. 67, n. 1, p. 72-7, 1958.

ALLEN, R. *et al.* Disseminated cryptococcosis after transurethral resection of the prostate. **Australian and New Zealand journal of medicine**, v. 12, n. 4, p. 296-299, 1982.

ALVAREZ, Mauricio; CASADEVALL, Arturo. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2161-2165, 2006.

AMERIGHI, Fulvia *et al.* Identification of a monoclonal antibody against pneumococcal pilus 1 ancillary protein impairing bacterial adhesion to human epithelial cells. **The Journal of infectious diseases**, v. 213, n. 4, p. 516-522, 2016.

ANDRADE-SILVA, Leonardo Euripedes *et al.* Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. *PloS one*, v. 13, n. 3, p. e0193237, 2018.

ANGKASEKWINAI, Pornpimon *et al.* *Cryptococcus gattii* infection dampens Th1 and Th17 responses by attenuating dendritic cell function and pulmonary chemokine expression in the immunocompetent hosts. **Infection and immunity**, v. 82, n. 9, p. 3880-3890, 2014.

BARLUZZI, R. *et al.* Role of the capsule in microglial cell—*Cryptococcus neoformans* interaction: impairment of antifungal activity but not of secretory functions. **Medical mycology**, v. 36, n. 4, p. 189-197, 1998.

BAKALETZ, Lauren O. Developing animal models for polymicrobial diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 552, 2004.

BOLLAM, Rahul; YASSIN, Mohamed; PHAN, Tung. Disseminated cryptococcosis in an immunocompetent patient. **Respiratory medicine case reports**, v. 30, p. 101034, 2020.

BRITTAN, J. L. et al. Pneumococcal neuraminidase A: an essential upper airway colonization factor for *Streptococcus pneumoniae*. **Molecular oral microbiology**, v. 27, n. 4, p. 270-283, 2012.

BROOKS, Laida RK; MIAS, George I. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1366, 2018.

BROWN, Jeremy S. Community-acquired pneumonia. **Clinical Medicine**, v. 12, n. 6, p. 538, 2012.

CASADEVALL, Arturo; PIROFSKI, Liise-anne. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 12, p. 2169-2174, 2007.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. Pneumococcal Disease. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pneumo.html#epi>> Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Pneumococcal Disease. Risk Factor. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pneumococcal/clinicians/risk-factors.html>> Acesso: 10 de fevereiro de 2021.

CHEN, Ying-Lien *et al.* Calcineurin governs thermotolerance and virulence of *Cryptococcus gattii*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 3, n. 3, p. 527-539, 2013.

CHEN, Sharon *et al.* Epidemiology and host-and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. **Clinical infectious diseases**, v. 31, n. 2, p. 499-508, 2000.

CHENG, Po-Yan; SHAM, Anita; KRONSTAD, James W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 10, p. 4284-4294, 2009.

CHIAVOLINI, Damiana; POZZI, Gianni; RICCI, Susanna. Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 4, p. 666-685, 2008.

CHRISTIANSON, John C.; ENGBER, William; ANDES, David. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. **Medical Mycology**, v. 41, n. 3, p. 177-188, 2003.

- COGLIATI, Massimo *et al.* Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. **FEMS yeast research**, v. 16, n. 4, 2016.
- COGLIATI, Massimo. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, 2013.
- COSTA, Marliete Carvalho *et al.* The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. n, p. 1-9, 2016.
- COSTA, Marliete Carvalho *et al.* A new method for studying cryptococcosis in a murine model using 99mTc-*Cryptococcus gattii*. **Medical mycology**, v. 56, n. 4, p. 479-484, 2018.
- CRABTREE, Juliet N. *et al.* Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, p. IAI. 00507-12, 2012.
- CUNDELL, Diana R. *et al.* *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 435-438, 1995.
- DA SILVA FAY, Vanessa *et al.* A 12-year study of fungal infections in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2019.
- DAMBUZA, Ivy M. *et al.* The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis. **PLoSpathogens**, v. 14, n. 5, p. e1006978, 2018.
- DAMASCENO-ESCOURA, Alessandro Henrique *et al.* Epidemiological, Clinical and Outcome Aspects of Patients with Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus gattii* from a Non-endemic Area of Brazil. **Mycopathologia**, v. 184, n. 1, p. 65-71, 2019.
- DANDO, Samantha J. *et al.* Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 691-726, 2014.
- DANESI, Patrizia *et al.* *Cryptococcus* in Wild life and Free-Living Mammals. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 29, 2021.
- DAVIS, Michael J. *et al.* Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **MBio**, v. 4, n. 3, 2013.
- DHANOVA, Amreeta *et al.* Epidemiology and clinical characteristics of hospitalized patients with pandemic influenza A (H1N1) 2009 infections: the effects of bacterial coinfection. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2011.
- ELLABIB, Mohamed S. *et al.* Isolation, identification and molecular typing of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and other environmental sources in Tripoli, Libya. **Mycopathologia**, v. 181, n. 7-8, p. 603-608, 2016.
- FAMÀ, Agata *et al.* Nucleic acid-sensing Toll-like receptors play a dominant role in innate immune recognition of pneumococci. **MBio**, v. 11, n. 2, 2020.

