

LORENA VÍVIEN NEVES DE OLIVEIRA

**Influência do vírus Influenza A na progressão da criptococose
experimental**

Belo Horizonte, MG

2017

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

LORENA VÍVIEN NEVES DE OLIVEIRA

**Influência do vírus Influenza A na progressão da criptococose
experimental**

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

(Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG)

Co-orientadores:

Dr. Alexandre Magalhães Vieira Machado

(Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR – Fiocruz/MG)

Prof^a. Dr^a. Danielle da Glória Souza

(Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG)

Belo Horizonte, MG

Outubro, 2017

COLABORADORES

- Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes
(Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG)

- Dr. Marcelo Antônio Pascoal-Xavier
(Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR – Fiocruz/MG)

- Prof^a. Dr^a. Gabriella Freitas Ferreira
(Departamento de Farmácia, UFJF–Campus Governador Valadares/MG)

- Supervisores no exterior: Prof^a. Tania Christine Sorrell, M.D., Ph.D.; Prof^a. Julianne T. Djordjevic, M.D., Ph.D.; e Dr^a. Keren Francis, M.D., Ph.D.
(Marie Bashir Institute for Infectious Diseases and Biosecurity, The University of Sydney and Westmead Institute for Medical Research, Sydney, Australia)

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo dom da vida, por ter me dado força diante das dificuldades e por me guiar, confortar, amparar e permitir minha vitória diante dos obstáculos.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade, acolhimento e incentivo durante o doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Santos, pela oportunidade de ser sua aluna e por ter me despertado o interesse pela microbiologia. Pelas contribuições para meu crescimento profissional, científico e intelectual, tendo participação essencial na minha formação. Obrigada por todo o apoio, sabedoria, atenção, dedicação, ensinamentos e conselhos, e além de tudo pela confiança e amizade que vão além da orientação.

Aos meus coorientadores, Prof^a Dr^a. Danielle da Glória e Dr. Alexandre Machado, pela parceria e orientação, pelos ensinamentos e palavras de apoio e incentivo, por estarem sempre dispostos a auxiliar e acrescentar opiniões essenciais para concretização desse trabalho.

À professora Dr^a. Maria Aparecida de Resende Stoianoff, por todo o carinho, apoio e amparo, sempre disposta a ajudar no que fosse necessário e por compartilhar, com toda alegria, seus conhecimentos em micologia.

Às professoras Dr^a. Tania Sorrell, Dr^a Julianne Djordjevic e à Dr^a Keren Francis pela oportunidade de realizar o Doutorado Sanduíche, pelos ensinamentos e por me acolherem tão bem em seu laboratório na University of Sydney e no Westmead Institute for Medical Research (Sydney, Australia).

Aos professores Caio Tavares Fagundes (UFMG), Gabriella Ferreira (UFJF), Marcelo Pascoal-Xavier (CPqRR – Fiocruz/MG), pela parceria e colaboração.

Aos professores da banca examinadora, Dr. Frederico Soriani, Dr^a. Vívian Costa, Dr^a. Susana Frases e Dr^a. Milena Oliveira, por gentilmente aceitarem o convite.

Aos demais professores do departamento pelos ensinamentos, aprendizado e inspiração. À coordenação, à secretaria e aos técnicos-administrativos do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG por todo suporte durante o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, por cuidarem de mim durante esses quatro anos e pela boa convivência em equipe, pelo auxílio e por tornarem o local de

trabalho um ambiente saudável e descontraído. Vocês sempre deixam meus dias mais alegres!!

Às grandes amigas e amigos que ganhei no doutorado: Noelly, Hellem, Bia, Jujú, Marli, Elúzia, Lud, Alide, Silvinha, Carol, Rafa, Doug, Guga, Paulo, Léo, And's, obrigada pela amizade e companheirismo, por todos os momentos de alegria e incentivo durante as dificuldades enfrentadas em nossa caminhada.

Às companheiras da República Celeste, Patrícia Carvalho e Lolla (minha bebezinha), por todo esse tempo de convivência e companheirismo, pela cumplicidade, risadas, músicas, happy hours, etc, deixando meus dias sempre mais felizes. E, junto com a Pati, às demais amigas de república Thay, Flávia e Patrícia Lopes, obrigada por cuidarem de mim e me fazer sentir em casa e amenizar as saudades da família.

Ao querido “*Chá da Tarde*” pela verdadeira amizade, carinho e cumplicidade. Pelos momentos de descontração e com direito a muitas desgustações e conversas de alta qualidade, obrigada a vocês por participarem ativamente da minha jornada e me apoiarem sempre. Amizades que vou levar para a vida!

Aos amigos que ganhei em Sydney/Austrália durante o doutorado sanduíche, em especial ao “*Team Sydney*” que com tanto carinho um acolheu o outro estando do outro lado do mundo tão longe do Brasil, sou grata pelo apoio e momentos de descontração.

Às amigas de longas datas Elisa, Sylvinha, Rayanne e Mirella, que mesmo de longe se fazem presentes em minha vida, sempre torcendo pelo meu sucesso.

Ao Vitor pelo amor, carinho e companheirismo, por fazer meus dias mais felizes e por recarregar minhas energias quando já não havia mais força.

À minha Mãe e Alcindo, pela paciência, compreensão, incentivo, conforto, ensinamentos, valores concedidos e pelo incansável apoio durante minha caminhada.

Ao meu Pai, Raqueline e Luiza, pois mesmo distantes não deixaram de estar presentes em minha vida, sempre me apoiando e torcendo por meu sucesso.

Aos meus irmãos John, Jordan e Jeff pelos momentos de descontração, amparo e compreensão e principalmente à minha irmã Larissa que foi fundamental para minha chegada até aqui, por partilhar momentos de felicidades e pela cumplicidade.

A toda minha família, em especial aos meus avós, por se preocuparem com a minha formação e com a minha felicidade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me apoiaram e torceram para que eu atingisse meus objetivos.

RESUMO

O vírus Influenza A (IAV) afeta milhões de pessoas anualmente e predispõe a infecções bacterianas secundárias. A inalação de fungo pertencente ao complexo *Cryptococcus* causa inicialmente doença pulmonar com posterior meningoencefalite criptocócica. A doença pulmonar subjacente é um forte fator de risco para o desenvolvimento de criptococose por *C. gattii*, embora o efeito da infecção concomitante com IAV não tenha sido estudado. Diante do exposto, desenvolvemos um modelo *in vivo* de coinfeção por Influenza A H1N1 e *C. gattii*. A coinfeção resultou em um significativo aumento na morbidade e letalidade precoce da criptococose. A infecção concomitante do vírus influenza A e *C. gattii* resultou no aumento de lesões histopatológicas pulmonares e da carga fúngica no SNC, quando os animais foram infectados na fase de multiplicação do vírus Influenza. Além disso, a presença do IAV modifica a resposta inflamatória no hospedeiro, com maior recrutamento de neutrófilos e macrófagos no local da infecção. IAV também resultou na indução da produção de interferons do tipo I (IFN- α 4/ β), mas levou a diminuição significativa dos níveis de IFN- γ , o que pode estar associado com o comprometimento da resposta imune frente à infecção por *Cryptococcus* durante a coinfeção. Ainda, a levedura apresenta modificações em sua estrutura durante a coinfeção, com maior tamanho celular e capsular, e se torna mais eletronegativa. Além disso, a atividade dos macrófagos fica prejudicada, com diminuição da fagocitose, menor produção de ROS e menor atividade fungicida de macrófagos infectados com IAV, resultando em aumento da proliferação intracelular do fungo no interior de macrófagos, mesmo após indução por IFN- γ . Todas essas alterações sucedidas à coinfeção auxiliam o fungo em sua sobrevivência no hospedeiro e aumentam sua virulência durante a coinfeção. Em conclusão, a infecção pelo vírus Influenza A deve ser considerada um fator de risco para criptococose, agravando o quadro da doença e culminando na letalidade precoce de camundongos coinfectados. Logo, este estudo é essencial para compreensão da interação entre esses agentes infecciosos e o hospedeiro durante coinfeções.

Palavras chaves: Criptococose, *Cryptococcus gattii*, vírus Influenza A H1N1, coinfeção, fator de risco.

ABSTRACT

Influenza A virus (IAV) infects millions of people annually and predisposes to secondary bacterial infections. Inhalation of fungi within the *Cryptococcus* complex causes pulmonary disease with secondary meningo-encephalitis. Underlying pulmonary disease is a strong risk factor for development of *C. gattii* cryptococcosis though the effect of concurrent infection with IAV has not been studied. We developed an *in vivo* model of Influenza A H1N1 and *C. gattii* coinfection. Coinfection resulted in a major increase in morbidity and mortality, with severe lung damage and a high brain fungal burden when mice were infected in the acute phase of influenza multiplication. Furthermore, IAV alters the host response to *C. gattii*, leading to recruitment of significantly more neutrophils and macrophages into the lungs. Moreover, IAV induced the production of type 1 interferons (IFN- α 4/ β) and the levels of IFN- γ were significantly reduced, which can be associated with impairment of the immune response to *Cryptococcus* during coinfection. In addition, the yeast presents morphological modifications during coinfection with increase of capsule and cell body, and higher electronegativity. Phagocytosis, killing of cryptococci and production of reactive oxygen species (ROS) by IAV-infected macrophages were reduced, independent of previous IFN- γ stimulation, leading to increased proliferation of the fungus within macrophages. In conclusion, IAV infection is a predisposing factor for severe disease and adverse outcomes in mice coinfecting with *C. gattii*.

Keywords: Cryptococcosis, *Cryptococcus gattii*, Influenza A H1N1 virus, coinfection, risk factor.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
AIDS	Sigla do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANOVA	Análise de variância
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
BBB	Sigla do inglês, <i>blood-brain barrier</i>
BMDMs	Sigla do inglês, <i>Bone marrow derived macrophages</i>
BSA	Sigla do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>
cm	Centímetro
Cg	<i>Cryptococcus gattii</i>
Cn	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
CXCL-1	Sigla do inglês, <i>C-X-C motif ligand 1</i>
DCs	Sigla do inglês, Dendritic cells
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Sigla do inglês, <i>Dulbeccos completa Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Sigla do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FS	Fotossensibilizador
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucuronoxilomanana
HA	Hemaglutinina
HE	Hematoxilina-Eosina
HBEC	Células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (hCMEC/D3)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAV	Sigla do inglês, <i>Influenza A Virus</i>
IFN	Interferon

IL	Interleucina
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
LBA	Lavado Broncoalvelar
LED	Sigla do inglês, <i>Light Emitting Diode</i>
mg	Miligramas
mL	Militros
MDCK	Sigla do inglês, <i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MPO	Mieloperoxidase
MOI	Sigla do inglês, <i>multiplicity of infection</i>
NA	Neuraminidase
NAG	Sigla do inglês, N-acetylglucosaminidase
NK	Sigla do inglês, <i>Natural Killer cells</i>
NO	Sigla do inglês, <i>Nitric oxide</i>
PBMC	Sigla do inglês, <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Sigla do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Sigla do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PDT	Sigla do inglês, <i>Photodynamic therapy</i> (Terapia fotodinâmica)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Sigla do inglês, <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
PRN	Peroxinitrito
ROS	Sigla do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	Sigla do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute médium</i>
SHIRPA	SmithKline Beecham Pharmaceuticals/ Harwell MRC Mouse Genome Centre/ ImperialCollege/ Royal London Hospital/ Phenotype Assessment
SNC	Sistema nervoso central
Th	Sigla do inglês, <i>T helper</i>
TLR	Sigla do inglês, <i>Toll Like Receptor</i>
TNF- α	Sigla do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFP	Unidades Formadoras de Placas Virais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sorotipos e genótipos de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	15
Figura 2: Distribuição geográfica e tipos moleculares dos isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> na América Central e América do Sul.....	17
Figura 3: Estratégias utilizadas por <i>Cryptococcus</i> para atravessar a barreira-hematoencefálica. (A) Cavalinho de Tróia. (B) Transcitose	19
Figura 4: Esquematização de uma partícula viral de Influenza A.....	24
Figura 5: Diagrama esquemático do ciclo de vida do vírus Influenza A	26
Figura 6: Esquema da coinfeção entre o vírus Influenza A H1N1 PR8 e <i>C. gattii</i>	42
Figura 7: Estratégia para análise do perfil imunológico de camundongos infectados com o vírus Influenza A (IAV).....	48
Figura 8: Esquema da coinfeção <i>in vitro</i> de macrófagos (BMDMs) com ambos os vírus influenza A (IAV) e/ou <i>C. gattii</i> (Cg)	51
Figura 9: Curva de sobrevivência de camundongos coinfectados com o vírus Influenza A (IAV) e <i>C. gattii</i> (Cg)	56
Figura 10: Curva de sobrevivência de camundongos infectados ou coinfectados com o vírus Influenza A e diferentes linhagens de <i>Cryptococcus</i>	57
Figura 11: Curva de sobrevivência e tratamento de animais coinfectados com Vírus Influenza A (IAV) e <i>C. gattii</i> (Cg)	58
Figura 12: Perfil comportamental e variação de peso dos animais coinfectados com Vírus Influenza A (IAV) e <i>C. gattii</i> (Cg)	59
Figura 13: Carga viral (UFP/g de órgão) dos pulmões (A) e carga fúngica (UFC/g de órgão) recuperada dos pulmões (B); lavado broncoalveolar (C); cérebro (D); fígado (E) e baço (F) dos animais eutanasiados após 4 dias de infecção por <i>C. gattii</i> , coinfectados com o vírus Influenza PR8	60
Figura 14: Análise histopatológica dos pulmões.....	62
Figura 15: Análise morfométrica de <i>C. gattii</i>	63
Figura 16: Quantificação de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos após três dias de infecção por influenza A comparado a animais não infectados	65
Figura 17: Recrutamento celular nos pulmões induzido pelo vírus influenza A (IAV), após três dias da infecção viral, comparado a animais não infectados (NI).....	66
Figura 18: Ensaio de fagocitose <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , proliferação intracelular (IPR) e produção de espécies reativas (ROS, PRN e NO)	67
Figura 19: Modelo <i>in vitro</i> de transmigração de <i>C. gattii</i> através da barreira hematoencefálica	69
Figura 20: Manutenção da integridade e permeabilidade da BBB desafiadas com o vírus Influenza A	70
Figura 21: Ensaio de fagocitose e transmigração utilizando células humanas PBMC e CD14.....	71
Figura 22: Esquema representando a resposta imune do hospedeiro durante a coinfeção pelo vírus Influenza A (IAV) e <i>C. gattii</i> (Cg).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempos de inoculação viral de animais coinfectados com <i>C. gattii</i>	41
Tabela 2. Classificação das categorias funcionais da bateria SHIRPA de acordo com os parâmetros avaliados.	43

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1 Criptococose e <i>Cryptococcus</i> spp.....	13
1.1.1 Fatores de virulência.....	19
1.1.2 Tratamento.....	21
1.2 Influenza A.....	23
1.2.1 Coinfecções: Influenza <i>versus</i> microorganismos.....	28
1.2.2 Tratamento.....	30
1.3 Resposta imune contra microorganismos.....	32
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	37
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 Linhagens e cultivo de <i>Cryptococcus gattii</i> e do vírus influenza A H1N1.....	39
4.2 Estratégia experimental <i>in vivo</i>	40
4.3 Modelo experimental para testes de coinfecção entre o vírus influenza A e o fungo <i>Cryptococcus gattii</i>	40
4.4 Estratégia utilizada para experimentos com o tempo selecionado para coinfecção entre <i>C. gattii</i> e o vírus Influenza A.....	42
4.5 Análise Comportamental – Protocolo SHIRPA.....	43
4.6 Curva de sobrevivência de animais coinfetados tratados com o antiviral Oseltamivir e o antifúngico Fluconazol.....	44
4.7 Análise do perfil da criptococose <i>in vivo</i>	45
4.7.1 Quantificação da carga fúngica e viral.....	46
4.7.2 Quantificação da taxa de fagocitose <i>in vivo</i> via lavado broncoalveolar.....	46
4.7.3 Análise morfológica da célula e cápsula polissacarídica de <i>C. gattii</i>	47
4.7.4 Análise histopatológica.....	47
4.8 Avaliação da resposta inflamatória via dosagem de mediadores inflamatórios... ..	48
4.8.1 Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas e da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG).....	48
4.8.2 Análise de citometria de fluxo.....	49
4.9 Ensaios de fagocitose e proliferação intracelular (IPR).....	50

4.10	Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio, peroxinitrito e óxido nítrico no ensaio de fagocitose	52
4.11	Modelo celular <i>in vitro</i> de barreira hematoencefálica (BBB) e análise de sua integridade frente ao <i>C. gattii</i> , ao vírus Influenza A e à coinfeção	53
4.12	Análise estatística dos dados	55
5	RESULTADOS	56
5.1	Avaliação da curva de sobrevida e do perfil comportamental (SHIRPA).....	56
5.2	Mensuração da carga fúngica e viral nos órgãos alvos	60
5.3	Análise histopatológica	61
5.4	Análise morfométrica de <i>C. gattii</i> recuperado do lavado broncoalveolar	62
5.5	Análise do perfil inflamatório de camundongos infectados com o vírus Influenza A	64
5.6	Ensaio de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação do estresse oxidativo (ROS, PRN e NO)	67
5.7	Transmigração de <i>Cryptococcus</i> durante a coinfeção, e a manutenção da integridade e permeabilidade da membrana da BBB	68
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÕES.....	79
8	PERSPECTIVAS.....	81
9	ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS	82
	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	117
	ANEXOS	130

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Criptococose e *Cryptococcus* spp

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica com uma distribuição geográfica universal, embora os casos clínicos sejam mais frequentes na África, Ásia e América (Negroni, 2012; Cogliati, 2013; Chen, Meyer e Sorrell, 2014). São estimados mais de 223 mil casos de meningite criptocócica por ano em todo o mundo, resultando em cerca de 180 mil mortes anualmente (Rajasingham et al., 2017). Além disso, a criptococose é responsável por 15 a 17% dos óbitos de pacientes com AIDS (Williamson et al., 2017; Rajasingham et al., 2017). Sua incidência varia em diferentes partes do planeta apresentando-se entre 5 a 10% na Europa Ocidental e Estados Unidos da América (EUA) e mais de 20% na África Central e leste da Ásia (Larsen et al., 2004; Mitchell e Perfect, 1995). De acordo com Pappalardo e Melhem (2003), no Brasil a letalidade da infecção criptocócica com ou sem condição predisponente, situa-se entre 45% a 65%.

A criptococose ocorre com maior frequência em adultos, especialmente em indivíduos do sexo masculino (McClelland et al., 2013), a maior prevalência nesse sexo pode ser atribuída a maior exposição dos homens ao reservatório ambiental do fungo, influências hormonais e/ou predisposição genética (Chen et al., 2000). Recentemente, McClelland e colaboradores (2013) sugeriram que a interação entre *Cryptococcus neoformans* e a testosterona poderia resultar na maior incidência em homens (McClelland et al., 2013). *Cryptococcus* spp. pode também infectar animais como cães, gatos, animais migratórios como botos e golfinhos, além de animais nativos como os coalas na Austrália, porém nenhuma transmissão de criptococose entre animais ou seres humanos foi relatada (Lin e Heitman, 2006; Springer e Chaturvedi, 2010).

A doença é causada por leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus* pertencentes ao filo Basidiomycota (Butts et al., 2013; Almeida et al., 2015). São conhecidas aproximadamente 80 espécies de *Cryptococcus*, das quais *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* destacam-se como os agentes etiológicos mais comuns da criptococose humana e em animais (Li e Mody, 2010; Chen, Meyer e Sorrell, 2014). Adicionalmente, outras espécies, como *C. albidus* e *C. laurentii*, podem raramente causar doença em pacientes com imunidade comprometida (Li e Mody, 2010). A maioria das espécies de *Cryptococcus* são não-fermentadoras, hidrolisam amido, assimilam inositol e produzem urease. Estas, assim como as características

morfológicas da cápsula e a rara presença de pseudohifas, as distinguem de outras leveduras clinicamente importantes (Mitchell e Perfect, 1995).

A criptococose foi diagnosticada pela primeira vez por Busse and Buschke em uma mulher no ano 1894 (Busse, 1894; Buschke, 1895), e o agente etiológico foi inicialmente identificado como *Saccharomyces neoformans*. Somente em 1901 esse patógeno foi classificado no gênero *Cryptococcus* pela ausência de ascósporos e o primeiro relato de criptococose meningoencefálica ocorreu em 1905 por von Hansemann (Hansemann, 1905; Mitchell e Perfect, 1995; Negroni, 2012). Já o *C. neoformans var gattii* foi primeiramente descrito depois de ser isolado de um paciente com leucemia em 1970 (Vanbreuseghem e Takashio, 1970; Bovers, Hagen e Boekhout, 2008; Ma e May, 2009).

Até recentemente *C. neoformans* e *C. gattii* eram classificados como variedades da mesma espécie, atualmente esses dois fungos são consideradas espécies distintas, principalmente devido à descoberta de sua forma sexual (Chaturvedi e Chaturvedi, 2011), denominadas *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora*, respectivamente. Além disso, inúmeras diferenças já evidenciavam sua separação em duas espécies, tais como distribuição geográfica, nichos ecológicos, epidemiologia, características bioquímicas, moleculares, patogenicidade e quadros clínicos (Cogliati, 2013). Adicionalmente, estudos moleculares demonstraram que essas duas espécies evoluíram filogeneticamente em duas entidades distintas a aproximadamente 37,5 milhões de anos (Byrnes III, 2011).

A separação antigênica das linhagens de *Cryptococcus* nos cinco sorotipos (A; B; C; D e o híbrido AD) é realizada com base nas diferenças estruturais do polissacarídeo capsular glucoronoxilomanano (GXM; composto por ácido glucurônico, xilose e manose), que constitui cerca de 90% da cápsula dessa levedura (Nishikawa et al., 2003; Shun e Mody, 2010). Portanto, baseado em estudos filogenéticos e diferenças antigênicas da cápsula, essas espécies se classificam em *C. neoformans* sorotipos A (*C. neoformans var. grubii*), D (*C. neoformans var. neoformans*) e A/D, enquanto *C. gattii* é classificado em sorotipos B e C (Voelz e May, 2010; Kronstad et al., 2011; Cogliati, 2013; Chen, Meyer e Sorrell, 2014).