FELDMAN, C. *et al.* The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium in vitro. **Respiratory medicine**, v. 96, n. 8, p. 580-585, 2002.

FELDMESSER, Marta; KRESS, Yvonne; CASADEVALL, Arturo. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 2355-2365, 2001.

FERNANDES, Kenya E. *et al.* Species in the *Cryptococcus gattii* complex differ in capsule and cell size following growth under capsule-inducing conditions. **Mosphere**, v. 1, n. 6, 2016.

FIRACATIVE, Carolina *et al.* The status of cryptococcosis in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, 2018.

FREITAS, G.J.C. Influência da diversidade fenotípica de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* na progressão da criptococose em modelo murino. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais. 2019.

GALANIS, Eleni *et al.* Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canadá, 1999–2007. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 251, 2010.

GALANIS, Ilias *et al.* Effects of PCV7 and PCV13 on invasive pneumococcal disease and carriage in Stockholm, Sweden. **European Respiratory Journal**, v. 47, n. 4, p. 1208-1218, 2016.

GENO, K. Aaron *et al.* Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 871-899, 2015.

GLEZER, I.; SIMARD, A. R.; RIVEST, S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. **Neuroscience**, v. 147, n. 4, p. 867-883, 2007.

GOUGH, D. R.; COTTER, T. G. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. **Cell death & disease**, v. 2, n. 10, p. e213-e213, 2011.

GRIGG, Jonathan. The platelet activating factor receptor: a new anti-infective target in respiratory disease? **Thorax**, v. 67, n. 9, p. 840-841, 2012.

HAGEN, Ferry; BOEKHOUT, Teun. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. **Mycopathologia**, v. 170, n. 4, p. 209-211, 2010.

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

HAGEN, Ferry *et al.* Importance of resolving fungal nomenclature: the case of multiple pathogenic species in the *Cryptococcus* genus. **Mosphere**, v. 2, n. 4, 2017.

HAHN, Sinuhe *et al.* Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infectious agents and underlying host physiology. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2013. p. 439-453.

HARRIS, J. R. *et al.* *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clinical infectious diseases**, v. 53, n. 12, p. 1188-1195, 2011.

HEITOR, Danilo Florentino *et al.* Choroiditis in a HIV-infected patient with disseminated cryptococcal infection: A case report and literature review. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 36, n. 3, p. 155-159, 2019.

HENRIQUES-NORMARK, Birgitta; TUOMANEN, Elaine I. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 7, p. a010215, 2013.

HERKERT, Patricia F. *et al.* Differential in vitro cytokine induction by the species of *Cryptococcus gattii* complex. **Infection and immunity**, v. 86, n. 4, 2018.

HUSTON, Shaunna M. *et al.* *Cryptococcus gattii* capsule blocks surface recognition required for dendritic cell maturation independent of internalization and antigen processing. **The Journal of Immunology**, p. 1501089, 2016.

IOVINO, Federico *et al.* Signalling or binding: The role of the platelet-activating factor receptor in invasive pneumococcal disease. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 6, p. 870-881, 2013.

IOVINO, Federico, *et al.* "pIgR and PECAM-1 bind to pneumococcal adhesins RrgA and PspC mediating bacterial brain invasion." **Journal of Experimental Medicine** (2017): 1619-1630.

IOVINO, Federico *et al.* How does *Streptococcus pneumoniae* invade the brain? **Trends in microbiology**, v. 24, n. 4, p. 307-315, 2016.

JOHN, M.-A.; COOVADIA, Y. Meningitis due to a combined infection with *Cryptococcus neoformans* and *Streptococcus pneumoniae* in an AIDS patient. **Journal of Infection**, v. 36, n. 2, p. 231-232, 1998.

JONES, Matthew R. *et al.* Lung NF- κ B activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 11, p. 7530-7535, 2005.