O complexo de espécies *C. neoformans-C. gattii* é ainda subdividido em nove principais tipos moleculares ou genótipos. *C. neoformans var. grubii* corresponde aos tipos moleculares VNI, VNII e VNB; *C. neoformans var. neoformans* corresponde ao genótipo VNIV e o híbrido AD corresponde ao tipo molecular VNIII. Já a espécie *C.*

gattii corresponde a quatro tipos moleculares distintos: VGI, VGII, VGIII e VGIV (Ma e May, 2009; Engelthaler et al., 2014), nos quais, VGI e VGII são os tipos moleculares mais prevalentes, enquanto, VGIII e VGIV são mais raros (Chayakulkeere e Perfect, 2006; Engelthaler et al., 2014). Essa classificação está mais bem detalhada na figura 1.

Mesmo após muitos anos de estudos fenotípicos e de genética molecular, surgiu em 2015 uma nova proposta para revisão taxonômica do complexo de espécies de *Cryptococcus* (Hagen et al., 2015). As duas variedades atualmente dentro do complexo *C. neoformans* foram elevadas para o nível de espécies, e o mesmo foi feito para cinco genótipos dentro do complexo de *C. gattii*. Resultando no reconhecimento de sete espécies distintas no complexo *Cryptococcus gattii* / *Cryptococcus neoformans*, sendo elas *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus deneoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus bacillisporus*, *Cryptococcus deuteroformans*, *Cryptococcus tetragattii* e *Cryptococcus decagattii* (Hagen et al., 2015). Porém, o caso de múltiplas espécies patogênicas no gênero *Cryptococcus* tem levado a um grande debate a respeito do tema, devido a algumas questões, tais como, o fato de que a proposta taxonômica pode ser prematura; as novas espécies não podem ser identificadas usando apenas testes fenotípicos; e os novos nomes das espécies ainda são confusos (Kwon-Chung et al., 2017). Porém, a nova nomenclatura ainda não está totalmente definida e recentemente Hagen e colaboradores (2017) destacam a importância da resolução da nomenclatura fúngica.

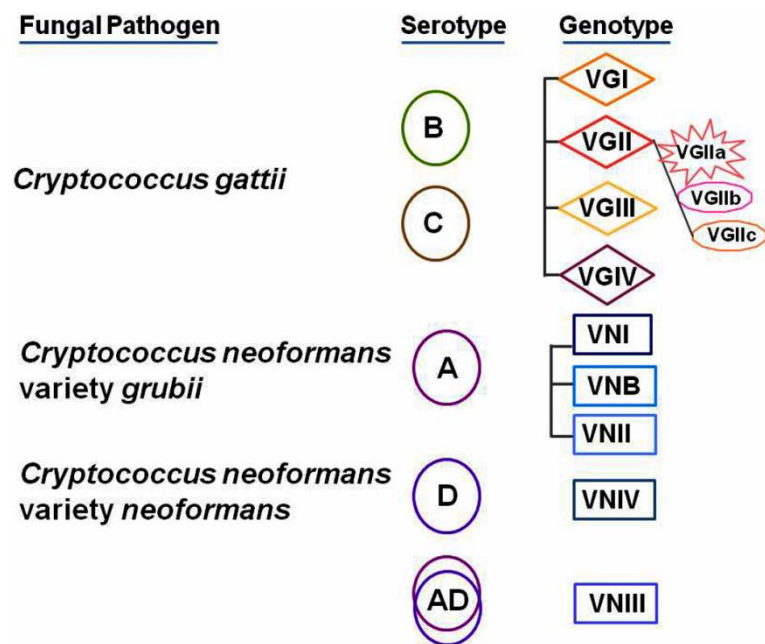


Figura 1: Sorotipos e genótipos de *C. gattii* e *C. neoformans*. (Fonte: Chaturvedi e Chaturvedi, 2011)

Nesse contexto, *C. gattii* é encontrado principalmente em espécies arbóreas, associados a cascas, frutos e madeiras em decomposição. Este é considerado um patógeno primário emergente que causa criptococose sistêmica também em hospedeiros imunocompetentes (Li e Mody, 2010; Lester et al., 2011; Soares et al., 2011; Negroni, 2012; Cogliati et al., 2016). *C. neoformans*, geralmente é encontrado no solo e em fezes de aves, como pombos (considerados hospedeiros intermediários), e também é associado a ocos de árvores em decomposição como *C. gattii* (Cogliati et al., 2016); este é considerado um patógeno oportunista por sua tendência em acometer indivíduos imunocomprometidos, particularmente aqueles infectados com HIV (Del Valle e Pina-Oviedo, 2006; Li e Mody, 2010; Bielska and May, 2016). As duas espécies podem ser diferenciadas pela assimilação de malato ou glicina, resistência a canavanina, repressão da enzima desaminase de creatina por seu subproduto amônia e outras reações bioquímicas (Mitchell e Perfect, 1995).

Baseado em estudos de caso em pacientes hospitalizados, os principais fatores de predisposição para infecções por *C. gattii* e *C. neoformans* são HIV, transplantes de órgãos, doenças linfoproliferativas, terapias imunossupressoras, altas doses de corticoesteróides, cirrose hepática descompensada, supressão imune mediada por células, doenças autoimunes, mas também pode afetar pacientes com pneumonia, outros distúrbios pulmonares e câncer invasivo (Li e Mody, 2010; Lin et al., 2015). Tais estudos excluem das suas análises pacientes com doenças infecciosas auto-limitantes como, por exemplo, infecções bacterianas facilmente tratadas e infecções virais (MacDougall et al., 2011; Pappas, 2013). Particularmente, de acordo com Pappas (2013), 17 a 22 % dos pacientes HIV negativos e não transplantados são considerados indivíduos saudáveis. Esses pacientes manifestam complicações mais graves e sequelas neurológicas permanentes, comparados àqueles com imunodeficiência (Pappas, 2013).

Casos clínicos causados por *C. gattii* são presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais com incidência na zona temperada do sul da Austrália (Chen, Meyer e Sorrell, 2014) e em países da América Latina, com alta prevalência no Brasil, em destaque nas regiões Nordeste e Norte do país (Nishikawa et al., 2003; Pappalardo e Melhem, 2003; Chen, Meyer e Sorrell, 2014). Em contrapartida, a ocorrência de um surto no ano 1999 em Vancouver, Canadá, demonstrou a expansão do nicho geográfico desse patógeno para regiões temperadas e, desde então esse patógeno emergente na América do Norte tem sido extensivamente estudado (Datta, Bartlett e Marr, 2009; Hoang, Philips e Galanis, 2011; Marr, 2012; Engelthaler et al., 2014). A incidência dos

casos clínicos nessa epidemia entre os anos de 1999 a 2003 foi 37 vezes maior que o observado na Austrália, onde *C. gattii* é endêmico (Chen et al., 2000; Kidd et al., 2004).

A figura 2 demonstra a distribuição geográfica dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* na América Central e América do Sul, bem como seus respectivos tipos moleculares. O Brasil merece importância em relação ao *Cryptococcus* spp., visto que entre os isolados do complexo de espécies de *Cryptococcus* relatados na América Central e do Sul, 53% foram relatados no Brasil (Cogliati, 2013). Além disso, todos os sorotipos e tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii*, com exceção do tipo VGIV, são encontrados no Brasil (Nishikawa et al., 2003; Trilles et al., 2008). É importante ressaltar que a criptococose foi a maior causa de mortalidade ocasionada por micoses sistêmicas no Brasil em 2010, e foi responsável pelo maior número de internações hospitalares no período de 2000 a 2007 considerando estas micoses, de acordo com o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), Ministério da saúde, Brasil (2013).

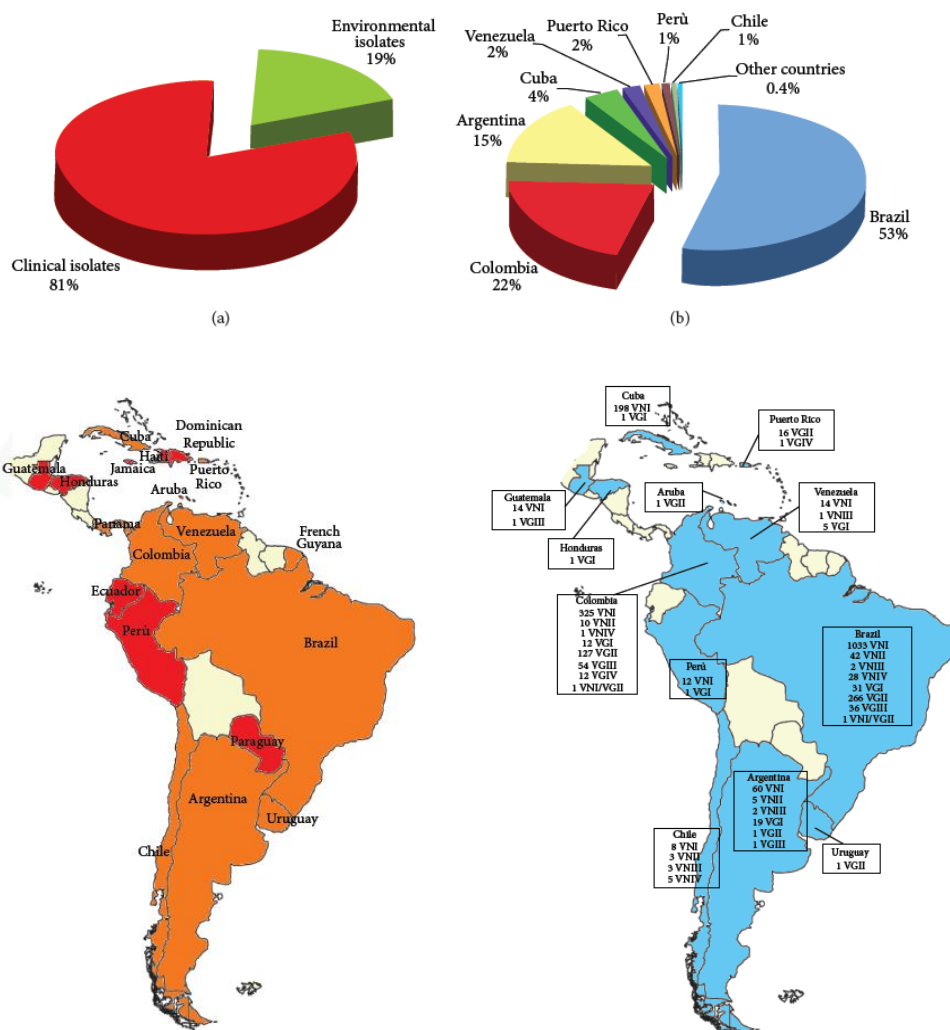


Figura 2: Distribuição geográfica e tipos moleculares dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* na América Central e América do Sul. (Fonte: Adaptado de Cogliati, 2013)

Acredita-se que a infecção por *Cryptococcus* spp. seja adquirida pela inalação de basidiósporos ou células dessecadas da levedura, denominados propágulos infecciosos, que se depositam nos alvéolos devido ao seu pequeno tamanho (1-3 µm), comprometendo inicialmente o pulmão (Retini et al., 2001; Kronstad et al., 2011; Lester et al., 2011). A partir de então, o fungo pode disseminar-se via hematogênica para outros órgãos, tais como, cérebro, fígado, pele, próstata, trato urinário, olhos, miocárdio e ossos, embora os dois principais órgãos acometidos pela criptococose são os pulmões e o cérebro (Severo et al., 2009). A disseminação para o sistema nervoso central (SNC) é comum e uma consequência do número de organismos inalado, virulência da linhagem e do estado imune do hospedeiro (Lester et al., 2011), induzindo quadros de encefalite, meningite e meningoencefalite, que são os sintomas mais graves da criptococose (Datta, Bartlett e Marr, 2009; Chen, Meyer e Sorrell, 2014). Essas manifestações causam alta morbidade neurológica devido à hipertensão intracraniana associada, o que pode levar o indivíduo até ao óbito (Franco-Paredes et al., 2015).

Comparado a *C. neoformans*, infecções por *C. gattii* geralmente levam a uma maior incidência de lesões granulomatosas (criptococomas) no pulmão e cérebro (Perfect, 2012), com mais casos de lesões cerebrais e hidrocefalia, além de apresentar sintomas mais prolongados e estar mais associado com sequelas neurológicas, cuja morbidade é aumentada devido à baixa e mais lenta resposta a terapia com antifúngicos (Datta, Bartlett e Marr, 2009; Chen, Playford e Sorrell, 2010).

Para que *Cryptococcus* alcance o SNC, o fungo deve em primeiro lugar conseguir vencer a barreira hematoencefálica (BBB, sigla do inglês *blood-brain barrier*), que protege o organismo de agentes infecciosos e tóxicos circulantes na corrente sanguínea (Vu et al., 2014). Embora o mecanismo para este neurotropismo ainda não seja totalmente compreendido, *Cryptococcus* atravessa a BBB diretamente pelo mecanismo de transcitose, ou dentro de macrófagos que atuam como “Cavalo de Tróia”, como mostrado na figura 3 (Del Poeta e Casadevall, 2012; Coelho et al., 2013; Sorrell et al., 2016; Santiago-Tirado et al., 2017). Nesse último caso, macrófagos com células fúngicas internalizadas cruzam a BBB, evitando assim a exposição da levedura ao sistema imune do hospedeiro (Santiago-Tirado et al., 2017). Durante o mecanismo de transcitose, as células fúngicas podem exibir uma morfologia distinta, com diminuição de tamanho celular e cápsula e exibir um formato ovóide, apresentando um broto na superfície celular, sugerindo que uma mudança morfológica possa ocorrer para ajudar no processo de transmigração (figura 3) (Kronstad et al., 2011; Johnston e May, 2013).

Outro mecanismo, conhecido como “transferência lateral” consiste na capacidade de *Cryptococcus* infectar diretamente um macrófago a partir de outro sem que estes fungos estejam expostos ao ambiente extracelular (Ma e May, 2009; Kronstad et al., 2011). A migração paracelular também pode ocorrer, mas apenas depois da ruptura mecânica ou bioquímica das junções do endotélio cerebral da BBB, o que pode levar à abertura da BBB para facilitar a entrada no SNC (Vu et al., 2014). O tropismo para o SNC está relacionado principalmente à alta concentração de substratos no líquido assimiláveis pelo fungo, como tiamina, ácido glutâmico, carboidratos e minerais (Severo et al., 1999; Franco-Paredes et al., 2015), além da presença abundante de catecolaminas, substâncias que podem ser usadas pelo fungo para síntese de um importante fator de virulência, a melanina. Outra hipótese que justifica essa preferência pelo SNC é o fato dele servir como “refúgio” para o fungo contra a resposta imune do hospedeiro (Lin e Heitman, 2006; Franco-Paredes et al., 2015).

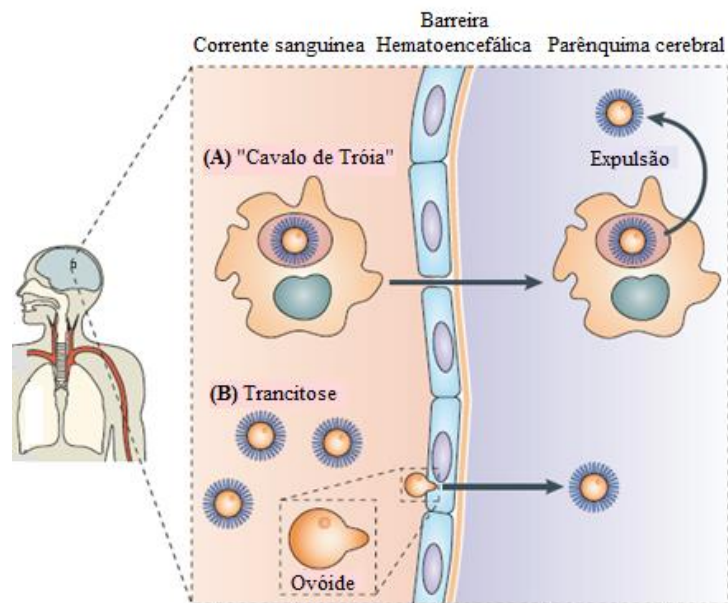


Figura 3: Estratégias utilizadas por *Cryptococcus* para atravessar a barreira-hematoencefálica. (A) Cavalo de Tróia. (B) Transcitose. (Adaptado de Kronstad et al., 2011)

1.1.1 Fatores de virulência

A patogênese da criptococose é multifatorial e, sem dúvida, envolve a ação conjunta de vários fatores de virulência para representar um fenótipo virulento (Kozel, 1995; Ma e May, 2009). Ao contrário das potentes toxinas produzidas por muitos agentes patogênicos bacterianos, *Cryptococcus* spp. não parece gerar produtos

notoriamente tóxicos que contribuem diretamente para sinais e sintomas da criptococose (Kozel, 1995). As contribuições da maioria dos fatores de virulência conhecidos para o processo da doença são sutis e, em muitos casos, estão relacionados com a melhor sobrevivência da levedura no hospedeiro (Hoang, Philips e Galanis, 2011).

Existem diversos fatores de virulência que ajudam *C. neoformans* e *C. gattii* se tornar patógenos de sucesso. O polissacarídeo capsular, a síntese de melanina, a tolerância térmica, a capacidade para combater os danos oxidativos do hospedeiro, a reprodução sexuada através do *mating-type*, as estratégias para parasitar fagócitos e mecanismos para romper a barreira hematoencefálica são fundamentais para a virulência (Tantisiriwat e Powderly, 2004; Chaturvedi e Chaturvedi, 2011; Hoang, Philips e Galanis, 2011). Vários metabólitos da levedura, como acetoina e dihidroxiacetona, desempenham um papel secundário na virulência, como inibição da função de neutrófilos (Lester et al., 2011).

A cápsula é considerada o principal fator de virulência desses fungos, e também responsável por diversos efeitos inibitórios sobre a resposta imune. Segundo Kozel (1995), a cápsula polissacarídea foi o primeiro fator de virulência de *Cryptococcus* spp. a ser definitivamente relacionado com a capacidade de produzir a doença. A mesma é constituída por uma rede de polissacarídeos, onde a glucoronoxilomanana (GXM) é o componente majoritário com cerca de 90% da cápsula de *Cryptococcus*, em menores quantidades a galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas também são encontradas no envelope celular (Zaragoza et al., 2008; Urai et al., 2016). O tamanho da cápsula varia de acordo com o genótipo e condições de crescimento, normalmente as leveduras apresentam pequenas cápsulas quando no ambiente e cápsulas espessas durante a infecção (Bovers, Hagen e Boekhout, 2008; Urai et al., 2016).

Em geral, células encapsuladas são menos fagocitadas ou mortas por neutrófilos, monócitos ou macrófagos no mesmo grau como as células não capsuladas (Bovers, Hagen e Boekhout, 2008). Outro importante papel da cápsula é sua capacidade de aderência, e ainda os antígenos capsulares ajudam na remoção das selectinas de superfícies endoteliais, inibindo assim a migração de neutrófilos para o tecido, o que favorece a infecção nos pulmões (Lester et al., 2011).

A síntese de melanina é catalisada pela enzima lacase e pode ocorrer quando catecolaminas estão presentes (Kronstad et al., 2011). No ambiente, a melanina confere proteção contra altas temperaturas, radiações ultravioletas, congelamento e descongelamento das células (Brown, Campbell e Lodge, 2007). As leveduras

melanizadas são menos susceptíveis aos agentes oxidantes, aos fagócitos, à ação dos antifúngicos e modifica a resposta imune, acentuando a virulência do fungo (Tantisiriwat e Powderly, 2004; Nosanchuk, Stark e Casadevall, 2015). A importância deste pigmento está relacionada ao neurotropismo de *C. gattii*, uma vez que o SNC é rico em dopamina, que serve como substrato para a síntese de melanina (Lin e Heitman, 2006; Nosanchuk, Stark e Casadevall, 2015). Além disso, a capacidade de crescer a 37°C, temperatura fisiológica do hospedeiro, é essencial para o patógeno (Hoang, Philips e Galanis, 2011). *C. neoformans* e *C. gattii* são os únicos *Tremellales* que podem crescer otimamente acima de 30°C e mutantes de *C. neoformans* sensíveis à temperatura possuem virulência atenuada (Bovers, Hagen e Boekhout, 2008).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos finais do metabolismo de células do sistema imune, que possuem a função de eliminar os agentes invasores. Para escapar dessa ação do hospedeiro, *Cryptococcus* apresenta um sistema detoxificante de ROS, que incluem enzimas superóxido dismutase (SOD1 e SOD2), catalases e peroxidases (Chaturvedi e Chaturvedi, 2011; Almeida, Wolf e Casadevall, 2015). A catalase e a peroxidase convertem peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular e são enzimas antioxidantes importantes para a virulência, além de contribuírem para a menor susceptibilidade de *C. gattii* aos agentes antifúngicos (Ferreira et al., 2013). Outras características como produção de urease, fosfolipases, manitol e proteinases também tem sido associadas à virulência deste patógeno (Ma e May, 2009; Kronstad et al., 2011; Almeida, Wolf e Casadevall, 2015).

1.1.2 Tratamento

O tratamento das micoses sistêmicas é problemático em comparação com infecções bacterianas, pois o número de antifúngicos disponível é pequeno, com dificuldade na produção e muitos efeitos colaterais, além disso, existe a possibilidade de resistência (Blanco e Garcia, 2008). Três classes de medicamentos são os mais utilizados no tratamento da criptococose: polienos, triazóis e análogos de nucleosídeos. Os polienos incluem a anfotericina B e suas formulações. Os triazóis incluem o fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol. Na classe dos análogos nucleosídicos, a 5-fluocitosina é a mais conhecida (Blyth, Palasathiran e O'Brien, 2007; Butts et al., 2013).

A anfotericina B é um polieno que age diretamente no ergosterol da membrana citoplasmática fúngica formando poros com desestabilização da mesma, o que aumenta

a permeabilidade e culmina em lise celular e morte do microrganismo (Pammi, 2012). Até 1955, a criptococose era invariavelmente fatal, com o aparecimento da anfotericina B, antibiótico produzido pelo *Streptomyces nodosus* de poder fungicida evidente, este aspecto modificou-se e sua ação anticriptocócica tem sido demonstrada (Reis-filho et al., 1985). Apesar de ser um dos principais agentes para o tratamento da criptococose, a anfotericina B pode interagir com o colesterol da membrana celular dos mamíferos, causando efeitos adversos em 80% dos pacientes, como a nefrotoxicidade, que restringe seu uso em paciente com complicações renais (Nooney, Matthews e Burnie, 2005).

Com quadros de toxicidade bem evidentes, em especial a nefrotoxicidade, várias formulações foram desenvolvidas para minimizar os efeitos colaterais produzidos pela anfotericina B (Spellberg, Filler e Edwards Jr., 2006; Testoni, Smith e Benjamin Jr., 2012). As formulações a base de anfotericina B (lipossomal, complexo lipídico e dispersão coloidal) possuem a capacidade de oferecer maior dose com menores níveis de toxicidade, porém são significativamente mais caras; são reservadas para pacientes com reações de tolerância à infusão ou disfunção renal durante a administração da anfotericina B convencional (desoxicolato) e devem ser evitadas em infecções que envolvam o trato urinário (Blyth, Palasathiran e O'Brien, 2007; Pammi, 2012).

Na classe de antifúngicos conhecida como azóis, caracterizam-se drogas responsáveis por inibir a biossíntese do ergosterol, predominante na membrana plasmática dos fungos, possuindo duas subclasses: imidazóis (miconazol, cetoconazol), e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol) (Proia, 2006). Os últimos têm superado os primeiros para o tratamento de infecções devido à sua maior eficácia e baixa toxicidade (Shanon e Sorrel, 2007). Tais antifúngicos atuam inibindo a enzima fúngica dependente do citocromo P-450, lanosterol 14alfa-desmetilase, que está envolvida na síntese de ergosterol (Proia, 2006). A inibição desta enzima leva ao acúmulo de precursores do ergosterol, que são tóxicos e inibem o crescimento celular e gera uma membrana com estrutura e função alterada, diminuição da viabilidade do ergosterol e alteração da permeabilidade celular (Casalinuovo, Di Francesco e Garaci, 2004).

O fluconazol é um triazol de primeira geração com ação fungistática e um dos antifúngicos mais prescritos em todo mundo; possui boa tolerabilidade sendo considerado seguro, com boa atividade clínica contra *Cryptococcus* spp. (Santos Jr. et al., 2005). O fluconazol é de extrema importância para a terapia anticriptocócica, já que apresenta alta eficácia, menor toxicidade, administração oral e parenteral, estabilidade

metabólica, facilidade de distribuição nos líquidos corpóreos, além ser eliminado via excreção renal (Casalnuovo, Di Francesco e Garaci, 2004; Fica, 2004).

Vários relatos de cura têm feito com que o fluconazol seja empregado no tratamento das diversas formas clínicas da criptococose (Santos Jr. et al., 2005). Além disso, é o único com penetração adequada no sistema nervoso central, durante o tratamento da meningoencefalite (Perfect e Durack, 1985). Esses fatores fazem com que o fluconazol seja a droga de escolha para manutenção do tratamento da criptococose a longo prazo e em casos iniciais de doença pulmonar ou local (Saag et al., 2000; Casalnuovo, Di Francesco e Garaci, 2004). A utilização do itraconazol tem-se mostrado uma ferramenta auxiliar no tratamento da criptococose. Este é utilizado no tratamento da criptococose pulmonar, e também administrado em combinação com anfotericina B nas formas disseminadas (Chayakulkeere e Perfect, 2006).

Em contrapartida, um dos problemas quanto à administração prolongada de azólicos, como o fluconazol, é o desenvolvimento de resistência (Revankar et al., 2004). O fluconazol apesar de vantajoso para terapia anticriptocócica vem sendo relatado em casos de resistência adquirida por alguns fungos como *C. neoformans* e *C. gattii* (Corrêa et al., 1999). Apesar de bem tolerados, os triazólicos antifúngicos tem significativo potencial de interações medicamentosas por meio da sua interferência com o metabolismo oxidativo da citocromo P-450 (Groll e Kolve, 2004).

1.2 Influenza A

Os vírus Influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae*, são classificados em três tipos A, B e C, e são vírus envelopados de forma esférica ou filamentosa (Tong et al., 2013). Viroses causadas por influenza A infectam uma grande variedade de espécies de aves e mamíferos, incluindo o ser humano. Ao contrário, somente um subtipo do vírus influenza B é conhecido por infectar humanos, o que diminui as chances de pandemias por influenza B, embora eles possam causar doença respiratória grave. Quanto a viroses causadas por influenza C, que é o tipo menos estudado, este pode causar leve doença respiratória no homem e em alguns animais (Arias et al., 2009).

No que se refere ao vírus influenza A, seu genoma viral é caracterizado por 8 segmentos de RNA de fita única com polaridade negativa (Bouvier e Palese, 2008). E de acordo com características antigênicas, os vírus influenza A ainda se subdividem em diferentes subtipos, devido a duas glicoproteínas de superfície, são elas a hemaglutinina (subtipos H1-H18) e neuraminidase (subtipos N1-N11) (Tong et al., 2013). A

hemaglutinina (HA) é a proteína responsável pela fixação do vírus ao receptor celular (as moléculas de ácido siálico) e penetração na célula hospedeira, e é o principal antígeno do vírus (Krammer e Palese, 2015). A neuraminidase (NA) atua removendo o ácido siálico que recobre as células epiteliais do trato respiratório (onde o vírus influenza se multiplica) e do próprio vírus, evitando assim a aglutinação das partículas virais entre si e facilitando a sua propagação no meio extracelular (Bouvier e Palese, 2008).

A partícula viral de Influenza A (figura 4) tem um envelope lipídico, no qual três proteínas virais estão inseridas, as glicoproteínas já mencionadas acima (hemaglutinina e neuraminidase) e pequenas quantidades de uma proteína transmembrânica M2 (Wang e Palese, 2009). Essa bicamada lipídica contendo HA, NA e M2 envolve uma camada proteica interna formada pela proteína de matriz M1, que por sua vez engloba o genoma viral. O genoma encontra-se em associação com nucleoproteínas e pequenas quantidades das proteínas PB1, PB2 e PA, formando o complexo RNA polimerase (Bouvier e Palese, 2008; Arias et al., 2009), responsável pela transcrição e replicação viral (Arranz et al., 2012). A proteína não estrutural NS1 também está presente no interior da partícula viral e é uma proteína multifuncional no processo de infecção viral. NS1, uma antagonista do interferon (IFN) do tipo I, desempenha um importante papel na infecção por restringir a resposta imune do hospedeiro (Schnitzler e Schnitzler, 2009; Zhang et al., 2014).

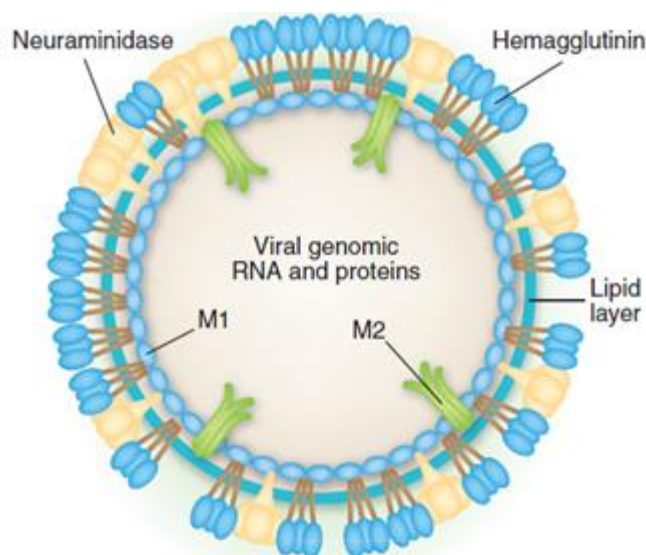


Figura 4: Esquematização de uma partícula viral de Influenza A. (Adaptado de Wang e Palese, 2009)

A maioria das proteínas virais desempenha funções relacionadas com a formação do cenário de virulência nas viroses por influenza A. Por exemplo, as proteínas virais auxiliam na adaptação da infecção e transmissão entre novas espécies hospedeiras (que muitas vezes atuam como reservatório desses vírus), têm capacidade de modular a resposta imune e de se replicar eficientemente a baixas temperaturas, entre outras funções (Arias et al., 2009). As proteínas HA (fixação às células do hospedeiro), PB1-F2 (fator pró-apoptótico), PB2 (replicação viral) e NS1 (inibe IFN-I) são as mais bem caracterizadas com relação ao seu potencial patogênico (Schnitzler e Schnitzler, 2009). Em outra vertente, temos duas proteínas associadas com o desenvolvimento de resistência a drogas antivirais, a NA e M2 (Arias et al., 2009).

Também já é bem relatado que a virulência em influenza A pode ser diretamente influenciada pela troca de segmentos genômicos completos ou através de mutações pontuais em diferentes proteínas virais (Pinsent et al., 2016). Embora se suspeite de estarem associadas com o aumento da patogenicidade, algumas mutações não necessariamente alteram a antigenicidade do vírus ou sua susceptibilidade a drogas antivirais, nem parece proporcionar ao vírus o aumento de sua transmissibilidade (Girard et al., 2010).

O ciclo de vida do vírus Influenza A (figura 5) pode ser dividido nas seguintes fases: a penetração do vírus (adsorção viral) na célula hospedeira (fixação, endocitose, fusão e desnudamento); entrada de ribonucleoproteínas virais (vRNPs) para o núcleo celular; replicação, transcrição e tradução do genoma viral; exportação dos vRNPs do núcleo para o citoplasma; e, por fim, montagem e brotamento na membrana plasmática para saída do vírus da célula hospedeira (Samji, 2009; Watanabe et al., 2010).

Descrevendo resumidamente o ciclo viral, a infecção pelo vírus Influenza A começa com a fixação viral através da glicoproteínas HA a receptores da célula hospedeira, então, o vírus entra na célula por endocitose mediada por receptor. A acidificação do endossoma causa uma mudança conformacional na proteína HA viral, expondo um peptídeo de fusão que facilita a fusão das membranas do endossoma com a viral, liberando complexos RNPs virais no citoplasma da célula hospedeira (York e Fodor, 2013). O complexo vRNP é subsequentemente transportado para o núcleo, onde ocorrem a replicação e transcrição do genoma viral. O mRNA é agora exportado para o citoplasma para tradução das proteínas virais. As primeiras proteínas virais, isto é, aquelas necessárias para a replicação e transcrição, são transportadas de volta para o núcleo. No final do ciclo de multiplicação, as proteínas NS2 e M1 facilitam a

exportação de vRNPs recém-sintetizadas para fora do núcleo. A montagem da progênie viral ocorre na membrana plasmática e são liberadas por brotamento, e os novos vírus estão prontos para infectar novas células do hospedeiro (Neumann, Noda e Kawaoka, 2009).

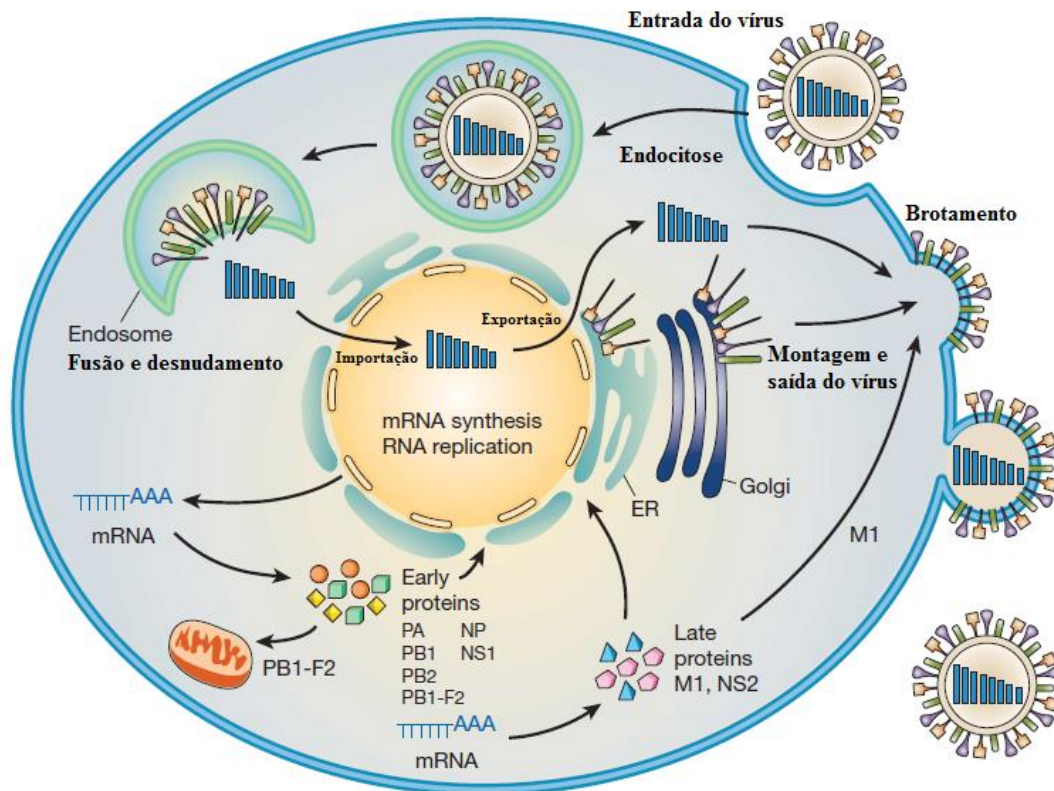


Figura 5: Diagrama esquemático do ciclo de vida do vírus Influenza A. (Adaptado de Neumann, Noda e Kawaoka, 2009)

Após o estabelecimento da infecção, o vírus influenza causa uma doença que pode variar em gravidade, desde infecções assintomáticas, passando por infecções respiratórias agudas do trato respiratório superior com resultado benigno e até infecções graves do trato respiratório inferior, cuja evolução é muitas vezes fatal. A gravidade das infecções causadas pelo vírus influenza está tanto relacionada a fatores de virulência virais, quanto àqueles ligados ao hospedeiro; mais especificamente à resposta excessiva ou desbalanceada do sistema imunológico (Kuiken et al., 2012). Por exemplo, a produção excessiva de citocinas e quimiocinas pode resultar no recrutamento excessivo de neutrófilos e células mononucleares para o sítio de infecção, resultando em lesões do tecido respiratório e piora do prognóstico do paciente (Garcia et al., 2013; Short et al., 2014). A infecção de caráter benigno do vírus influenza A, geralmente estão associados

a sintomas, tais como, febre, tosse e dor de garganta, podendo apresentar manifestações gastrointestinais como diarreia e vômitos (Machado, 2009; Carneiro et al., 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês '*World Health Organization*'), a transmissão do vírus influenza em humanos normalmente ocorre nos meses de inverno, mas o momento exato e a duração da temporada do vírus variam por país e por ano. A temporada de influenza no hemisfério Sul pode começar em maio, mas normalmente têm picos em torno de agosto (WHO, 2015). Ainda segundo a WHO (2015), em 2015 no Brasil e na América do Sul tropical o vírus predominantemente encontrado foi o influenza A H3N2. Em menor escala, o vírus influenza A H1N1 (pandêmico de 2009) e o influenza B também circularam por toda a América do Sul tropical, incluindo o Brasil. No nosso país, no ano de 2015, foram confirmados 11.092 casos de infecções respiratórias agudas graves de Janeiro até o final de Setembro, quase 30% menor em comparação a 2014 e a taxa de mortalidade por influenza nesse período foi de 0,07 a cada 100.000 pessoas (WHO, 2015).

Diante disso, infecções pelo vírus Influenza são de grande interesse na saúde pública por causar significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo (Arias et al., 2009; Saxena et al., 2017). Estima-se que epidemias sazonais ocasionadas por este vírus é responsável por causar 2-5 milhões de casos graves de doença e até 250-500 mil mortes por ano no mundo. As taxas de infecções anuais globais podem acometer cerca de 5-10% adultos e 20-30% crianças (Krammer e Palese, 2015). Além das epidemias sazonais que ocorrem anualmente, os vírus Influenza causam pandemias em intervalos irregulares que ocasionam mortes de milhões de pessoas em todo o mundo (Schnitzler e Schnitzler, 2009). A pandemia do vírus Influenza de 1918 comprometeu cerca de 40 milhões de vidas e foi causada por um vírus H1N1. Desde então, as pandemias têm sido causadas por H2N2, em 1957, por H3N2, em 1968, que ocorreram durante o século passado e a primeira pandemia do século 21, ocorreu em 2009, causada mais uma vez por H1N1 atualmente em circulação, esta última que foi gerada por rearranjo de genes entre um vírus circulante na população de suínos da América do Norte e da Eurásia (Arias et al., 2009; Krammer e Palese, 2015).

Um surto em 1997 com o vírus influenza altamente patogênico em aves, subtipo H5N1, marcou o primeiro relato de infecções fatais em humanos com vírus da gripe aviária. Este surto foi controlado com a retirada das aves vivas em Hong Kong (Schnitzler e Schnitzler, 2009). Após um período de surtos locais e esporádicos, um novo surto começou em 2003 e este vírus se espalhou para a Europa e África,

aumentando sua relevância. Infecções por H5N1 resultaram em infecções respiratórias graves em humanos, causando pneumonia grave e linfopenia com altas taxas de mortalidade. No entanto, transmissão de humano para humano não foi relatada (Schultz-Cherry e McCullers, 2006).

Em um mundo altamente móvel nos dias de hoje, os vírus têm mais oportunidades do que nunca para disseminar globalmente. O que deve servir de alerta, pois o crescimento no alcance, volume e velocidade da mobilidade humana durante o século passado têm conectado patógenos com novas populações, e contribuiu para um crescimento nas epidemias emergentes e reemergentes. Enquanto que as mudanças sociais e ecológicas nos locais de destino podem ditar se a disseminação irá enraizar-se, em vez de morrer. O estabelecimento de novas rotas de viagem entre os locais previamente desconectados também contribuiu para esse fenômeno (Pybus, Tatem e Lemay, 2015).

1.2.1 Coinfecções: Influenza *versus* microorganismos

Já são bem relatados casos de graves infecções do trato respiratório associados a infecções secundárias causadas por bactérias gram-positivas (Morens et al., 2008; Aebi et al., 2010; Duvigneau et al., 2016). Uma vez que indivíduos infectados pelo vírus da Influenza muitas vezes se tornam susceptíveis à coinfeção com uma bactéria patogênica e, conseqüentemente, a morbidade e mortalidade são significativamente aumentadas (Smith et al., 2013).

Streptococcus pneumoniae, *Streptococcus pyogenes*, e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) são as bactérias mais frequentemente associadas às infecções virais por Influenza, embora coinfeção com outras bactérias, inclusive Influenza-*Legionella pneumophila* também já foi relatado. Esse tipo de coinfeção entre infecção primária por Influenza e pneumonia bacteriana secundária tem sido documentado desde o final do século XIX (Kash et al., 2011; Jamieson et al., 2013). Sendo que o principal exemplo de infecções agudas simultâneas é o aumento da susceptibilidade à infecção bacteriana respiratória durante uma infecção de influenza em curso. Na verdade, essa suscetibilidade é a principal causa de morte da infecção por influenza, especialmente nos idosos (Pasman, 2012). Por exemplo, durante a "gripe espanhola" de 1918, que foi a pandemia mais grave já registrada, 95% da mortalidade foi atribuída à coinfeção bacteriana. Na qual, várias cepas de bactérias foram

encontradas em amostras de escarro de cadáveres, incluindo *Streptococcus pneumoniae* (Cauley e Vella, 2015).

Os mecanismos que levam à coinfeção Influenza-bactérias ainda são mal compreendidos, o que torna difícil o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes. Isto é particularmente importante uma vez que o uso de antibióticos tem pouco impacto nas taxas de mortalidade de pneumonia bacteriana associada à influenza (Liu et al., 2013; Smith et al., 2013). Além do que, vírus e bactérias resistentes a drogas estão se tornando cada vez mais comuns com o uso generalizado e abusivo de antibióticos ou medicamentos antivirais, incluindo inibidores da neuraminidase (Thorlund et al., 2011). O uso abusivo pode ter consequências desastrosas, uma vez que as taxas de mortalidade relativamente baixas (1-2%) podem ser suficientes para causar um enorme número de vítimas em uma escala global (Cauley e Vella, 2015).

Adicionalmente, têm sido descritos casos de aspergilose pulmonar invasiva após infecção por Influenza A, demonstrando a ocorrência de coinfeção entre o vírus e um fungo (Kwon et al., 2013; Crum-Cianflone, 2016; Nulens et al., 2017). Além disso, a infecção pelo vírus influenza é causada por defeitos mediados por células, interrupção da eliminação normal ciliar e a leucopenia, e estes podem ser também os principais fatores de doença fúngica invasiva (Kwon et al., 2013). Após a pandemia por influenza A/H1N1 em 2009, foi demonstrado que a aspergilose invasiva é uma complicação muito mais frequente em pacientes com H1N1 gravemente doentes e que o uso de esteroides sistêmicos contribuem para esta superinfecção. Foi inclusive sugerido que doses elevadas de corticosteroides podem ser novos fatores de risco predisponentes em pacientes imunocompetentes à aspergilose invasiva (Lat et al., 2010; Wauters et al., 2012). No entanto, vários relatos têm descrito que a aspergilose pulmonar invasiva ocorre após a infecção por influenza mesmo em pacientes imunocompetentes que não usaram esteroides sistêmicos (Hasejima et al., 2005; Kwon et al., 2013).