JONSSON, Steinn *et al.* Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. **Journal of Infectious Diseases**, v. 152, n. 1, p. 4-13, 1985.

KAFKA, Daniel *et al.* Contribution of IL-1 to resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. **International immunology**, v. 20, n. 9, p. 1139-1146, 2008.

KADIOGLU A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. O papel dos fatores de virulência de *Streptococcus pneumoniae* na colonização e doença respiratória do hospedeiro. **Nature Reviews Microbiology**. 2008; 6 (4): 288–301.

KWON-CHUNG, Kyung J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

KWON-CHUNG, Kyung J.; SAIJO, Tomomi. Is *Cryptococcus gattii* a primary pathogen? **Journal of Fungi**, v. 1, n. 2, p. 154-167, 2015.

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.

LE GUENNEC, Loic *et al.* Strategies used by bacterial pathogens to cross the blood–brain barrier. **Cellular microbiology**, v. 22, n. 1, p. e13132, 2020.

LEE, Young M. *et al.* Platelet-activating factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, n. 1, p. L75-L80, 2000.

LEIMANN, Beatriz Consuelo Quinet; KOIFMAN, Rosalina Jorge. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro state, Brazil, 1994-2004. **Cadernos de saúde pública**, v. 24, n. 11, p. 2582-2592, 2008.

LEOPOLD WAGER, Chrissy M. *et al.* *Cryptococcus* and phagocytes: complex interactions that influence disease outcome. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 105, 2016.

LIMA, C.M. Caracterização molecular e perfil de susceptibilidade e virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais. 2019.

LINDSTRAND, Ann *et al.* Unaltered pneumococcal carriage prevalence due to expansion of non-vaccine types of low invasive potential 8 years after vaccine introduction in Stockholm, Sweden. **Vaccine**, v. 34, n. 38, p. 4565-4571, 2016.

LIU, Tong-Bao *et al.* Brain inositol is a novel stimulator for promoting *Cryptococcus* penetration of the blood-brain barrier. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 4, p. e1003247, 2013.

LOH, Lip Nam; GAO, Geli; TUOMANEN, Elaine I. Dissecting bacterial cell wall entry and signaling in eukaryotic cells: an actin-dependent pathway parallels platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis. **MBio**, v. 8, n. 1, 2017.

MA, Hansong *et al.* Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2156-2160, 2006.

MA, Hansong; MAY, Robin C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in applied microbiology**, v. 67, p. 131-190, 2009.

MARRA, Andrea; BRIGHAM, Daniel. *Streptococcus pneumoniae* causes experimental meningitis following intranasal and otitis media infections via a non hematogenous route. **Infection and immunity**, v. 69, n. 12, p. 7318-7325, 2001.

MARTINS, Yuri C. *et al.* Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. **Malaria journal**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2010.

MARRIOTT, Helen M. *et al.* Interleukin-1 β regulates CXCL8 release and influences disease outcome in response to *Streptococcus pneumoniae*, defining intercellular

cooperation between pulmonary epithelial cells and macrophages. **Infection and immunity**, v. 80, n. 3, p. 1140-1149, 2012.

MARUVADA, Ravi *et al.* *Cryptococcus neoformans* phospholipase B 1 activates host cell Rac 1 for traversal across the blood–brain barrier. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 10, p. 1544-1553, 2012.

MATEE, M. I. N.; MATRE, R. Pathogenic isolates in meningitis patients in Dar Es Salaam, Tanzania. **East African medical journal**, v. 78, n. 9, p. 458-460, 2001.

MAXEINER, Joachim 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, 2007.

MAY, Robin C. *et al.* *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 2, p. 106, 2016.

MAZIARZ, Eileen K.; PERFECT, John R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.

MCFADDEN, Diane C. *et al.* Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 8, p. 1464-1473, 2007.

MEDZHITOV, Ruslan. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-826, 2007.

MENEZES-GARCIA, Zélia *et al.* Lack of platelet-activating factor receptor protects mice against diet-induced adipose inflammation and insulin-resistance despite fat pad expansion. **Obesity**, v. 22, n. 3, p. 663-672, 2014.

MILLOGO, A. *et al.* La cryptococcose neuroméningée au cours de l'infection par le VIH au centre hospitalier de Bobo Dioulasso (Burkina Faso). **Bull Soc Pathol Exot**, v. 97, n. 2, p. 119-121, 2004.

MITCHELL, David H. *et al.* Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 611-616, 1995.

MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 5, p. 411-418, 2010.

MITCHELL, Tim J.; DALZIEL, Catherine E. The biology of pneumolysin. **MACPF/CDC Proteins-Agents of Defence, Attack and Invasion**, p. 145-160, 2014.

MORENS, David M.; TAUBENBERGER, Jeffery K.; FAUCI, Anthony S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. **The Journal of infectious diseases**, v. 198, n. 7, p. 962-970, 2008.

MORRIS, Denise E.; CLEARLY, David W.; CLARKE, Stuart C. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1041, 2017.

MURRAY, Peter J. Macrophage polarization. **Annual review of physiology**, v. 79, p. 541-566, 2017.

NADAUD, J. *et al.* Méningite bactérienne chez le patient VIH positif: pensez aux co-infections! In: **Annales francaises d'anesthesie et de reanimation**. Elsevier Masson, 2007. p. 85-87.

NAIR, Nisha *et al.* Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. **Infection and immunity**, v. 82, n. 6, p. 2162-2169, 2014.

NGAMSKULRUNGROJ, Popchai *et al.* The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **MBio**, v. 3, n. 3, 2012.

NOSANCHUK, Joshua D.; CASADEVALL, Arturo. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3519-3528, 2006.

O'MEARA, Teresa R.; ALSPAUGH, J. Andrew. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 387-408, 2012.

OLIVEIRA, Lorena VN *et al.* Influenza A virus as a predisposing factor for cryptococcosis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 419, 2017.

ORIHUELA, Carlos J. *et al.* Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1638-1646, 2009.

OKAGAKI, Laura H. *et al.* Cryptococcal titan cell formation is regulated by G-protein signaling in response to multiple stimuli. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 10, p. 1306-1316, 2011.

PAPPAS, Peter G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 61, 2013.

PARK, Benjamin J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.

PASMAN, Lesley. The complication of coinfection. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 85, n. 1, p. 127, 2012.

PELTOLA, Ville T.; MURTI, K. Gopal; MCCULLERS, Jonathan A. Influenza virus neuraminidase contributes to secondary bacterial pneumonia. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 2, p. 249-257, 2005.

PERES-EMIDIO, E.C. Estudo da interação entre três diferentes reinos: entendendo a complexidade de co-infecções entre bactérias e o fungo *Cryptococcus gattii* em modelo murino. Tese. (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais. 2020.

PETERS, Brian M. *et al.* Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*–*Candida albicans* dual-species biofilms. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 493-503, 2010.

PETERS, Brian M. *et al.* *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 12, p. 2975, 2012.

POTRYKUS, Joanna *et al.* Conflicting interests in the pathogen–host tug of war: fungal micronutrient scavenging versus mammalian nutritional immunity. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1003910, 2014.

RELLA, Antonella *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Cryptococcus* species. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 451-461, 2012

RAJASINGHAM, Radha *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.

REX, John H. *et al.* Catastrophic visual loss due to *Cryptococcus neoformans* meningitis. **Medicine**, v. 72, n. 4, p. 207-224, 1993.

RIJNEVELD, Anita W. *et al.* TNF- α compensates for the impaired host defense of IL-1 type I receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 9, p. 5240-5246, 2001.

RING, Axel *et al.* Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. **The Journal of clinical investigation**, v. 102, n. 2, p. 347-360, 1998.

RODRIGUES, Marcio L. Funding and innovation in diseases of neglected populations: the paradox of cryptococcal meningitis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004429, 2016.

ROGERS, Derek 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.

RUSSO, Remo C. *et al.* Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 40, n. 4, p. 410-421, 2009.

SAÏD-SADIER, Najwane; OJCIUS, David M. Alarmins, inflammasomes and immunity. **Biomedical journal**, v. 35, n. 6, p. 437, 2012.

SALEEM, Faryal; FASIH, Naima; ZAFAR, Afia. *Cryptococcus neoformans* and *Streptococcus pneumoniae* co-infection in post-traumatic meningitis in a patient with unknown HIV status. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 65, n. 10, p. 1122, 2015.

SANTOS, Julliana Ribeiro Alves *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. e112669, 2014.

SCHOFFELEN, Teske *et al.* *Cryptococcus gattii* induces a cytokine pattern that is distinct from other cryptococcal species. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55579, 2013.

SHARMA-CHAWLA, Niharika *et al.* Influenza A virus infection predisposes hosts to secondary infection with different *Streptococcus pneumoniae* serotypes with similar outcome but serotype-specific manifestation. **Infection and immunity**, v. 84, n. 12, p. 3445-3457, 2016.