Apesar da coinfeção entre o vírus influenza e o fungo *Aspergillus* spp. ser bem descrita (Alshabani et al., 2015; Crum-Cianflone, 2016; Nulens et al., 2017), existem poucos estudos de coinfeção com outros importantes patógenos respiratórios fúngicos, como o *Cryptococcus* spp.. As consequências da coinfeção entre o vírus influenza e *Cryptococcus* spp. são escassas na literatura. Ao nosso conhecimento, estão disponíveis apenas dois relatos de casos descrevendo a ocorrência de meningite criptocócica secundária à infecção viral por influenza A H1N1. Em 2012, Hosseinnezhad e Rapose, relataram a primeira coinfeção entre Influenza-*Cryptococcus*. O estudo demonstrou

infecção viral por Influenza A H1N1 persistente, tratada com Oseltamivir e depois com corticoesteróides. E mais tarde, depois de um novo estado febril do paciente, o diagnóstico do fluido cefalorraquidiano revelou *C. neoformans*. Uma terapia antifúngica foi iniciada e os esteróides foram gradualmente reduzidos. O paciente foi tratado com sucesso com Anfotericina B lipossomal intravenosa (450mg por dia) e por flucitosina via oral (3750mg quatro vezes ao dia) durante 4 semanas, seguido de consolidação e terapia supressiva com fluconazol (400 mg por dia) (Hosseinnezhad e Rapose, 2012). O segundo relato de caso, por Gupta e colaboradores (2015), demonstrou também que o paciente adquiriu meningite criptocócica, causada por *C. neoformans*, secundária à infecção por influenza A H1N1. Contudo, o paciente era imunocomprometido devido à infecção por HIV e apresentava histórico de tuberculose pulmonar. O paciente não resistiu a coinfeção e veio a óbito (Gupta et al., 2015).

Portanto, com a ocorrência de novas epidemias anualmente, ou até mesmo a possibilidade de pandemias causadas pelo vírus Influenza A, este estudo demonstra a importância de se propor um modelo de coinfeção entre *Cryptococcus* spp. e o vírus influenza A. Uma vez que ambos os potenciais patógenos acometem o trato respiratório do hospedeiro e já se conhece coinfeções vírus-bactéria com difícil prognóstico, e também um relato de caso entre Influenza e *C. neoformans*. Ainda, o surgimento de coinfeções entre *C. gattii* e o vírus influenza A pode ser fatal para o paciente, e seu estudo como medida preventiva é extremamente relevante para entendermos a progressão da doença e inclusive o modo de disseminação para o SNC pelo fungo, quando esses dois patógenos estão colonizando o mesmo hospedeiro.

1.2.2 Tratamento

Atualmente, estão disponíveis vacinas e duas classes de medicamentos antivirais licenciadas para o combate do vírus influenza A: os inibidores do canal de íons e inibidores da neuraminidase (Arias et al., 2009).

A classe dos adamantanos (cloridrato de amantadina e rimantadina) contém propriedades antivirais por bloquear o canal de íons formados pela proteína M2, esses canais são criticamente necessários para a liberação de vRNPs dentro das células hospedeiras (Schnitzler e Schnitzler, 2009). Oseltamivir e Zanamivir são os dois inibidores da neuraminidase (NA) disponíveis até o momento. Essas drogas atuam na fase onde os novos vírus sintetizados são liberados das células infectadas, pois interferem na atividade enzimática da proteína NA o que prejudica a liberação eficaz

dessas novas partículas virais (Neumann, Noda e Kawaoka, 2009). Novas drogas antivirais que tem como alvo a NA, proteínas da polimerase, ou peptídeos antivirais bloqueando a entrada do vírus são investigados (Neumann, Noda e Kawaoka, 2009; Schnitzler e Schnitzler, 2009).

O tratamento com oseltamivir é eficaz se iniciado dentro das primeiras 36 horas depois da infecção viral (Girard et al., 2010). Entretanto, a maioria dos vírus influenza que infectam os homens, tais como, H3N2 e H1N1, incluindo o H1N1 da pandemia de 2009, são resistentes a amantadina/ rimantadina (Watanabe et al., 2010). Além disso, a frequência com que influenza H1N1 está se tornando resistente ao oseltamivir é motivo de preocupação e, portanto, deve-se destacar a urgente necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e vacinas antivirais (Nicoll et al., 2008).

Existem também vacinas disponíveis como medida preventiva eficaz contra as linhagens do vírus influenza A e B circulantes atualmente na população. Entretanto, elas induzem imunidade limitada e específica à linhagem, por isso precisam ser reformuladas quase todos os anos devido à variação antigênica viral (Krammer e Palese, 2015). Desde os anos 1940 são desenvolvidas vacinas no combate ao vírus Influenza. As vacinas primitivas utilizaram o vírus completamente inativado, esse tipo de vacina baseia-se no uso de vírus intactos que tenham sido quimicamente (por exemplo, com formalina ou β -propiolactona) ou fisicamente (por exemplo, com luz ultravioleta) inativados (Francis et al., 1945; Salk et al., 1945).

O surgimento de novas pandemias induziu o desenvolvimento de vacinas trivalentes inativadas (TIVs), e logo mais, com o avanço do conhecimento da antigenicidade viral e estudos sobre reatogenicidade de algumas formulações em crianças levaram ao desenvolvimento de vacinas divididas e de subunidades. No primeiro caso, as vacinas são divididas após tratamento destes vírus com detergente e/ou éter. Já no último caso, a purificação da hemaglutinina (HA) e da neuraminidase (NA) do vírus irá resultar nas vacinas de subunidades (Krammer e Palese, 2015). Em adição às vacinas com o influenza inativado (IIVs), vacinas com o influenza atenuado (LAIV) são também utilizadas (Belshe et al., 2007). Essa última é frequentemente sensível à temperatura e adaptada ao frio, e é capaz de replicar eficientemente no trato respiratório superior, mas não no trato respiratório inferior (Jin e Subbarao, 2014). Acredita-se que as vacinas LAIVs sejam superiores às inativadas, uma vez que induzem resposta imune celular e humoral (Belshe et al., 2007).

Após avaliarem 34 estudos clínicos randomizados, Tricco e colaboradores (2013), concluíram que a eficácia de vacinas LAIVs em crianças (grupo de idade indicado para esse tipo de vacina) é aproximadamente 83%, ao passo que a eficácia das vacinas TIVs em adultos é cerca de 75%. Muito embora as vacinas apresentem um curto período de efeito protetor e sua eficácia de 75% estar muito longe do ótimo e diminuir drasticamente quando analisamos os idosos (que são os mais susceptíveis ao influenza vírus), elas ainda são uma importante ferramenta de saúde pública e confere uma boa proteção contra infecções sazonais do vírus influenza A (Tricco et al., 2013; Krammer e Palese, 2015). Portanto, as vacinas são consideradas uma das mais efetivas ferramentas, não somente por prevenir a propagação do influenza vírus, mas também para diminuir a gravidade e o impacto da doença (Girard et al., 2010).

Como visto, para controle e prevenção de infecções por influenza A são disponíveis vacinas e drogas antivirais. Entretanto, provavelmente o mundo não está bem preparado para novas pandemias, porque medicamentos antivirais podem não estar em oferta suficiente no momento, devido a grande procura, e os vírus podem adquirir resistência para os fármacos disponíveis. Além disso, a produção de uma vacina eficiente contra a nova linhagem emergente levaria cerca de 3 a 6 meses, durante o qual o vírus pode se espalhar globalmente e atingir substancialmente os sistemas de saúde e a economia global (Neumann, Noda e Kawaoka, 2009).

1.3 Resposta imune contra microorganismos

A evolução da doença é simplesmente o resultado do embate entre os mecanismos de patogenicidade dos agentes infecciosos e os mecanismos de resistência do hospedeiro, conduzindo à eliminação da infecção ou a sua progressão de acordo com o desequilíbrio destes mecanismos (Blanco e Garcia, 2008). O sistema imunológico atua numa rede de cooperação para proteção contra os diversos agentes infecciosos, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares (Machado et al., 2004).

A grande maioria dos microrganismos provenientes do meio externo ou mesmo aqueles que fazem parte da microbiota do hospedeiro, não produzem nenhum dano ao hospedeiro, desde que as barreiras naturais de defesa estejam íntegras, impedindo sua instalação e, por conseguinte, a doença. E, portanto, é sabido que para quase todas as doenças infecciosas, o número de indivíduos expostos à infecção é bem superior ao dos que apresentam doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições de destruir

esses microrganismos e impedir a progressão da infecção. Isso mostra como a resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos. Em contraste, as deficiências imunológicas, estão fortemente associadas com a susceptibilidade a infecções (Janeway, 2001; Machado et al., 2004).

Dentre os mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções, há inúmeras alternativas imunológicas, desde respostas menos específicas (imunidade inata) até mecanismos adaptativos sofisticados, que são induzidos especificamente na presença de um agente infeccioso (imunidade adaptativa). Uma das características distinguíveis da resposta adaptativa mediada por células e humoral, é que elas possuem memória para a molécula que inicialmente as ativou (Blanco e Garcia, 2008). O primeiro sinal de defesa do hospedeiro é visível, e não mais importante que as respostas mais específicas, consistem na presença de barreiras físicas na forma de pele e membranas mucosas. E ainda contam com a presença de uma microbiota comensal que impedem ou dificultam a colonização por agentes patogênicos (Romani, 2004).

Quando o agente infeccioso ultrapassa as barreiras físicas, ele se depara com células pouco específicas da imunidade inata, por exemplo, membranas celulares, receptores celulares, células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos e outros leucócitos, tais como as células *natural killers*) e diversos fatores humorais. Apesar de certa falta de especificidade (Romani, 2004), a imunidade inata confere um rápido reconhecimento da infecção microbiana por meio de receptores e efetivamente distingue o próprio do não próprio, porém com capacidade limitada para diferenciar um microrganismo do outro, além de funcionar do mesmo modo contra a maioria dos agentes infecciosos. Essa resposta, por sua vez, ativa mecanismos da resposta imune adaptativa por sinais específicos (Tierney et al., 2012; Brunke e Hube, 2013).

Os macrófagos são as primeiras células do sistema imunes a chegarem ao local da infecção para combate do patógeno, e são importantíssimos para o reconhecimento do agente infeccioso e inclusive para o recrutamento de outras células de defesa e na ativação de uma resposta adaptativa (humoral e celular) mais especializada (Lietzén et al., 2011; Full e Gack, 2014), que culmina na posterior chegada de neutrófilos e linfócitos. É sabido que os linfócitos T agem mais tarde na infecção e é conhecido por desempenhar também um papel no melhoramento da gravidade, resolução e/ou duração da infecção por influenza (Krammer e Palese, 2015).

A função dos TLRs (receptores do tipo Toll) e PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) no reconhecimento das infecções fúngicas e sua participação na

defesa contra *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *C. neoformans*, *Pneumocystis* e *Coccidioides* foram bem descritos (Lewis, Viale e Kontoyiannis, 2012; Ramirez-Ortiz e Means, 2012; Mueller-Loebnitz et al., 2013), embora, de uma forma geral, infecções bacterianas e virais tem sido o foco principal de pesquisa (Blanco e Garcia, 2008). As células dendríticas (DCs) são um grupo de células apresentadoras de antígenos, importantes na ativação do sistema imune inato e adquirido para promover proteção contra *C. neoformans*, *C. albicans* e *A. fumigatus* (Ramirez-Ortiz e Means, 2012; Wager et al., 2016). As células dendríticas são consideradas sentinelas do sistema imune, são células fagocíticas inatas, mas também atuam como apresentadoras de antígenos para células T, para direcionar uma resposta imune adaptativa (Wager et al., 2016).

O desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa é essencial para superar a infecção fúngica (Jarvis et al., 2013). Dentre estas, a indução da resposta imune mediada por células é crítica e auxilia na morte de *Cryptococcus* spp., tanto diretamente, por efeitos citotóxicos, ou indiretamente por funções regulatórias de células *natural killer* (NK) ou linfócitos T (Voelz e May, 2010). A criptococose é iniciada no pulmão após a inalação de células fúngicas que podem penetrar nos alvéolos (Hardison et al., 2012). Os microrganismos são inicialmente confrontados pelos macrófagos alveolares que reconhecem polissacarídeos capsulares, como GXM (O'Meara et al., 2013), e fagocitam os fungos (Voelz, Lammas e May, 2009).

Durante esse início do processo, as células T produzem citocinas ativadoras de macrófagos com formação de granuloma e destruição do fungo intracelular (Jarvis et al., 2013). Porém, *C. neoformans* é reconhecido como um patógeno intracelular facultativo e tem desenvolvido mecanismos para se adaptar em ambientes intracelulares e escapar da resposta imune do hospedeiro (Voelz e May, 2010; O'Meara et al., 2013).

Para que o organismo se proteja contra infecções causadas por patógenos como *C. gattii*, é necessário que haja um balanço entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (Siddiqui et al., 2005; Ma e May, 2009). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) estimulam a atividade fagocítica contra células criptocócicas, além de IFN- γ ser importante para controle da infecção granulomatosa, embora sua prevalência exacerbada seja prejudicial ao hospedeiro. Em contrapartida, citocinas como interleucina 10 (IL-10) atua como inibidor macrofágico e aumentam a susceptibilidade à *Cryptococcus* spp. (Ma e May, 2009; Hardison et al., 2012).

Alguns estudos sugeriram a participação das quimiocinas na migração de neutrófilos para o pulmão dos camundongos durante a infecção. CXCL1/KC é uma

quimiciona que possui importante papel no recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção (Fagundes *et al.*, 2012). Adicionalmente, a atividade anti-*Cryptococcus* exercida pelas células do sistema imune parece ser dependente de outros mediadores solúveis além das citocinas. A produção de óxido nítrico (NO) por leucócitos possui um papel importante na defesa, por sua ação microbicida (Rivera *et al.*, 2002; Fang, 2004).

A influência do tratamento com fluconazol em modelo murino de infecção intracerebral causada por *C. gattii* foi avaliada por Mendes e colaboradores (2010), no qual a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , foi necessária para combater a infecção. E um estudo comparativo entre *C. gattii* e *C. neoformans* foi realizado por Schoffelen e colaboradores (2013), que observaram que *C. gattii* induz uma produção mais acentuada de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e, IL-17 e IL-22) em comparação a *C. neoformans*, e que os receptores TLR-4 e TLR-9 participam da resposta do hospedeiro contra *C. gattii*.

Da mesma forma como ocorre em *Cryptococcus*, a defesa imune contra infecção pelo vírus Influenza A é iniciada por uma resposta inata nos pulmões. As células efectoras primordiais envolvidas, no caso do vírus, são macrófagos e as células dendríticas que matam os microrganismos através da fagocitose, apresenta antígenos às células T, e produzem citocinas e quimiocinas (Full e Gack, 2014). Essa resposta imune inicial é essencial para o desenvolvimento de uma posterior resposta imune adaptativa, que provém específica proteção através da resposta mediada por células e humoral, o que é necessário para uma eliminação completa da infecção viral (Lietzén *et al.*, 2011).

Inicialmente, os PAMPs virais ou seu material genético são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), e macrófagos induzem uma cascata de citocinas, que resulta na resposta antiviral mediada por interferon do tipo I (IFN- α e IFN- β), bem como a ativação de resposta pró-inflamatória. Os PRRs envolvidos no reconhecimento viral podem ser os receptores TLRs e os RLRs (receptores do tipo RIG-I). IFNs tipo I sinalizam por meio do receptor IFN- α (IFNAR), e induzem a regulação positiva de genes que ativam tanto a imunidade inata e adaptativa para rapidamente controlar a replicação viral (Lietzén *et al.*, 2011; Coulombe *et al.*, 2014). Além disso, os macrófagos infectados pode sofrer apoptose (morte celular programada) para restringir a disseminação do vírus (Herold *et al.*, 2012) e melhorar a imunidade mediada por célula T através de apresentação cruzada de antígeno (Coulombe *et al.*, 2014).

Enquanto para *Cryptococcus* a resposta imune humoral não é tão importante, anticorpos podem atuar desde o início da infecção com o vírus influenza A e

desempenha um papel essencial no controle e prevenção de infecções virais em seres humanos (Hammer et al., 2015). Anticorpos das mucosas podem neutralizar os vírus antes mesmo que uma infecção se estabeleça. Da mesma forma, as respostas por anticorpos sistêmicos têm uma eficácia semelhante e também é capaz de prevenir a infecção. Os anticorpos podem neutralizar os vírus por vários mecanismos, incluindo a resposta citotóxica mediada por células dependente de anticorpos e pelo sistema de complemento. A amplitude da resposta por anticorpos varia de uma resposta espécie específica, às respostas heterossubtípicas, amplamente neutralizantes. Essa última refere-se à proteção contra o vírus influenza de um subtipo específico (p. ex. H1N1) que é induzida por outro subtipo de influenza (p. ex. H3N2) (Krammer e Palese, 2015).

Uma ampla proteção pode vir de uma resposta humoral aos locais conservados na partícula viral, os anticorpos podem ser dirigidos contra o sítio de ligação do receptor (RBS) presente no domínio globular “cabeça” da hemaglutinina (HA) e no domínio da “haste” da HA ou ainda contra a neuraminidase (NA). Estes são os epítomos relativamente invariantes conhecidos até agora (Schmidt et al., 2015). Respostas imunes heterossubtípicas são geralmente dirigidas contra as proteínas internas do vírus, tais como a nucleoproteína, a proteína M1 ou as polimerases do vírus, que são altamente conservadas. Imunidade humoral heterossubtípica eficaz é rara e principalmente com base em anticorpos contra o domínio da “haste” da HA. Até agora não foi observada imunidade heterossubtípica natural com base na NA (Krammer e Palese, 2015).

Respostas mediadas por células T citotóxicas são outro componente imunitário importante que medeia uma proteção substancial contra o desenvolvimento da doença após a infecção por influenza A. As células T agem mais tarde na infecção do que os anticorpos, mas podem exibir ampla reatividade devido à conservação das proteínas internas do vírus influenza, que possuem fortes epítomos de células T (Krammer e Palese, 2015). A imunidade dirigida por células T CD8⁺ resulta na produção de citocinas, incluindo TNF- α , IFN- γ , IL-2 (resposta Th1), IL-10, IL-4 (Th2) e IL-17 (Th17), e é conhecida por desempenhar um papel no melhoramento da gravidade e/ou duração da infecção por influenza, mas o fenótipo preciso, a magnitude e a longevidade da resposta protetora exigida, ainda não são completamente claros. Além disso, as células T CD4⁺ podem matar diretamente as células infectadas e estão implicadas na depuração do vírus, elas também podem ajudar ambas as células T CD8⁺ e a resposta humoral que é crítica para prevenção da infecção viral (Coughlan e Lambe, 2015).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A incidência de infecções fúngicas invasivas aumentou consideravelmente nos últimos anos, causada por uma maior população de imunocomprometidos. Dentre elas a criptococose é uma infecção fúngica com uma distribuição geográfica universal, que afeta mais de um milhão de pessoas por ano em todo o mundo. Diante da problemática encontrada para seu tratamento, a criptococose muitas vezes tem pobre prognóstico, o que aumenta sua morbimortalidade. Estudos clínicos demonstraram que pacientes infectados com este fungo exibem grave comprometimento dos pulmões, podendo se disseminar para o SNC e causar a forma mais grave da doença, a meningoencefalite.

Por outro lado, o vírus influenza A, pertencente à família *Orthomyxoviridae*, é responsável por significativa morbidade e mortalidade em todo no mundo. A infecção pelo vírus influenza acarreta desde uma doença cuja evolução pode ser benigna, até graves condições, sendo frequentemente fatal. Além disso, infecções secundárias à infecção viral por bactérias gram-positivas agravam o quadro da doença, o que contribui para o aumento da morbimortalidade durante pandemias causadas por Influenza A.

Dado a importância e gravidade da infecção por Influenza A e pelo fungo *Cryptococcus* spp., faz-se necessário entender os mecanismos envolvidos na interação entre Influenza e *Cryptococcus* spp.. Nesse ponto de vista, baseado em relatos de coinfeções vírus-bactéria e vírus-*Aspergillus* com difícil prognóstico, e de dois relatos de caso de coinfeção entre Influenza-*C. neoformans* estudos são relevantes na tentativa de propor um modelo de coinfeção entre *Cryptococcus* spp. e o vírus Influenza A. Logo, uma melhor compreensão de como esses patógenos interagem um com o outro e com o hospedeiro é inovador e de fundamental importância. Principalmente no que diz respeito à influência do vírus no mecanismo de disseminação do fungo para o SNC, onde *Cryptococcus* spp. é capaz de causar a forma mais grave da doença, a meningoencefalite criptocócica.

Diante do exposto, propusemos um modelo *in vivo* de coinfeção entre Influenza A e *C. gattii*, com o objetivo de compreender a influência da infecção pelo vírus Influenza A H1N1 na progressão da criptococose causada por *C. gattii* em modelo murino.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do vírus Influenza A H1N1 na progressão da criptococose experimental em modelo murino causada por *C. gattii*.

3.2 Objetivos específicos

1) Estabelecer um modelo experimental para testes *in vivo* de coinfeção entre o vírus influenza A e o fungo *Cryptococcus gattii*:

- Selecionar os tempos ideais de infecção do vírus influenza em relação à *C. gattii*.

2) Avaliar a progressão da criptococose em camundongos infectados ou não com o vírus Influenza A nos tempos escolhidos, de forma a determinar:

- A sobrevivência dos animais;

- Alterações comportamentais (protocolo SHIRPA);

- Quantificação da carga fúngica e viral em órgãos alvos;

- Análises histopatológicas dos pulmões e cérebro;

- Análise morfológica da célula e cápsula polissacarídica de *C. gattii*;

- Determinar importância do vírus na coinfeção, através do tratamento dos camundongos com o antiviral Oseltamivir e com o antifúngico Fluconazol, ou com ambos os tratamentos em combinação.

- Avaliação da resposta inflamatória via dosagem de mediadores inflamatórios – verificar a população celular no sítio da infecção (pulmões) e detecção dos níveis de citocinas e quimiocinas.

3) Avaliar *in vitro* aspectos da interação fungo, vírus e hospedeiro:

- Análise do índice fagocítico, proliferação intracelular (IPR) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

4) Análise da transmigração de *Cryptococcus* ssp. para o SNC durante a coinfeção, através de modelo celular *in vitro* de barreira hematoencefálica (BBB):

- Verificar o efeito vírus Influenza A na transmigração de *C. gattii* e na manutenção da integridade e permeabilidade da membrana da BBB.

- Avaliação do mecanismo de “cavalo de Tróia” para transmigração da BBB.

4 METODOLOGIA

4.1 Linhagens e cultivo de *Cryptococcus gattii* e do vírus influenza A H1N1

Foi utilizada nesse estudo a linhagem de *C. gattii* L27/01 de origem clínica, pertencente à coleção de microrganismos do laboratório de micologia do Departamento de Microbiologia da UFMG (UFMG-CM-Y6141), mantida em Sabouraud Dextrose (ASD) e glicerol à -80°C. Para as análises, o fungo foi cultivado por 48h em ASD a 37°C antes de ser utilizado (Santos et al., 2014). No preparo do inóculo fúngico, as células foram transferidas para solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) estéril e o inóculo foi quantificado em câmara de Neubauer para obtenção de um inóculo de 1×10^4 células/animal de uso imediato. Outras linhagens de *Cryptococcus*, tais como, *C. gattii* R265 (VGII) e *C. neoformans* H99 (VNI) foram também utilizadas para análise de sobrevivência, sendo empregadas as mesmas condições de crescimento descritas acima.

Quanto ao vírus, foi utilizada a linhagem de vírus Influenza A (IAV) H1N1: A/PR8/34 (PR8), adaptada a camundongos. Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado, pesquisador do laboratório de imunopatologia do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ-MG) e co-orientador desse projeto, que autorizou a utilização do mesmo conforme carta listada no anexo 1.

O estoque viral foi cultivado a uma proporção de 0,001 MOI (sigla do inglês, *multiplicity of infection*) em células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) e crescido a 37°C a 5% de CO₂ durante 72h em *Dulbeccos completa Modified Eagle Medium* (DMEM; SIGMA) com 1 mM de piruvato de sódio, 4,5 mg/ml de L-glucose, 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina, suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FCS; CULTILAB; Brasil). Sobrenadantes da cultura celular foram recolhidos e clarificados por centrifugação a baixa velocidade. Alíquotas de vírus foram congeladas a -80°C até sua utilização. Os estoques virais foram titulados em monocamadas de células MDCK em ensaios de placa padrão utilizando sobrecamada de agarose em DMEM completo com 2% de FCS. O inóculo viral foi preparado por diluição do estoque viral em PBS 1X no momento do uso (Garcia et al., 2013).

4.2 Estratégia experimental *in vivo*

Para a execução dos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos fêmeos da linhagem C57BL/6, com seis a oito semanas de idade. Os animais foram agrupados em seis por gaiola e fornecidos água e ração *ad libitum* e ciclos de claro/escuro foram mantidos. Todos os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da UFMG e mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Este trabalho foi submetido e aprovado pelo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, com número de protocolo 354 / 2015, conforme anexo 2. Todos os procedimentos experimentais seguiram os padrões de ética em experimentação animal, de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/ Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (disponível em: <http://www.cobea.org.br/>) e a Lei Federal Brasileira nº 11.794.

4.3 Modelo experimental para testes de coinfeção entre o vírus influenza A e o fungo *Cryptococcus gattii*

O primeiro passo foi selecionar o período de inoculação do vírus em relação à infecção por *C. gattii* para estabelecer um modelo experimental para testes *in vivo* de coinfeção entre *C. gattii* e o vírus Influenza. Para isso, foram testados três tempos antes e três tempos após a infecção por *C. gattii*, onde foi analisada a sobrevivência dos animais. Foi analisado paralelamente o comportamento dos camundongos segundo o protocolo SHIRPA (Rogers et al., 1997; Lackner et al., 2006).

Os camundongos infectados com *C. gattii* via intratraqueal (i.t.), foram primeiramente anestesiados com solução de ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg) em PBS 1X, e em seguida foi realizada uma pequena incisão na pele, próxima da região das glândulas tireoide, após a separação das camadas dos tecidos, a traquéia foi exposta e inoculada 30 µL da solução fúngica (1×10^4 células), em seguida, a incisão foi finalmente suturada (Ferreira et al., 2015). Já os animais que foram infectados com o vírus Influenza A (via intranasal, i.n.), estes foram anestesiados da mesma forma (ketamina/xilazina: 80 mg/Kg/ 15 mg/Kg) e instilados em suas narinas 20 µL da solução viral subletal equivalente a 10^3 unidades formadoras de placas virais (UFP)/animal (Barbosa et al., 2014). Depois de realizado os procedimentos, os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas separadas.

Após a infecção, os animais foram monitorados diariamente para a construção de uma curva de sobrevivência e a perda de peso foi registrada para confirmar a infecção viral, os animais ainda foram submetidos a uma bateria de testes do protocolo SHIRPA para avaliação do perfil funcional e comportamental dos animais durante o curso da infecção, como detalhado no tópico 4.4. Os animais que apresentaram sinais de morbidade, como encurvamento dorsal e piloereção acentuados foram anestesiados e eticamente eutanasiados.

Padronizou-se a infecção com *C. gattii* para o mesmo dia (considerado dia 0) e variaram-se os tempos de inoculação do vírus influenza A para cada grupo. Dessa forma, três grupos receberam o vírus antes (3, 7 ou 10 dias antes) e três grupos receberam o vírus após (3, 7 ou 10 dias após) a infecção por *C. gattii*. Grupos controles também foram considerados, onde os animais não foram infectados ou receberam somente o inóculo viral ou fúngico. Além disso, um grupo controle foi infectado com uma dose letal do inóculo viral (10^5 UFP/animal) para confirmar a infecção viral. Os animais foram divididos em diferentes grupos (n=6 animais por grupo), tais como esquematizados na tabela abaixo (tabela 1):

Tabela 1. Tempos de inoculação viral de animais coinfectados com *C. gattii*.

GRUPO	Dias (d) de infecção						
	-10 d	-7 d	-3 d	0 d	3 d	7 d	10 d
1 – NI	--	--	PBS	PBS	--	--	--
2 – IAV 10^5	--	--	IAV	PBS	--	--	--
3 – IAV 10^3	--	--	IAV	PBS	--	--	--
4 – Cg	--	--	PBS	Cg	--	--	--
5 – IAV 3 DAI + Cg	--	--	IAV	Cg	--	--	--
6 – IAV 7 DAI + Cg	--	IAV	--	Cg	--	--	--
7 – IAV 10 DAI + Cg	IAV	--	--	Cg	--	--	--
8 – Cg + IAV 3 DPI	--	--	--	Cg	IAV	--	--
9 – Cg + IAV 7 DPI	--	--	--	Cg	--	IAV	--
10 – Cg + IAV 10 DPI	--	--	--	Cg	--	--	IAV

Legenda: NI: animais não infectados; IAV: Vírus Influenza A H1N1 PR8; 10^3 e 10^5 : inóculo viral com 10^3 e 10^5 UFP/animal; Cg: *C. gattii*; DAI: dias antes da infecção; DPI: dias pós-infecção; PBS: Solução salina tamponada com fosfato 1X. Os grupos de 5 a 10 foram infectados com inóculo viral de 10^3 UFP/animal e inóculo fúngico de 10^4 UFC/animal.

4.4 Estratégia utilizada para experimentos com o tempo selecionado para coinfeção entre *C. gattii* e o vírus Influenza A

Para todos os experimentos descritos nos próximos tópicos, o tempo de coinfeção com a infecção viral três dias antes da infecção (3 DAI) por *C. gattii* foi selecionado para a condução dos ensaios, com base na análise da curva de sobrevivência. A seguinte estratégia, demonstrada em esquema a seguir (figura 6) foi utilizada para os subsequentes experimentos.

A) Análise de sobrevivência e do perfil comportamental dos animais:



B) Perfil da criptococose *in vivo*:

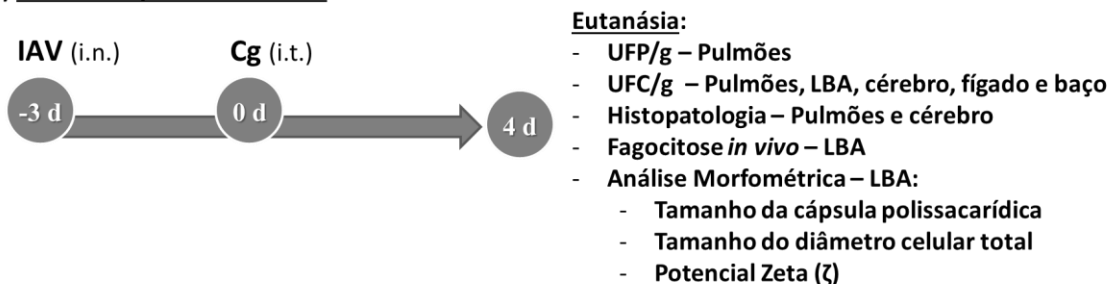


Figura 6: Esquema da coinfeção entre o vírus Influenza A H1N1 PR8 e *C. gattii* L27/01. A) Análise da sobrevivência e do perfil comportamental dos animais. O primeiro objetivo foi determinar a sobrevivência e alterações comportamentais (através do protocolo SHIRPA) em camundongos coinfectados com o vírus Influenza A (H1N1 PR8) e *C. gattii* (L27/01). A seta indica o grupo de camundongos C57BL/6 (n=6) que foram infectados intranasal (i.n.) pelo vírus influenza A (IAV) com 1×10^3 UFP/animal 3 dias antes (-3 d ou 3 DAI) da infecção intratraqueal (i.t.) por *C. gattii* (dia 0), 1×10^4 UFC/animal. Os grupos controles foram animais infectados somente com *C.gattii* (Cg); somente com IAV ou não infectados (NI). A sobrevivência, peso e o perfil comportamental dos animais foram monitorados diariamente. Além disso, a mesma estratégia de coinfeção foi usada para determinar a sobrevivência de camundongos durante o tratamento com o antiviral Oseltamivir, 31 mg/kg/dia (OSELT) ou com o antifúngico Fluconazol, 10 mg/kg/dia (FLZ), ou ambas as drogas em combinação; cada droga foi administrada diariamente via intraperitoneal (i.p.) e o tratamento se iniciou no dia da infecção por IAV (OSELT) ou por Cg (FLZ). B) Perfil da criptococose *in vivo*. O segundo objetivo foi avaliar o perfil da criptococose, para isso foi determinado o dia de eutanásia dos camundongos conforme estratégia demonstrada pela seta em B. A seta indica o grupo onde os animais foram inicialmente infectados i.n. (-3 d) pelo vírus Influenza A, seguido pela infecção por Cg (dia 0) via i.t.; quatro dias após a infecção por *C. gattii* (4 d) os animais foram eticamente eutanasiados (equivalente a 7 dias após a infecção por IAV). Órgãos de interesse foram removidos para determinar a carga fúngica viral e para análises histopatológicas; também o lavado broncoalveolar (LBA) foi aspirado para quantificar a taxa de fagocitose *in vivo* e para análise morfométrica das colônias recuperadas a partir do LBA.

4.5 Análise Comportamental – Protocolo SHIRPA

Foram realizados experimentos que visam analisar o nível de alterações comportamentais dos animais. O comportamento dos camundongos foi analisado paralelamente a determinação da curva de sobrevivência descrita anteriormente, utilizando os grupos controles não infectado (NI), somente infectado com o fungo (Cg) ou vírus (IAV) e foi selecionado o grupo coinfestado com o vírus Influenza três dias antes da infecção (3 DAI) por *C. gattii* (tabela 1 e figura 6B).

A análise comportamental dos animais foi avaliada pelo protocolo SHIRPA (SHIRPA – *SmithKlineBeecham Pharmaceuticals/ HarwellMRC Mouse Genome Centre/ ImperialCollege/ Royal London Hospital/ Phenotype Assessment*), esse foi concebido como uma bateria de múltiplos testes usados para estudos longitudinais com diretrizes e materiais padronizados (Rogers et al., 1997). Esse teste permite avaliar alterações neurológicas e comportamentais significativas nos animais. O quadro primário de SHIRPA consiste em uma série de observações, reflexos e funções básicas sensorio-motoras que fornece um perfil funcional e comportamental pela observação avaliativa do desempenho individual.

O protocolo de SHIRPA foi usado para avaliar mudanças comportamentais durante o curso da infecção com o intuito de avaliar o perfil de morbidade dos animais (Rogers et al., 1997; Pedroso et al., 2010). Para o propósito de análise, os parâmetros individuais avaliados pelo SHIRPA foram agrupados em cinco categorias funcionais descritas na tabela 2 (estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autonômica, tônus e força muscular; reflexo e função sensorial) de acordo com Lackner et al. (2006), para determinar uma contagem global e cinco domínios de contagem.

Tabela 2. Classificação das categorias funcionais da bateria SHIRPA de acordo com os parâmetros avaliados.

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

O protocolo foi aplicado em todos os animais a partir do primeiro dia pós-infecção com intervalos variados de acordo com a progressão da infecção, até o término do ensaio. Inicialmente, o peso do animal foi registrado. A seguir, ele foi colocado em uma jarra de observação, localizada em cima de uma grade suspensa, e avaliado durante cinco minutos em relação à posição corporal, atividade espontânea, taxa de respiração, tremor, defecação (número de bolos fecais), micção, número de “headings” (apoio apenas sobre as patas traseiras) e “groomings” (movimentos de “limpar” dirigidos a cabeça ou corpo, efetuados com as patas dianteiras). Transcorrido o tempo, o animal foi transferido rapidamente para uma arena (“open field”) sem ser manuseado e foi observado em relação à excitação de transferência, atividade locomotora (número de entradas, com as quatro patas, em quadrados demarcados na arena em 30 segundos), fechamento das pálpebras, piloereção, ambulação, elevação pélvica, elevação da cauda, escape ao toque e passividade posicional. O animal foi então suspenso pela cauda e avaliado, sobre uma grade colocada em cima da arena, quanto à presença de encurvamento do tronco, capacidade de segurar as patas traseiras, posicionamento visual, força ao agarrar, tônus corporal, *pinna reflex*, reflexo corneal, beliscada nos dedos da pata traseira e manobra do arame. A seguir, o animal foi contido pelo dorso em uma restrição supina e foram avaliados também a cor da pele, frequência cardíaca, tônus dos membros, tônus abdominal, lacrimejação, salivação, mordida provocada, reflexo postural, *geotaxis* negativo, medo, irritabilidade, agressão e vocalização. Comportamentos estereotipados, bizarros e convulsões foram também registrados.

4.6 Curva de sobrevida de animais coinfectados tratados com o antiviral Oseltamivir e o antifúngico Fluconazol

Foi realizado um experimento para avaliar o tratamento do vírus e do fungo durante a coinfecção entre *C. gattii* e o vírus Influenza A, com o intuito de verificar a importância desses agentes patogênicos na coinfecção e progressão da criptococose. Com esse objetivo, após ser determinado o esquema ideal de coinfecção (como descrito no tópico 4.3 e 4.4), para esse experimento foi escolhido somente um grupo coinfectado: vírus inoculado três dias antes da infecção (3 DAI) por *C. gattii*. Os animais foram infectados da mesma forma já descrita no tópico 4.3.

Os animais foram divididos (n=6) em grupos não tratados (grupos controles): somente infectados com vírus Influenza A; somente infectados com *C. gattii* e

infectados com a coinfeção no esquema ideal. E, em grupos tratados por gavagem diariamente com 31 mg/kg/dia do antiviral Oseltamivir (Oselt, Tamiflu[®]/Roche), para animais infectados com o vírus Influenza A e com a coinfeção. A dose de 31 mg/Kg dada para os camundongos diariamente foi estabelecida de acordo com Reagan-Shaw, Nihal e Ahmad (2007) e equivale a dose usada em humanos adultos (150 mg/Kg/dia). Alternativamente, grupos de animais infectados com *C. gattii* e coinfectados foram tratados diariamente via intraperitoneal (i.p.) com o antifúngico Fluconazol, 10 mg/kg/dia (FLZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Além disso, outro grupo de animais coinfectados foi tratado com ambas às drogas em combinação (Oselt + FLZ).

Em resumo, os grupos experimentais compreenderam: animais infectados com Cg, IAV e IAV+Cg não tratados (NT); animais infectados com IAV tratado com Oselt; infectados com Cg tratado com FLZ; coinfectados com IAV+Cg tratado com Oselt; IAV+Cg tratado com FLZ e IAV+Cg tratado com Oselt+FLZ.

O tratamento com Oselt iniciou-se no dia da infecção do vírus, enquanto o tratamento com FLZ iniciou no dia da infecção por *C. gattii* e foram realizados diariamente até o final do experimento. Os animais foram monitorados diariamente para a construção de uma curva de sobrevivência associada aos tratamentos. Os animais que apresentarem sinais de morbidade, como encurvamento dorsal e piloereção acentuados foram anestesiados e eticamente eutanasiados.

4.7 Análise do perfil da criptococose *in vivo*

Com o objetivo de avaliar a progressão da criptococose em camundongos infectados ou não com o vírus Influenza A, foi então realizada uma nova infecção, que envolvesse o tempo de coinfeção previamente selecionado (IAV inoculado três dias antes da infecção por Cg), em camundongos fêmeas C57BL/6 (n=6) conforme descrito no item 4.3. Para tanto, foi estabelecido o ponto de eutanásia dos animais de acordo com a média de sobrevivência (quatro dias após a infecção por Cg), conforme estratégia mostrada na figura 6B. A eutanásia teve como finalidade determinar: a quantificação da carga fúngica e viral em órgãos alvos; a proporção de fagocitose *in vivo* via LBA; avaliação histopatológica em órgãos alvos e a morfometria da célula e cápsula polissacarídica de *C. gattii* recuperada a partir do LBA.

4.7.1 Quantificação da carga fúngica e viral

Para obtenção da carga fúngica, foram determinadas as unidades formadoras de colônia (UFC) nos órgãos alvo. No dia escolhido para a eutanásia, os camundongos foram anestesiados com solução de ketamina e xilazina em PBS (80 mg/Kg/15 mg/Kg), e eticamente eutanasiados. Pulmões, cérebro, fígado e baço foram removidos, macerados e homogeneizados em 1 mL de PBS estéril. O lavado broncoalvelar (LBA) foi também aspirado para quantificação de UFC. O LBA foi obtido, com o auxílio de um tubo traqueal, por meio de injeção de 3 mL de PBS gelado, procedimento que foi repetido 3 vezes, nas vias aéreas dos camundongos. Em seguida, uma seringa foi conectada e a solução foi cuidadosamente recuperada, para adquirir leucócitos recrutados para as vias aéreas (Santos et al., 2013).

O volume de 50 µL do lavado broncoalvelar, ou dos homogenatos de cada órgão foi semeado, em duplicata, em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD) com cloranfenicol, as quais foram cultivadas a 37°C por 48 horas. Após esse tempo as colônias foram contadas com a finalidade de quantificar as UFC/g de cada órgão ou UFC/mL de fluido LBA, e reservadas para posterior análise morfológica. A confirmação da presença da levedura foi realizada por microscopia utilizando tinta nanquim. Além disso, no restante do homogenato dos pulmões foi então adicionado mais 2 mL de PBS 1X estéril e congelados a -80 °C para posterior quantificação da carga viral através da determinação das unidades formadoras de placas (UFP)/g de cada órgão. Os homogenatos dos pulmões foram titulados conforme Garcia e colaboradores (2013), em monocamadas de células MDCK em ensaios de placa padrão utilizando sobrecamada de agarose em DMEM completo com 2% de FCS.

4.7.2 Quantificação da taxa de fagocitose *in vivo* via lavado broncoalveolar

O restante do lavado retirado dos animais eutanasiados, foi submetido a uma etapa de centrifugação (1200 rpm/5 minutos a 4°C), para precipitação das células. O sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de albumina de soro bovino (BSA) ao *pellet*. Foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer para determinação do número total de células. E, por conseguinte, a elaboração de lâminas foi realizada com o auxílio de uma centrífuga citológica (Cytospin/Thermo), a 450 rpm por 5 minutos (Maxeiner et al., 2007). Após essa etapa, as lâminas secas, foram fixadas com metanol gelado, e uma coloração hematológica foi feita utilizando o corante Panótico. O índice

fagocítico *in vivo* foi determinado pelo percentual de células com *C. gattii* internalizados por observação em microscópio óptico. Foram observadas pelo menos 100 células fagocíticas para quantificar o número de células com *C. gattii* internalizado. O experimento foi realizado em duplicata.

4.7.3 Análise morfométrica da célula e cápsula polissacarídica de *C. gattii*

Para análise morfométrica, as leveduras recuperadas dos homogenatos do lavado broncoalveolar, crescidas após cultivo em ASD a 37°C por 48 horas, foram visualizadas em microscópio óptico (Axioplan; Carl Zeiss), após suspensão em tinta Nanquim. O diâmetro total da célula e o tamanho da cápsula de 100 células foi mensurado no *ImageJ 1.40g software* (National Institutes of Health (NHI), Bethesda, MD). O tamanho capsular e o diâmetro celular total (corpo celular + cápsula) foram expressos em μm e o diâmetro celular total foi também expresso como a frequência (%) de células maiores ($>10 \mu\text{m}$), comparado a células com tamanho considerado típico para *Cryptococcus* ssp. (5-10 μm), de acordo com Okagaki et al. (2010). Também foi avaliado o potencial Zeta (ζ) dessas células diluídas em salina, calculado em um analisador de potencial Zeta (ZetaPlus, Brookhaven Instruments Corp.), como previamente descrito por Ferreira et al. (2015). O experimento foi realizado em triplicata.