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

SHI, Meiqing; MODY, Christopher H. Fungal infection in the brain: what we learned from intravital imaging. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 292, 2016.

SHUKLA, Shakti Dhar *et al.* Platelet activating factor receptor: gateway for bacterial chronic airway infection in chronic obstructive pulmonary disease and potential therapeutic target. **Expert review of respiratory medicine**, v. 9, n. 4, p. 473-485, 2015.

SMITH, Amber M. *et al.* Kinetics of coinfection with *Influenza A virus* and *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 3, p. e1003238, 2013.

STEEL, Helen C. *et al.* Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, Arturo. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15245-15250, 2001.

SUBRAMANIAN, Karthik *et al.* Pneumolysin binds to the mannose receptor C type 1 (MRC-1) leading to anti-inflammatory responses and enhanced pneumococcal survival. **Nature microbiology**, v. 4, n. 1, p. 62-70, 2019.

TAVARES, Luciana 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**, v. 55, n. 1, p. 24-34, 2016.

TODD, Olivia A. *et al.* *Candida albicans* augments *Staphylococcus aureus* virulence by engaging the staphylococcal agr quorum sensing system. **MBio**, v. 10, n. 3, 2019.

TRAPPETTI, Claudia *et al.* Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 10, p. 1497-1505, 2009.

UCHIYAMA, Satoshi *et al.* The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 9, p. 1845-1852, 2009.

VAGO, Juliana P. *et al.* The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 10, p. 4940-4950, 2015.

VAN GINKEL, Frederik W. *et al.* Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 14363-14367, 2003.

VOELZ, Kerstin; MAY, Robin C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 6, p. 835-846, 2010.

WANG, Lijian; CHERAYIL, Bobby J. Ironing out the wrinkles in host defense: interactions between iron homeostasis and innate immunity. **Journal of innate immunity**, v. 1, n. 5, p. 455-464, 2009.

WARREN, J. S. *et al.* Intrapulmonary tumor necrosis factor triggers local platelet-activating factor production in rat immune complex alveolitis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 63, n. 6, p. 746-754, 1990.

WARREN, Jeffrey S. Relationship between interleukin-1 beta and platelet-activating factor in the pathogenesis of acute immune complex alveolitis in the rat. **The American journal of pathology**, v. 141, n. 3, p. 551, 1992.

WEINBERGER, Daniel M. *et al.* Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 6, p. e1000476, 2009.

WEISER, Jeffrey N.; FERREIRA, Daniela M.; PATON, James C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 355-367, 2018.

WELTE, T.; TORRES, A.; NATHWANI, D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. **Thorax**, v. 67, n. 1, p. 71-79, 2012.

WHO- World Health Organization. Pneumonia. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2021.

WHO- World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/Pneumo_hib/en/>. Acesso em 10 de fevereiro de 2021.

WORMLEY, Floyd L. *et al.* Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing *Cryptococcus neoformans* strain. **Infection and immunity**, v. 75, n. 3, p. 1453-1462, 2007.

WU, Yuet *et al.* Lethal coinfection of *Influenza virus* and *Streptococcus pneumoniae* lowers antibody response to *Influenza virus* in lung and reduces numbers of germinal

center B cells, T follicular helper cells, and plasma cells in mediastinal lymph Node. **Journal of virology**, v. 89, n. 4, p. 2013-2023, 2015.

XAVIER, D. O. *et al.* Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 3, p. 220-225, 2010.

XUE, Xinying *et al.* Cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii*: 2 case reports and literature review. **Medicine**, v. 99, n. 50, 2020.

ZAFAR, M. Ammar *et al.* Host-to-host transmission of *Streptococcus pneumoniae* is driven by its inflammatory toxin, pneumolysin. **Cell host & microbe**, v. 21, n. 1, p. 73-83, 2017.

ZARAGOZA, Oscar. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490-501, 2019.

ANEXO**Certificado de aprovação para o uso de animais (Protocolo nº 313/2016) pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMG).**

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
UFMG	
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 313/2016	
Título do projeto: Caracterização da influência de Streptococcus pneumoniae na progressão da criptococose experimental.	
Finalidade: Pesquisa	
Pesquisador responsável: Daniel de Assis Santos	
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas	
Departamento: Departamento de Microbiologia	
Situação atual: Decisão Final	
Aprovado na reunião do dia 05/12/2016.	
Belo Horizonte, 06/12/2016.	
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 - cetee@prpq.ufmg.br	