4.7.4 Análise histopatológica

Após o sacrifício dos animais de acordo com esquema mostrado na figura 6B, órgãos íntegros foram removidos para análise histopatológica. Os tecidos de pulmões e cérebro dos grupos de animais controles (NI); infectados somente com vírus (IAV); somente com *C. gattii* (Cg); ou coinfectados (IAV+Cg) foram fixados em formalina 10% por 48h com o objetivo de preservar a morfologia e a composição do tecido. Após essa etapa os respectivos órgãos foram embebidos em parafina para a realização dos cortes histológicos em micrótomo e corados com hematoxilina-eosina (HE). Após coloração as lâminas foram codificadas e analisadas as cegas em microscópio óptico (200X de magnificação) para a verificação das alterações no tecido decorrentes da infecção. Os seguintes parâmetros foram avaliados: arquitetura pulmonar (danos no tecido pulmonar); degeneração das vias aéreas (bronquíolos); congestão e edemas dos septos alveolares; edema alveolar; infiltrado inflamatório bronquiolar e infiltrado inflamatório septal. Cada parâmetro foi classificado como: 0 (ausente), 1 (discreto), 2 (moderado), 3 (intenso) ou 4 (acentuado). Os resultados para os distintos parâmetros

avaliados foram somados e expressos como um escore total equivalente à média dos escores combinados.

4.8 Avaliação da resposta inflamatória via dosagem de mediadores inflamatórios

Com o objetivo de compreender a maior susceptibilidade dos animais à criptococose causada pelo vírus influenza A, realizamos um experimento para avaliar a resposta inflamatória via dosagem de mediadores inflamatórios em camundongos infectados apenas com o vírus Influenza A, estes animais foram posteriormente eutanasiados três dias após a infecção pelo vírus, o qual seria o momento da infecção por *C. gattii*, e comparados com um grupo de animais não infectados (NI). Foi então verificado o perfil da população celular no sítio da infecção e a detecção de citocinas e quimiocinas nos pulmões dos camundongos, conforme esquematizado na figura 7.

Perfil imunológico *in vivo*:

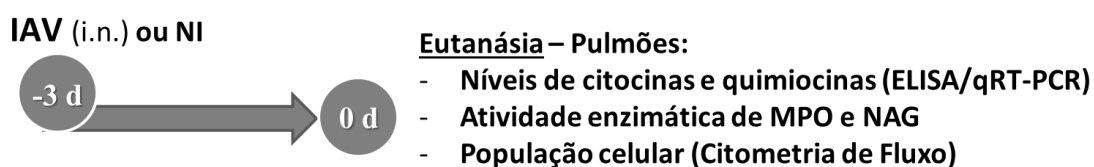


Figura 7: Estratégia para análise do perfil imunológico de camundongos infectados com o vírus Influenza A (IAV). Com o objetivo de avaliar o papel do vírus influenza no perfil imunológico de animais no momento da infecção por *C. gattii*, camundongos C57BL/6 (n=6) foram infectados i.n. (-3 d) somente com o vírus IAV (1×10^3 UFP/animal) ou não infectados (NI) e foram eticamente eutanasiados após três dias de infecção (0 d). Os pulmões foram recuperados e os níveis de citocinas e quimiocinas quantificados por ELISA ou qRT-PCR. Também foi determinada a atividade enzimática de MPO e NAG como medida indireta da acumulação de neutrófilos e macrófagos nos pulmões, respectivamente. Por último, foi avaliado o perfil da população celular nos pulmões por citometria de fluxo.

4.8.1 Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas e da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG)

Nesse experimento, com intuito de verificar a resposta inflamatória causada por influenza A no hospedeiro no momento da infecção por *C. gattii*, os grupos testados (n=6) foram animais eutanasiados com três dias de infecção pelo vírus influenza A, comparados a um grupo controle de animais não infectados (NI), conforme demonstrado na figura 7. O experimento foi realizado em triplicada para cada animal.

Fragmentos do tecido pulmonar (100 mg) foram homogeneizados com 1 mL de uma solução tampão de extração, preparada com PBS 1X (pH 7.4) contendo anti-

proteases (0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinina A, todos comprados da Sigma-Aldrich) e 0,05% de Tween 20. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 4 °C/3000g e o sobrenadante foi congelado a -20 °C e utilizado para análise de citocinas (Costa et al., 2016). Os níveis das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e da quimiocina CXCL-1 foram mensurados por ELISA usando anticorpos comercialmente disponíveis de acordo com as instruções do fabricante (DuoSet Kits, R&D Systems, Minneapolis, MN).

A expressão dos genes IFN- α 4 e IFN- β foi quantificada em tecido pulmonar por PCR em tempo real (qRT-PCR) por SYBR®-Green, usando *primers* específicos para amostra de modelo murino. Os *primers* usados foram: mIFN α 4, 5'-CCA CAG CCC AGA GAG TGA CCA GC-3' (*forward*) e 5'-AGG CCC TCT TGT TCC CGA GGT TA-3' (*reverse*); mIFN β , 5'-GAA AGG ACG AAC ATT CGG AAA T-3' (*forward*) e 5'-CGT CAT CTC CAT AGG GAT CTT GA-3' (*reverse*); e 18S ribossomal RNA, 5'-CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG-3' (*forward*) e 5'-CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC-3' (*reverse*) (Costa et al., 2014).

As atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e β -N-acetilglucosaminidase (NAG) foram realizadas em fragmentos de tecido pulmonar (100 mg), como descrito previamente por Costa et al. (2016). A atividade de MPO e NAG provém uma medida indireta do acúmulo de neutrófilos e macrófagos nos pulmões, respectivamente.

4.8.2 Análise de citometria de fluxo

Camundongos C57BL/6 (n=6) foram infectados somente com o vírus IAV ou não infectados, três dias após a infecção os animais foram eticamente eutanasiados e os pulmões removidos (figura 7). A análise da população celular no sítio da infecção foi determinada por citometria de fluxo a partir de células recuperadas dos pulmões. Posteriormente, as células obtidas foram marcadas com diferentes combinações de anticorpos monoclonais fluorescentes (BD Pharmingen) específicos para classificação das populações celulares a seguir: neutrófilos (Ly6G⁺/GR1⁺); linfócito T CD4 (CD3⁺CD4⁺); linfócito T CD8 (CD3⁺CD8⁺); linfócito B (CD3⁻CD19⁺CD45⁺); Células NK (CD3⁻NK1.1⁺); macrófagos (F4/80⁺). A população de macrófagos foi posteriormente diferenciada de acordo com a expressão de F4/80, GR1, and CD11b e definidas como: macrófagos classicamente ativados, M1 (F4/80^{low}Gr1⁺Cd11b^{med}); macrófagos alternativamente ativados, M2 (F4/80^{high}Gr1⁻Cd11b^{high}); e macrófagos que promovem a resolução, Mres (F4/80^{med}Cd11b^{low}) (Vago et al., 2015). A citometria de

fluxo foi realizada utilizando BD LSR II (BD Biosciences) com FACSDiva *Software* (BD Biosciences), e a análise foi realizada utilizando FlowJo *Software* Versão 10.0.6 (Tree Star, Inc., EUA). A estratégia utilizada para o *gating* das populações de acordo com Vago et al., 2015 está ilustrada no anexo 3.

4.9 Ensaios de fagocitose e proliferação intracelular (IPR)

Para os procedimentos camundongos C57BL/6 de 8-10 semanas foram humanamente eutanasiados e com o auxílio do material cirúrgico, removeu-se a pele do animal na região dorsal logo acima das patas traseiras visando expor as articulações: bacia/fêmur e fêmur/tíbia. Imediatamente após a remoção das patas, essas foram colocadas em um tubo contendo álcool durante 1 minuto, e depois em PBS 1X. Foi removido todo tecido muscular dos ossos com auxílio de tesoura e gaze estéril. A medula foi coletada pelo canal medular do fêmur (agulha 0,70 x 25 mm) e da tíbia (agulha 0,38 x 13 mm) com 2 a 5 mL de RPMI gelado, sendo transferida para um tubo Falcon estéril mantido em gelo. Após coleta da medula, as células foram centrifugadas em meio RPMI-1640 (volume final de 30 mL). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 20 mL de RPMI-1640. As células foram contadas em câmara de Neubauer. A concentração de células por placa foi ajustada para 2×10^6 /mL para incubação em meio BMM (RPMI suplementado com 30% de meio condicionado de células L929, 20% de soro fetal bovino [Gibco], 2 mM de glutamina [Sigma-Aldrich], 25 mM de HEPES pH 7.2, 100 unidades/mL de penicilina-estreptomicina [Life Technologies]). As placas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por sete dias para diferenciação em células BMDMs (*bone marrow derived macrophages*), e a troca de meio realizada a cada três dias do início da cultura (Weischenfeldt e Porse, 2008).

Para o ensaio de fagocitose, foi depositado em placas de 24 poços já contendo lamínulas circulares de 13mm, 500 µL por poço da suspensão, contendo 2×10^5 células obtidas da medula em RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (FCS). Para aderência dos macrófagos as placas foram incubadas *overnight* com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período foram removidas as células não aderidas, através de lavagem delicada usando PBS 1X aquecido a 37°C, e os macrófagos ficaram prontos para serem desafiados com a infecção.

As células de macrófagos derivadas da medula óssea (BMDMs) foram infectadas por ambos os vírus e/ou fungo ou não infectados, sendo que utilizamos os

seguintes grupos de infecção (figura 8): 1) grupo coinfectado, onde o vírus foi adicionado 2 horas antes de *C. gattii* (IAV+Cg); 2) grupo infectado somente pelo vírus (IAV); 3) grupo infectado somente pelo fungo (Cg); 4) grupo controle não infectado, apenas com a suspensão de macrófagos (NI). Para todos esses mesmos grupos, também tiveram grupos pré-estimulados com IFN- γ (50 U/ml) overnight a 37°C em 5% CO₂. Para cada tipo de infecção o experimento foi realizado em sextuplicada.

Análises *in vitro* em modelo de cultura celular (BMDMs):

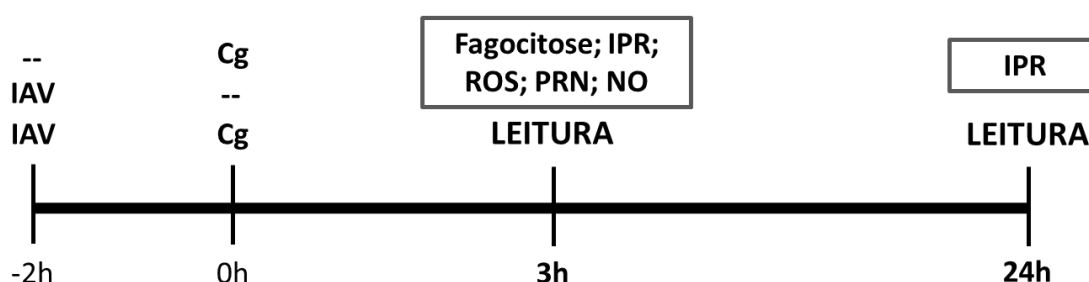


Figura 8: Esquema da coinfecção *in vitro* de macrófagos (BMDMs) com ambos os vírus influenza A (IAV) e/ou *C. gattii* (Cg). Esse ensaio foi realizado com o intuito de avaliar a influência da infecção de BMDMs pelo vírus influenza A na fagocitose de *C. gattii* e na sua taxa de proliferação intracelular (IPR), bem como para a quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxinitrito (PRN) e óxido nítrico (NO). Os macrófagos (BMDMs) foram infectados com o vírus Influenza A duas horas (-2 h) antes de *C. gattii* (0h) (IAV+Cg); Grupos controles foram macrófagos infectados somente com Cg, somente com IAV ou não infectados; Grupos independentes com a mesma disposição foram também estimulados com IFN- γ overnight por 37 °C a 5% de CO₂. As culturas foram então incubadas a 37°C em 5% CO₂ e, posteriormente realizada a leitura dos ensaios de fagocitose, produção de ROS, PRN e NO (3 horas após infecção por Cg) e IPR (3 e 24 horas após infecção por Cg).

Para infecção dos macrófagos, foi preparada uma suspensão fúngica com a massa celular de *C. gattii* L27/01 (cultivado em ágar Sabouraud a 37°C por 48 horas) em PBS 1x. A suspensão foi contada em câmara de Neubauer com azul de Trypan. As células de *C. gattii* foram opsonizadas em soro murino a 10% por 1 hora a 37°C e ressuspensas em meio RPMI-1640 com 10% de FCS. As leveduras viáveis foram ajustadas para $0,4 \times 10^5$ células por poço (1:5 de leveduras para macrófagos) e adicionadas à cultura de macrófagos já nas placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm. Paralelamente, os macrófagos também foram infectados com o vírus influenza para avaliar sua influência na fagocitose da levedura, de acordo com a estratégia descrita acima e na figura 8. A suspensão viral foi preparada a partir de estoque viral previamente titulado, por diluição em meio RPMI-1640 com 10% de FCS e ajustada para 2×10^5 UFP para cada poço (1:1 de vírus para macrófagos). As culturas foram incubadas a 37°C em 5% CO₂, por 3 e 24 horas após a infecção por *C. gattii*.

Após 3 horas de incubação, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas, lavadas em PBS 1x estéril, secas, fixadas com metanol gelado, montadas em lâminas e coradas com o corante Panótico. A contagem dos macrófagos foi realizada por meio de microscopia óptica e a capacidade fagocítica foi expressa pelo percentual de leveduras internalizadas nas células fagocíticas, foram analisados pelo menos 100 macrófagos.

O ensaio de proliferação intracelular (IPR) foi realizado como descrito por Ma et al. (2009), com modificações, para investigar a taxa de proliferação intracelular das leveduras internalizadas. Para o ensaio de IPR, foram utilizados os mesmos grupos (figura 8) e conforme protocolo descrito anteriormente, exceto pela ausência da lamínula nos poços das placas. Após 3 e 24 horas de incubação dos macrófagos infectados, o sobrenadante foi removido. Cada poço foi lavado delicadamente de 2 a 3 vezes com PBS 1X a 37°C para remoção das células de leveduras aderentes e extracelulares. A seguir, foram adicionados em cada poço 200 µL de água destilada estéril para lise dos macrófagos, seguido por 30 minutos de incubação a 37 °C, para liberação e coleta das células. Após o período de incubação, os 200 µL foram coletados e as células de levedura intracelulares foram plaqueadas em ASD e cultivadas a 37°C por 48 horas para determinação das células viáveis (UFC/mL). A taxa de proliferação intracelular foi calculada pela razão do número máximo de leveduras intracelulares, contadas no tempo de 24 horas, pelo número de leveduras contadas inicialmente após 3 horas de infecção dos macrófagos (24:3 horas).

4.10 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio, peroxinitrito e óxido nítrico no ensaio de fagocitose

A quantidade endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN) foram mensuradas por um ensaio fluorimétrico utilizando uma sonda específica (Ferreira et al., 2013). No ensaio de ROS e PRN, as células obtidas da medula foram tratadas como no teste de fagocitose descrito acima (tópico 4.9 e figura 8), diferindo apenas no meio, no qual utilizou o RPMI-1640 sem fenol red e no modelo da placa (foi utilizada placa de 96 poços). Após o período de incubação (3 horas), a mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C com 20nM de dihidrorhodamine 123 (DHR 123; Invitrogen, Life Technologies) e 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA; Invitrogen, Life Technologies) para quantificação de ROS e PRN, respectivamente. Foi por fim mensurada a fluorescência em um fluorômetro (Varioskan Flash, Thermo),

usando comprimentos de onda de excitação de 485nm e emissão de 530nm. Os dados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência \pm SE.

Para a quantificação da produção de óxido nítrico (NO) foi utilizado o sobrenadante do ensaio de fagocitose, e determinada através do teste de Griess. Dessa forma, 100 μ l dos sobrenadantes recolhidos foram misturados com o mesmo volume do reagente de Griess (1% de sulfanilamida [Sigma-Aldrich] diluída em 5% de ácido fosfórico [H₃PO₄] e 0,1% de Naphtiletlenodiamina [Sigma-Aldrich]). A concentração de nitrito foi definida por extrapolação a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio, e a absorbância mensurada em comprimento de onda de 540 nm com um leitor de microplacas de 96 poços, o resultado foi expresso como concentrações micromolares (μ M) de nitrito (Santos et al., 2013). Para todos esses testes *in vitro* descritos acima, também tiveram grupos pré-incubados com IFN- γ (50 U/ml) overnight a 37°C em 5% CO₂. Os ensaios foram realizados em sextuplicada.

4.11 Modelo celular *in vitro* de barreira hematoencefálica (BBB) e análise de sua integridade frente ao *C. gattii*, ao vírus Influenza A e à coinfeção

O modelo *in vitro* de barreira hematoencefálica (BBB) foi utilizado com o intuito de verificar o efeito da transmigração de *Cryptococcus* ssp. e a manutenção da integridade e permeabilidade da membrana da BBB frente ao *C. gattii*, ao vírus Influenza A e à coinfeção entre eles. Esse modelo foi desenvolvido durante o **doutorado sanduíche no exterior no Westmead Institute for Medical Research – The University of Sydney, Austrália**, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Tania Sorrell, Prof^a. Dr^a. Julianne Djordjevic e da Dr^a. Keren Francis.

Células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (hCMEC / D3), referidas como HBEC, foram semeadas em placas de cultura revestidas com colágeno de 35 mm (Corning, NY, USA, Cat # 430165), crescidas até a confluência em meio de EBM2 como descrito anteriormente (Ma *et al.*, 2006). Essas células foram usadas para construção *in vitro* do modelo de BBB. *Transwells* de 24 poços contendo *Cornings* de 6,5 mm com poros de 8,0 μ m (Corning, NY, EUA) foram revestidos com colágeno 3% por 1 hora a 5% CO₂/37°C. Cada inserção foi lavada com meio EBM2, e 600 μ l e 100 μ l de EBM2 foram adicionados à câmara de baixo e de cima de cada *Transwell*, respectivamente. As células HBEC foram semeadas na parte de cima da *Transwell* na

concentração final de 1×10^5 células/poço, e cultivadas até à confluência a 37 °C numa atmosfera a 5% de CO₂, como descrito por Sorrell *et al.*, 2016.

Após a montagem do modelo *in vitro* da BBB como descrito acima, foi analisada a transmigração de *C. gattii* na presença ou ausência do vírus Influenza A, o vírus foi adicionado às células endoteliais 30 minutos antes da adição do fungo. Em outro grupo testou também fatores do hospedeiro estimulados ou não pelo vírus Influenza A como, por exemplo, células PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) obtidas de sangue humano, que foram também classificadas como monócitos clássicos (CD14⁺ CD16⁻), intermediários (CD14⁺ CD16⁺) e não clássicos (CD14^{low}CD16⁺) através da marcação com anticorpo para CD14 e CD16 (Vio-MACS). As populações foram selecionadas por citometria de fluxo (BD FACSCanto II cell analyzer, BD Biosciences) e analisadas usando o *software* FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). A população de monócitos humanos CD14⁺ (clássicos) foi também utilizada nas análises de transmigração, uma vez que CD14 é abundantemente expresso na superfície de monócitos e macrófagos humanos (Yang *et al.*, 2014; Ohradanova-Repic *et al.*, 2016).

As células PBMC ou CD14⁺ foram previamente infectadas com 2 MOI (2×10^5 UFP) do vírus Influenza H1N1 por 30 minutos a 37°C em 5% CO₂. Após esse tempo, *C. gattii* (2×10^4 UFC) foi adicionado por mais 30 minutos e só depois o volume total foi colocado na parte superior da *Transwell*, as placas foram então incubadas *overnight* a 37°C em 5% CO₂ para quantificação do número de colônias (UFC) de *Cryptococcus* presente na parte superior e inferior da *Transwell*, como forma de verificar quanto o fungo transmigrou a BBB, passando para a parte de baixo da *Transwell* nesse período.

Além disso, foi avaliada a manutenção da integridade e permeabilidade da BBB na presença de diferentes concentrações do vírus Influenza ($2,5 \times 10^4$ UFP [5 µl]; 5×10^4 UFP [10 µl] ou $7,5 \times 10^4$ UFP [15 µl]) após incubação *overnight* a 37°C em 5% CO₂, utilizando FITC-Dextran (70,000 KDa, SIGMA-Aldrich). A BBB por conter fortes junções endoteliais dificulta a passagem do FITC-Dextran para a parte de baixo da *Transwell*, caso a integridade da membrana esteja comprometida, o FITC-Dextran passará com maior facilidade e será mais detectado na parte de baixo da *Transwell*. O FITC-Dextran foi quantificado por fluorescência e sua concentração definida por extrapolação a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de FITC-Dextran, e a absorbância mensurada em comprimento de onda de 540 nm com um leitor de microplacas de 96 poços, o resultado foi expresso como concentrações de FITC-Dextran (µg/mL).

4.12 Análise estatística dos dados

Os resultados foram analisados utilizando-se testes estatísticos para comparar as diferenças significativas entre os grupos estudados com o apoio instrumental do *software* PRISMA 5.0 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA). O nível de 95% de significância foi considerado para que os valores sejam significativamente diferentes ($p < 0,05$). A curva de sobrevivência de Kaplan-Meier foi gerada e analisada usando o teste de log rank. Os dados do protocolo SHIRPA foram analisados usando a área sob a curva, seguidos por análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. Os demais dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e em caso de significância foram aplicados os testes de Tukey para comparação entre todos os grupos e/ou teste T para comparar dois grupos entre si.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da curva de sobrevivência e do perfil comportamental (SHIRPA)

Para selecionar o melhor tempo de inoculação do vírus em relação à infecção por *C. gattii* durante a coinfeção, camundongos C57BL/6 foram utilizados como descrito nos tópicos 4.2 e 4.3. A sobrevivência dos animais foi analisada para cada tempo de infecção com o vírus influenza A, e os resultados obtidos para curva de sobrevivência estão demonstrados na figura 9.

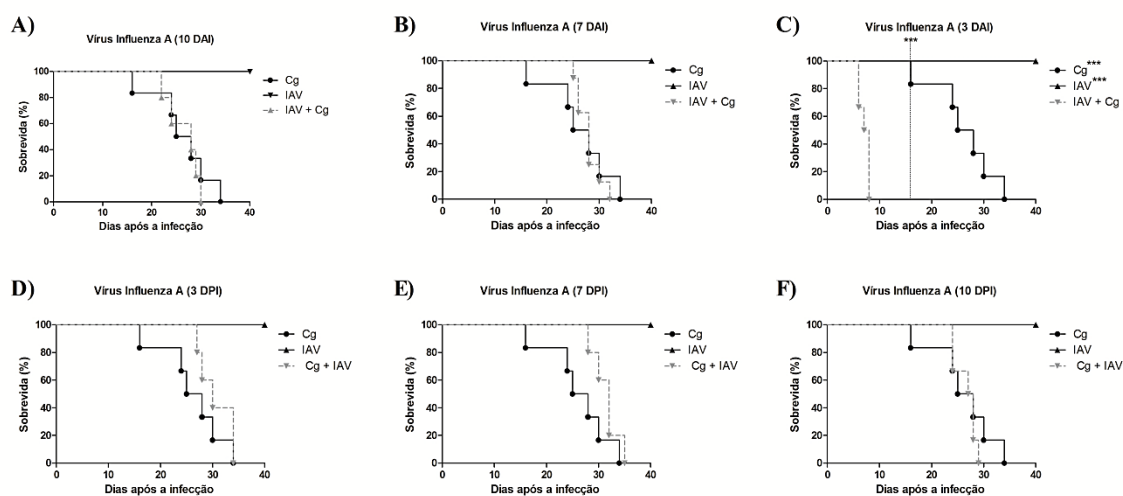


Figura 9: Curva de sobrevivência de camundongos coinfectados com o vírus Influenza A (IAV) e *C. gattii* (Cg). Seis camundongos por grupo foram inoculados com 10^4 células da linhagem L27/01 de *C. gattii* via intratraqueal e/ou com 10^3 partículas virais de influenza A via intranasal. **A, B e C** são as curvas com o vírus inoculado 10, 7 e 3 dias antes da infecção (DAI) por *C. gattii*, respectivamente. Enquanto na parte de baixo da figura (**D, E e F**) são as curvas onde o vírus foi inoculado após 3, 7 e 10 dias de infecção (DPI) por *C. gattii*, respectivamente. **Cg:** *C. gattii* L27/01; **IAV:** Vírus Influenza A PR8 H1N1. *** $p < 0,0001$ (diferença estatística quando comparado ao grupo IAV+Cg).

Os animais infectados somente com *C. gattii*, tiveram uma média de sobrevivência de 26,5 dias, em contrapartida, animais infectados somente com o vírus influenza A em dose subletal (LD^{50} : 0,1) não sucumbiram. Porém, pelo acompanhamento da variação de peso dos animais (Figura 12F) pode-se assegurar que eles foram infectados com o vírus, pois os animais perderam peso por volta do 3º a 6º dia de infecção e logo após recuperaram seu peso normal. Esse quadro de infecção viral mimetiza em camundongos o que ocorre em seres humanos, que durante um período apresenta sinais e sintomas de uma gripe de caráter benigno, com cura após três ou quatro dias da manifestação dos primeiros sinais, caso não haja complicações, sem causar o óbito (Carneiro et al., 2010). Porém, quando os animais recebem uma dose letal do inóculo viral (1×10^5 UFP/animal),

estes sucumbem com apenas cinco e seis dias de infecção (Anexo 4), o que nos confirma mais uma vez a atividade das partículas virais utilizadas no experimento.

Para todos os tempos de coinfeccção: 10 e 7 DAI; e 3, 7, e 10 DPI por *C. gattii*, não houve diferença significativa entre a média de sobrevida dos animais em relação à infecção somente com *C. gattii*, apresentando um perfil de sobrevida semelhante a este grupo. Contudo, quando analisamos a curva de sobrevida dos camundongos com três dias de infecção viral antes de ser inoculada a levedura (3 DAI), esta foi estatisticamente menor ($p < 0,0001$). Os animais sucumbiram de forma brusca e muito precoce quando comparados à infecção somente com *C. gattii* (média de sobrevida = 25 dias) e também somente com o vírus (não sucumbiram). No qual, o primeiro animal deste grupo (3 DAI) sucumbiu no quinto dia e o último animal sucumbiu no oitavo dia de infecção após a infecção com *C. gattii* (média de sobrevida = 7,5 dias).

Na busca por um tempo de inoculação viral em relação à infecção por *C. gattii* que se destacasse para propor um modelo de coinfeccção entre eles, o grupo de infecção viral três dias antes da infecção por *C. gattii* foi selecionado para os demais experimentos, devido sua intrigante diminuição na sobrevida dos camundongos (figura 11A). Esse mesmo perfil de coinfeccção foi obtido usando as linhagens de *C. gattii* R265 e *C. neoformans* H99, no qual o vírus também foi inoculado (i.n.) três dias antes da infecção (3 DAI) por *Cryptococcus* (Figura 10). A sobrevida dos animais coinfectados foi igualmente reduzida ($p < 0,005$) para ambas as linhagens testadas, *C. gattii* R265 (Figura 10A) e *C. neoformans* H99 (Figura 10B), como observado para a linhagem de *C. gattii* L27/01.

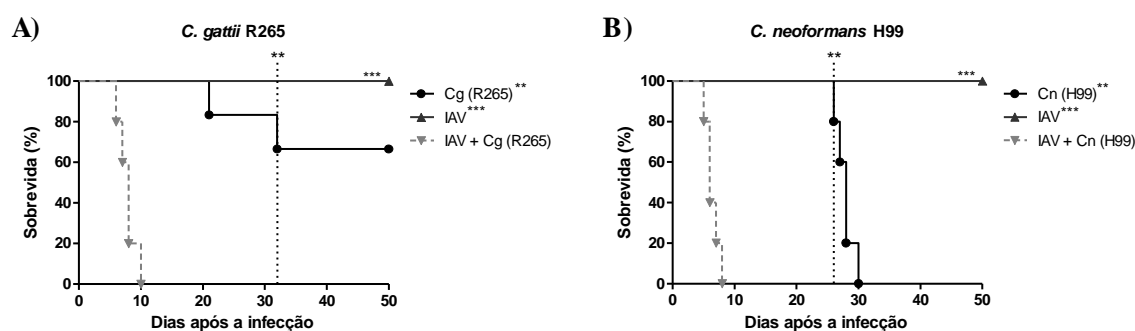


Figura 10: Curva de sobrevida de camundongos infectados ou coinfectados com o vírus Influenza A e diferentes linhagens de *Cryptococcus*. Outras linhagens de *Cryptococcus* foram testadas para o modelo de coinfeccção com o vírus influenza A selecionado. Seis camundongos por grupo (C57BL/6) foram infectados i.n. com 1×10^3 UFP/animal do vírus Influenza A (IAV) três dias antes da infecção i.t. (3 DAI) por *C. gattii* (Cg) R265, VGII (A) ou por *C. neoformans* (Cn) H99, VNI (B), ambos com um inóculo de 1×10^4 UFC/animal. ----A linha pontilhada vertical indica onde inicia a diferença mais perceptível entre os grupos. ** $p < 0,05$ e *** $p < 0,005$ (diferença quando comparado ao grupo IAV+Cg ou IAV+Cn).

Um estudo prévio de nosso grupo demonstrou que a carga viral de influenza nos pulmões foi maior no quarto dia de infecção e o vírus passa a não ser detectado a partir do décimo dia da infecção viral (Barbosa et al., 2014). Portanto, tendo em vista que dentre todos os tempos testados somente a coinfeção com o vírus influenza 3 DAI resultou em diminuição da sobrevivência dos camundongos, nossos dados sugerem uma forte ligação entre a alta replicação viral e o aumento da susceptibilidade à *C. gattii* durante infecções agudas por influenza. Para testar essa hipótese, nós tratamos os animais diariamente com o antiviral oseltamivir e/ou com o antifúngico fluconazol. Notavelmente, foi verificado que o tratamento com oseltamivir aumentou significativamente a sobrevivência dos camundongos coinfectados em relação aos animais coinfectados não tratados (Figura 11B). Por outro lado, apesar do tratamento com o antifúngico fluconazol aumentar a sobrevivência dos animais infectados somente com *C. gattii*; o fluconazol não alterou a sobrevivência dos animais coinfectados quando comparado ao grupo coinfectado não tratado (Figura 11C). Entretanto, o tratamento combinado com ambas as drogas (Oselt+FLZ) também aumentou significativamente a sobrevivência dos camundongos coinfectados (Figura 11D).

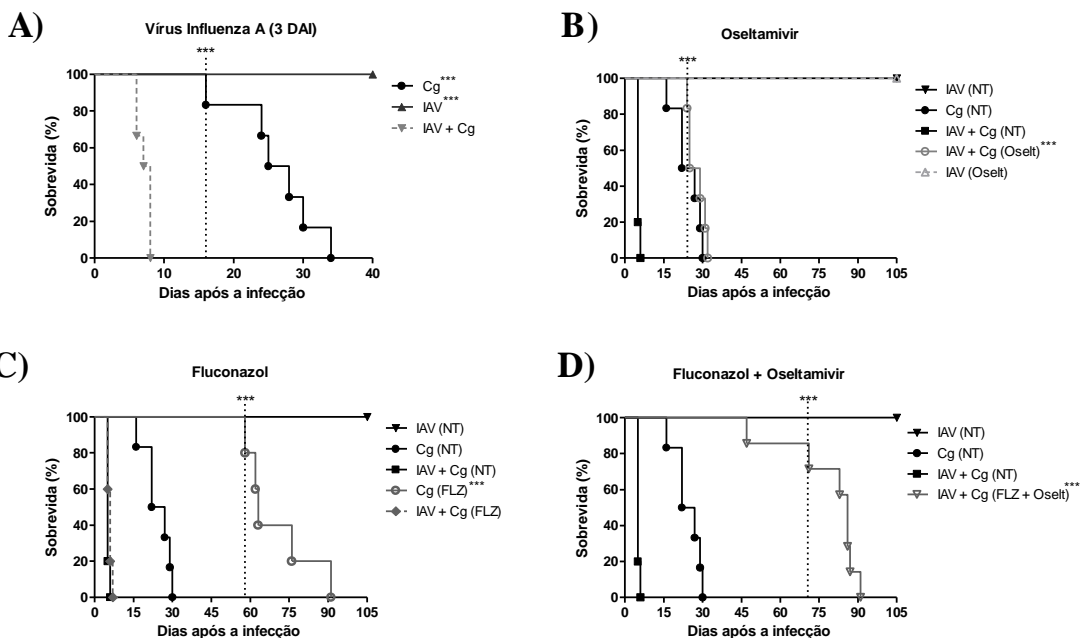


Figura 11: Curva de sobrevivência e tratamento de animais coinfectados com Vírus Influenza A (IAV) e *C. gattii* (Cg). A) Curva de sobrevivência dos animais coinfectados com o vírus influenza A 3 DAI por *C. gattii*. Curva de sobrevivência de animais tratados com Oseltamivir (B), Fluconazol (C) ou com a associação de ambos os tratamentos fluconazol e Oseltamivir (D). Cg: *C. gattii* L27/01; IAV: Vírus Influenza A PR8 H1N1; IAV+Cg: Vírus Influenza A inoculado três dias antes da infecção (3 DAI) por *C. gattii*; NT: grupo não tratado; FLZ: Fluconazol; Oselt: Oseltamivir. *** $p < 0.001$ (diferença quando comparado ao grupo IAV+Cg). ----A linha pontilhada vertical indica onde inicia a diferença mais perceptível entre os grupos.

A aplicação do protocolo SHIRPA mostrou que a infecção por *C. gattii* causou disfunção cerebral, enquanto não foi detectado comprometimento cerebral durante a infecção com o vírus influenza (Figura 12A-E). Além disso, animais coinfectados com Influenza (3 DAI) e *C. gattii* apresentaram graves alterações funcionais e comportamentais, apresentando um significativo decréscimo nas cinco categorias avaliadas, tais como, tônus e força muscular; comportamento motor; estado neuropsiquiátrico; função autônoma e função e reflexo sensorial; e ainda apresentaram maior perda de peso em relação a todos os outros grupos analisados (Figura 12A-F). Essas alterações indicam uma maior morbidade dos animais coinfectados com base na análise comportamental através do protocolo SHIRPA.

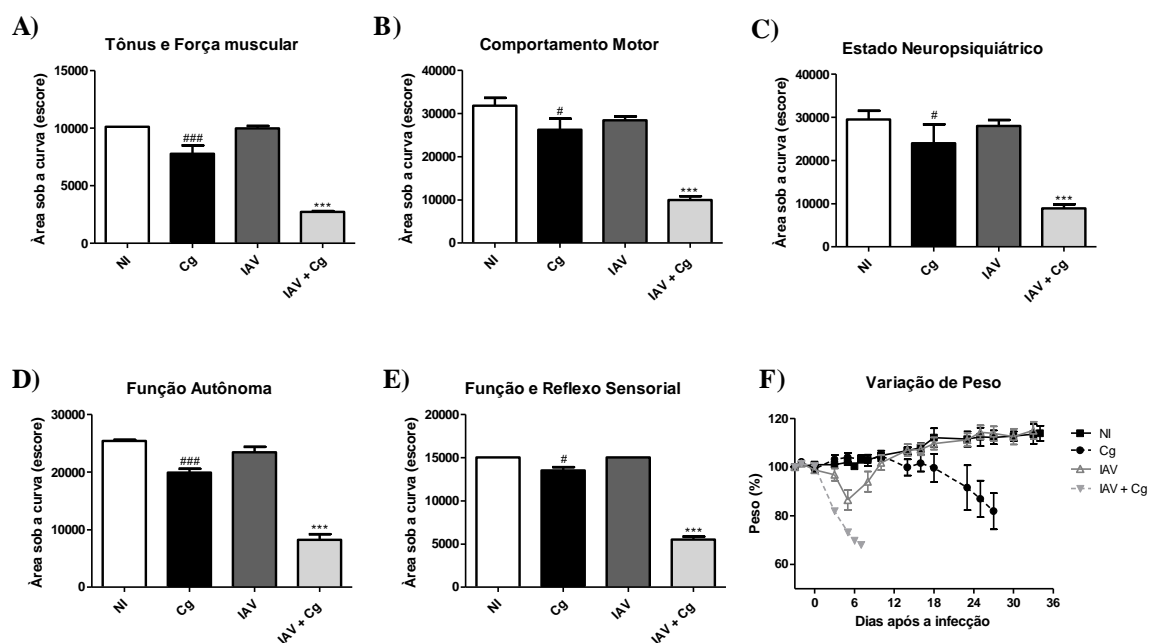


Figura 12: Perfil comportamental e variação de peso dos animais coinfectados com Vírus Influenza A (IAV) e *C. gattii* (Cg). A avaliação do perfil comportamental dos animais foi realizada através do Protocolo SHIRPA, resultados encontrados por análise da área sob a curva das cinco categorias funcionais do score de gráficos obtidos com o protocolo SHIRPA (Anexo 5). **A)** Tônus e força muscular; **B)** Comportamento motor; **C)** Estado neuropsiquiátrico; **D)** Função autônoma; **E)** Função e reflexo sensorial; **F)** Acompanhamento de peso (%) dos animais. Cinco animais por grupo foram submetidos ao protocolo SHIRPA. **NI:** animais controles não infectados; **Cg:** *C. gattii* L27/01; **IAV:** Vírus Influenza A PR8 H1N1; **IAV+Cg:** Vírus Influenza A inoculado três dias antes da infecção (3 DAI) por *C. gattii*. *** $p < 0.0001$ (diferença estatística quando comparado ao grupo NI, Cg e IAV); # $p < 0.05$ e ### $p < 0.0001$ (diferença estatística quando comparado ao grupo NI).

5.2 Mensuração da carga fúngica e viral nos órgãos alvos

Para quantificar as unidades formadoras de colônias (UFCs) recuperadas dos órgãos dos camundongos, realizou-se uma nova infecção. Após quatro dias de infecção por *C. gattii* (equivalente a sete dias após a infecção viral) os animais foram eutanasiados para retirada dos órgãos alvo, conforme esquema da figura 6. A carga viral (UFP) dos pulmões e a carga fúngica (UFC) recuperadas dos pulmões, cérebro, lavado broncoalveolar (LBA), fígado e baço após quatro dias de infecção, são observadas na figura 13.

Para a determinação da carga viral, o vírus foi somente titulado a partir dos pulmões, pois não é sabida, para esse tipo viral, a disseminação para outros órgãos, nem para o SNC. A carga viral encontrada nos pulmões (figura 13A), não foi diferente estatisticamente, analisando a coinfeção e somente o vírus influenza A. O que nos mostra que o número de UFP/g de órgão não se modifica na presença de *C. gattii*.

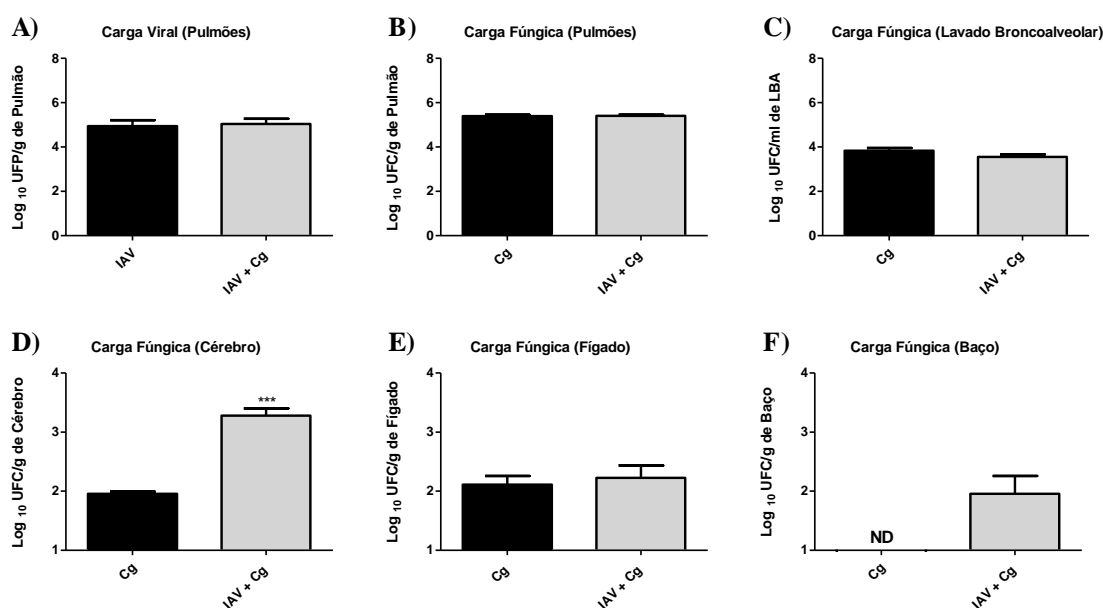


Figura 13: Carga viral (UFP/g de órgão) dos pulmões (A) e carga fúngica (UFC/g de órgão) recuperada dos pulmões (B); lavado broncoalveolar (C); cérebro (D); fígado (E) e baço (F) dos animais eutanasiados após 4 dias de infecção por *C. gattii*, coinfectados com o vírus Influenza PR8. Cg: *C. gattii*; IAV+Cg: Vírus Influenza A inoculado três dias antes da infecção (3 DAI) por *C. gattii*; ND: Não detectado. *** $p < 0.0005$ (diferença estatística quando comparado ao grupo Cg).

A infecção concomitante do vírus influenza A e *C. gattii* resultou no aumento significativo da carga fúngica no cérebro dos camundongos (figura 13D), mas não nos pulmões (figura 13B), quando comparado ao grupo somente infectado com *C. gattii*. O

aumento significativo da carga fúngica no SNC durante a coinfeção correlaciona-se com os dados encontrados acima através do protocolo SHIRPA (figura 12A-E). Em que foi visto alterações neurológicas e comportamentais significativas nos animais coinfectados com o vírus influenza A, tanto antes ou depois da infecção por *C. gattii*, resultando em maior morbidade e na mortalidade precoce dos camundongos.

Quando analisamos os outros órgãos tais como lavado, fígado e baço (figura 10C, 10E, 10F, respectivamente), não encontramos diferença estatística significativa entre a coinfeção pelo vírus dado três dias antes de *C. gattii* e *C. gattii* sozinho.

5.3 Análise histopatológica

Para avaliação histopatológica, seis animais por grupo foram inoculados i.t. com *C. gattii* (1×10^4 UFC/animal), ou com Influenza A i.n. (1×10^3 UFP/animal) ou coinfectados com ambos. Após quatro dias de infecção por *C. gattii* os animais foram eutanasiados e o cérebro e pulmões foram recuperados para as análises histopatológicas.

Nessa análise, foram avaliados os seguintes parâmetros histopatológicos incluídos no score total demonstrado na figura 14A: arquitetura pulmonar (danos no tecido pulmonar); degeneração das vias aéreas (bronquíolos); congestão e edemas dos septos alveolares; edema alveolar; infiltrado inflamatório bronquiolar e infiltrado inflamatório septal. Cada parâmetro foi classificado de 0 (ausente) a 4 (acentuado). Foi observada diferença estatística significativa (***) $p < 0.0005$ na presença do vírus Influenza (IAV e IAV + Cg), quando comparado aos animais não infectados (NI) e infectados somente com *C. gattii* (Cg).

De acordo com as análises histopatológicas (figura 14A,B), pode-se observar que a presença do vírus Influenza, independente de se tratar de uma monoinfecção (IAV) ou da coinfeção com *C. gattii* (IAV + Cg), provoca danos pulmonares, com alteração da arquitetura pulmonar e degeneração moderada das vias aéreas (bronquíolos), congestão e edema dos septos alveolares, e também resultando em maior infiltrado inflamatório bronquiolar e septal no tecido pulmonar, o que não acontece nos animais desafiados somente com o fungo *C. gattii*, no mesmo tempo de infecção.

A histopatologia do cérebro também foi realizada para o mesmo tempo de infecção acima (quatro dias após *C. gattii*), porém nenhuma alteração histopatológica foi identificada nenhum grupo avaliado para esse tempo de infecção, sem nenhuma diferença entre os grupos (dados não mostrados).

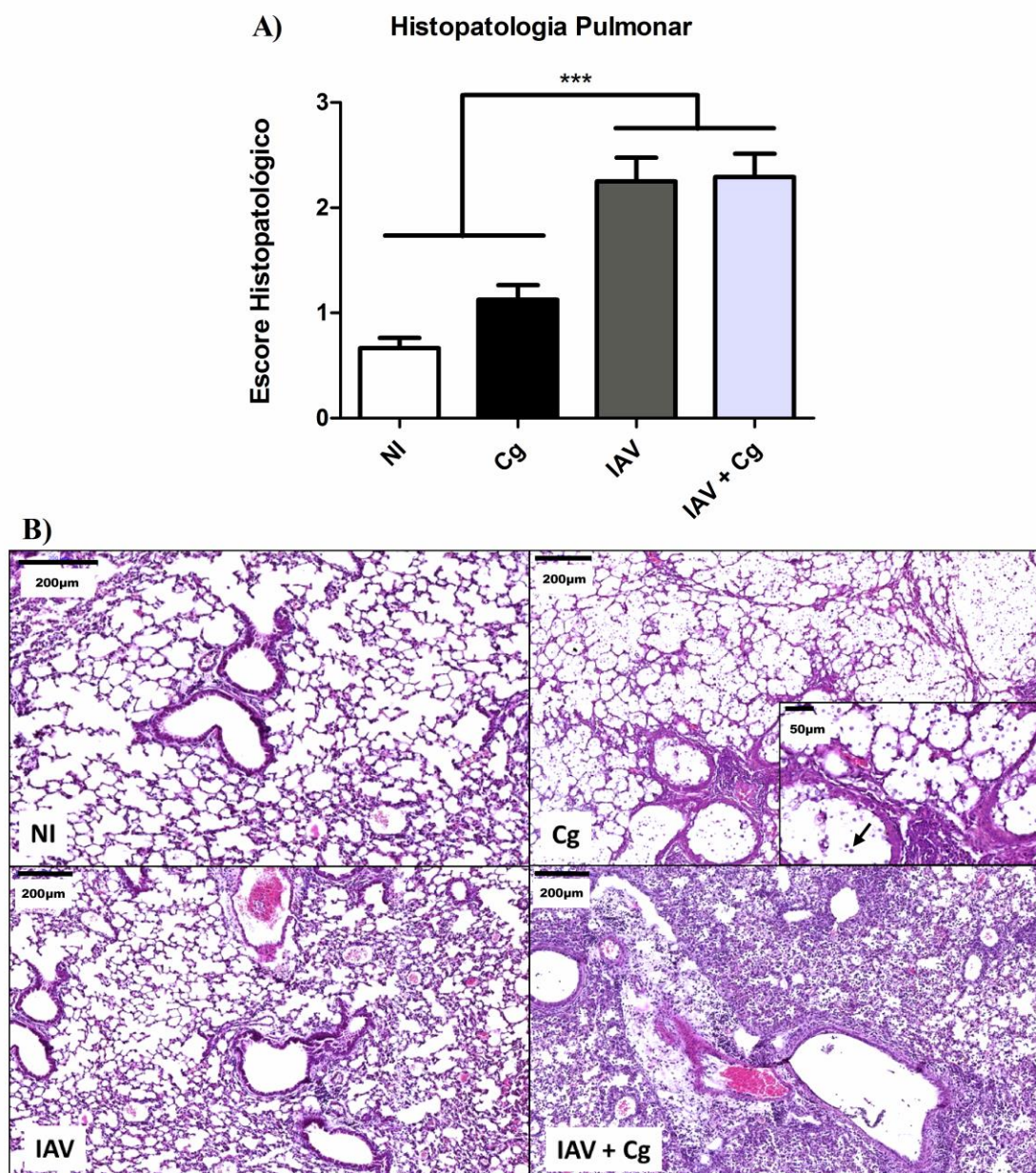


Figura 14: Análise histopatológica dos pulmões. Seis animais por grupo foram inoculados i.t. com *C. gattii* (1×10^4 UFC/animal), ou com Influenza A i.n. (1×10^3 UFP/animal) ou coinfetados com ambos. Os animais foram eutanasiados após quarto dias de infecção por *C. gattii* e os pulmões recuperados. As seções histológicas dos pulmões foram coradas com HE e visualizadas a uma amplificação de 200 \times , foram avaliados pelo menos 10 campos por lâmina. **A)** Escore histopatológico dos pulmões. **B)** Painel histopatológico. Figuras representativas da histopatologia dos pulmões (barra de escala = 200 μ m). A seta indica a presença da levedura *C. gattii* na caixa amplificada (barra de escala = 50 μ m). **Cg:** *C. gattii*; **IAV:** vírus Influenza A; **IAV+Cg:** Vírus Influenza A inoculado três dias antes da infecção (3 DAI) por *C. gattii*; **NI:** grupo não infectado. *** $p < 0.0005$ (diferença estatística quando comparado ao grupo Cg).

5.4 Análise morfométrica de *C. gattii* recuperado do lavado broncoalveolar

Para a análise morfométrica de *C. gattii*, foi determinado o diâmetro celular total, tamanho da cápsula e potencial Zeta das células após 48 horas de incubação a

37°C em ASD. As células foram recuperadas do lavado broncoalveolar de camundongos monoinfectados ou coinfectados que foram eutanasiados quatro dias após a infecção por *C. gattii* (equivalente a sete dias da infecção viral), conforme o tópico 4.7.3 e figura 6B.

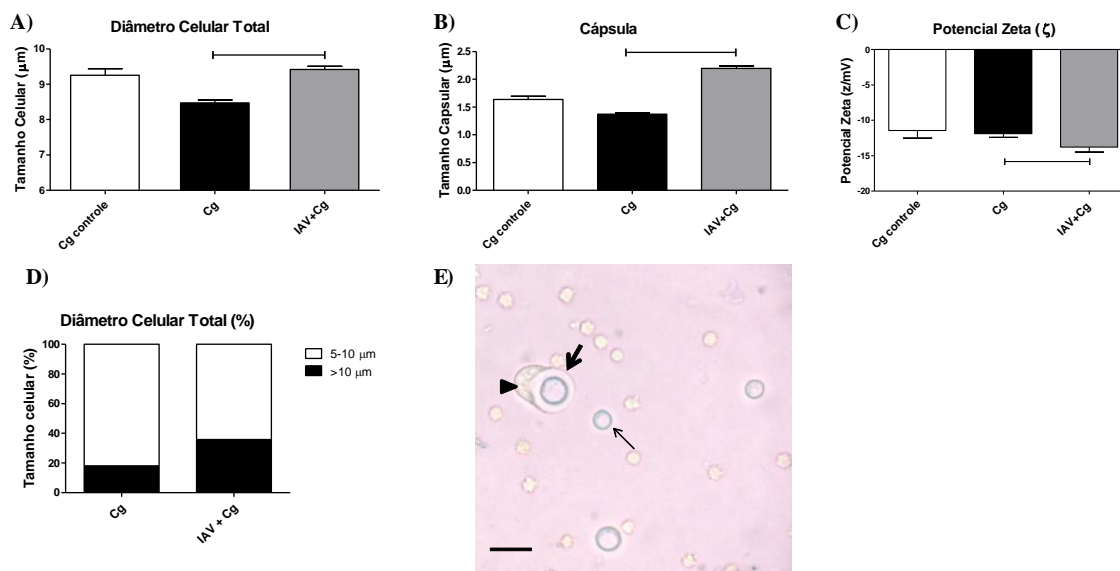


Figura 15: Análise morfométrica de *C. gattii*. **A)** Tamanho do diâmetro celular total (µm); **B)** Tamanho da cápsula polissacarídica (µm); **C)** Potencial Zeta (z/mV) e **D)** Porcentagem do diâmetro celular total (%) das células de *C. gattii* recuperadas do LBA dos animais eutanasiados quatro dias após a infecção por *C. gattii*. **5-10 µm:** células com tamanho considerado típico para *Cryptococcus* ssp.; e **>10 µm:** células maiores. **E)** Foto representativa obtida do LBA de animais coinfectados, visualizadas durante a contagem em câmara de Neubauer. A cabeça de seta (►) mostra uma célula fagocítica tentando fagocitar uma aumentada e encapsulada célula de *Cryptococcus* (seta grossa), e a seta fina mostra uma célula de *Cryptococcus* com tamanho típico. Barra de escala = 20 µm. **Cg controle:** grupo controle, análise das células de *C. gattii* mantidas *in vitro* que foram usadas para a infecção dos animais. **Cg:** grupo infectado somente com *C. gattii*. **IAV+Cg:** grupo infectado com vírus três dias antes da infecção por *C. gattii*. Diferença estatística ($p < 0.05$) entre os grupos comparados entre si são representadas pelas linhas horizontais (—).

É possível observar, na figura 15, alterações morfológicas de *C. gattii* na presença do vírus, em relação aos animais infectados somente pela levedura. Assim como o aumento do diâmetro das colônias (Figura 15A) recuperadas do lavado broncoalveolar (LBA). Da mesma forma, durante a coinfeção as células de *C. gattii* se tornam maiores, apresentando uma maior proporção de células com tamanho >10µm (35,9%), enquanto a infecção somente por *C. gattii* apresenta somente 18% de células maiores do que 10 µm (Figura 15D).

No que diz respeito à cápsula polissacarídica (Figura 15B), a coinfeção resultou em maior tamanho da cápsula ($p < 0.05$). Adicionalmente, como pode ser visto na figura

15C o potencial Zeta foi mais eletronegativo nas colônias adquiridas do LBA dos animais coinfectados em relação à infecção somente por *C. gattii*. Deve-se destacar o aumentado tamanho da cápsula e célula de *C. gattii* demonstrado pela seta grossa na figura 15D. Esses fatos juntos (maior cápsula, diâmetro e eletronegatividade) possivelmente dificultam a fagocitose como apontado pela cabeça de seta na foto do LBA (Figura 15D) e o aumento da cápsula pode ainda proteger a levedura de espécies reativas, prevenindo a morte celular.

5.5 Análise do perfil inflamatório de camundongos infectados com o vírus Influenza A

Dado as alterações histopatológicas encontradas nos pulmões causadas pelo vírus influenza A, foi investigado a resposta imune do hospedeiro contra o vírus influenza, que pode também ser responsável pela maior susceptibilidade à infecção secundária por *C. gattii*. Portanto, a análise dos mediadores inflamatórios e população celular no sítio de infecção foram alcançadas (tópico 4.8 e figura 7) com intuito de verificar a resposta inflamatória causada por influenza A no hospedeiro no momento da infecção por *C. gattii*. Nesse experimento, foi avaliado somente o vírus influenza A (1×10^3 UFP/animal), comparados a animais não infectados. Os animais foram eutanasiados com três dias de infecção pelo vírus influenza, correspondente ao dia que seria inoculado o fungo *C. gattii*.

A expressão dos genes de interferons do tipo I, tais como, interferon alfa (IFN- α 4) e beta (IFN- β) foram significativamente maiores ($p < 0.0005$) na infecção por influenza (Figura 16A e B, respectivamente). Intrigantemente, os níveis de interferon gama (IFN- γ) foram estatisticamente reduzidos ($p < 0.005$) após três dias da infecção viral em comparação com animais não infectados (Figura 16C). Além disso, os níveis do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) não foram alterados pelo vírus influenza (Figura 16D). Foi observado o aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como CXCL-1 (Figura 16E), interleucina 1- β (IL-1 β) (Figura 16F) e IL-6 (Figura 16G) após a infecção viral. Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias IL-4 (Figura 16H) e IL-10 (Figura 16I) foram reduzidas em comparação ao grupo não infectado.

Além disso, como é observado na figura 17, o vírus influenza também induz o recrutamento de células pró-inflamatórias para o local da infecção. A quantificação da atividade de MPO foi utilizada como medida indireta da acumulação de neutrófilos,

uma vez que MPO é a enzima pró-inflamatória mais abundante armazenada nos grânulos azurofílicos de granulócitos de neutrófilos (Pulli et al., 2013). Dessa mesma forma, uma estimativa da infiltração de macrófagos é dada pelo nível de NAG que está presente em alta atividade em macrófagos ativados (Bailey, 1988). Como resultado, as atividades das enzimas MPO (Figura 17A) e NAG (Figura 17B) foram elevadas significativamente ($p < 0.05$) nos pulmões de camundongos infectados por influenza A comparados aos animais NI, sugerindo que neutrófilos e macrófagos, respectivamente, têm sido recrutados para o local da infecção.

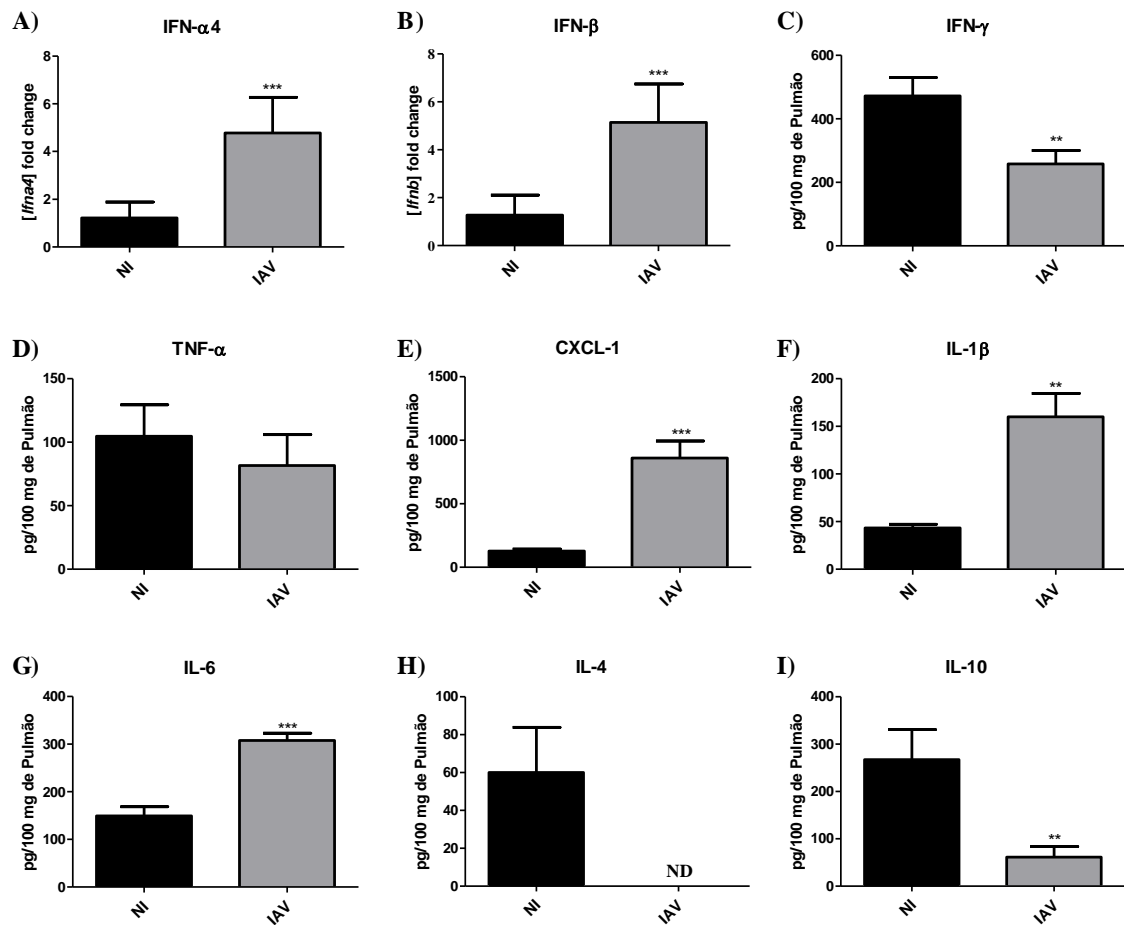


Figura 16: Quantificação de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos após três dias de infecção por influenza A comparado a animais não infectados. Seis camundongos por grupo foram infectados somente com o vírus influenza (IAV) ou não infectados (NI) para investigar a resposta imunológica induzida pelo vírus influenza. Expressão do mRNA de IFN- α 4 (A) e IFN- β (B). Níveis de IFN- γ (C), TNF- α (D), CXCL-1 (E), IL-1 β (F), IL-6 (G), IL-4 (H) e IL-10 (I). ND: não detectado. ** $p < 0.005$ e *** $p < 0.0005$ (diferença estatística quando comparado ao grupo NI).

A análise por citometria de fluxo revelou um aumento no influxo de neutrófilos para o parênquima pulmonar em animais infectados com influenza (Figura 17C),

corroborando os dados de MPO. As células *Natural Killer* (NK) foram também aumentadas nos pulmões (Figura 17D). De uma forma geral a população de linfócitos (linfócitos totais, linfócitos T CD4, T CD8 e linfócito B) não foi alterada pela infecção viral (Figura 17E-H).

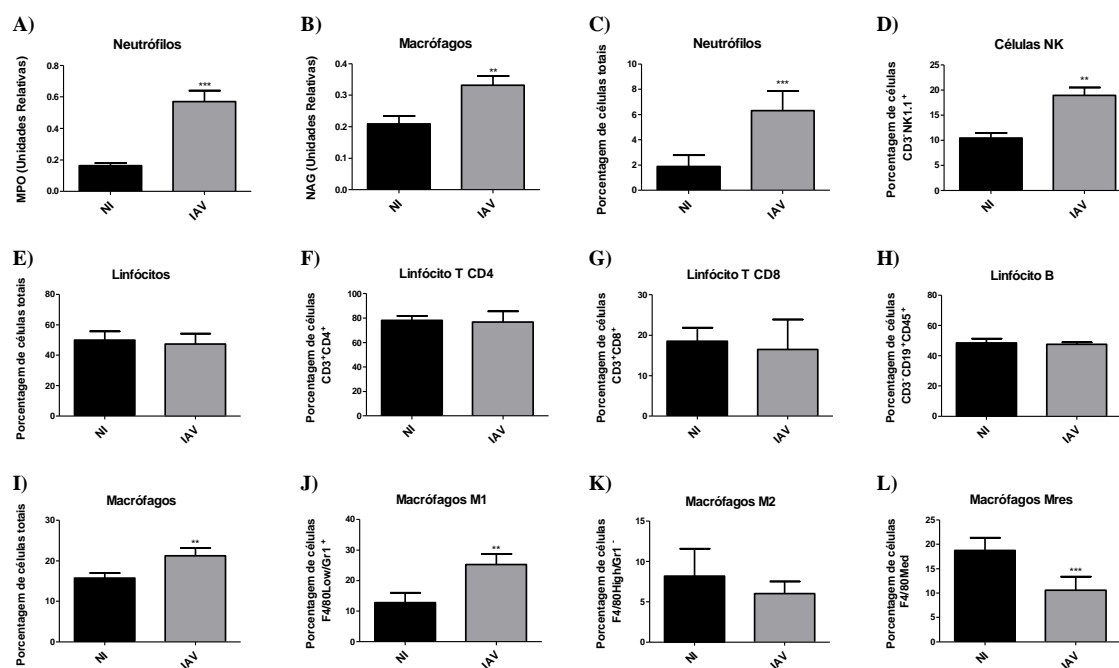


Figura 17: Recrutamento celular nos pulmões induzido pelo vírus influenza A (IAV), após três dias da infecção viral, comparado a animais não infectados (NI). O número relativo de neutrófilos (A) e macrófagos (B) foram determinados indiretamente pela quantificação da atividade das enzimas MPO e NAG, respectivamente. A análise de citometria de fluxo também foi realizada a partir do tecido pulmonar para identificação celular. População de neutrófilos (Ly6G⁺/GR1⁺) (C); células NK (CD3⁺NK1.1⁺) (D); Linfócitos totais (E); Linfócitos T CD4 (CD3⁺CD4⁺) (F); Linfócitos T CD8 (CD3⁺CD8⁺) (G); Linfócitos B (CD3⁺CD19⁺CD45⁺) (H); Macrófagos totais (F4/80⁺) (I); Macrófagos M1 (F4/80^{low}Gr1⁺Cd11b^{med}) (J); Macrófagos M2 (F4/80^{high}Gr1⁻Cd11b^{high}) (K); e Macrófagos Mres (F4/80^{med}Cd11b^{low}) (L). NI: animais controles não infectados; IAV: Vírus Influenza A. **p<0.005 e ***p<0.0005 (diferença estatística quando comparado ao grupo NI).

Foi também verificado o influxo de macrófagos para os pulmões de animais infectados com o vírus influenza A (Figura 17I). A polarização desses macrófagos, avaliados de acordo com a expressão de F4/80, GR1 e CD11b (Vago et al., 2015), revelou altos níveis (p<0.005) de macrófagos classicamente ativados (macrófagos M1), população definida como F4/80^{low}Gr1⁺Cd11b^{med} (Figura 17J). Porém nenhuma alteração foi verificada para macrófagos alternativamente ativados (macrófagos M2, F4/80^{high}Gr1⁻Cd11b^{high}) (Figure 17K), enquanto a população de macrófagos resolutivos (Mres, F4/80^{med}Cd11b^{low}) foi menor (p<0.05) na presença do vírus (Figure 17L).

5.6 Ensaios de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e quantificação do estresse oxidativo (ROS, PRN e NO)

O ensaio de fagocitose foi realizado *in vivo* por meio da contagem de leveduras internalizadas nas células recuperadas do LBA e *in vitro* com a coinfeção de macrófagos obtidos de medula (BMDMs), como delineado no tópico 4.9 (figura 8). E, portanto, a influência do vírus Influenza A na fagocitose, no índice de proliferação intracelular (IPR) de *C. gattii* e na produção de espécies reativas (ROS, PRN e NO) foram determinados (Figura 18).

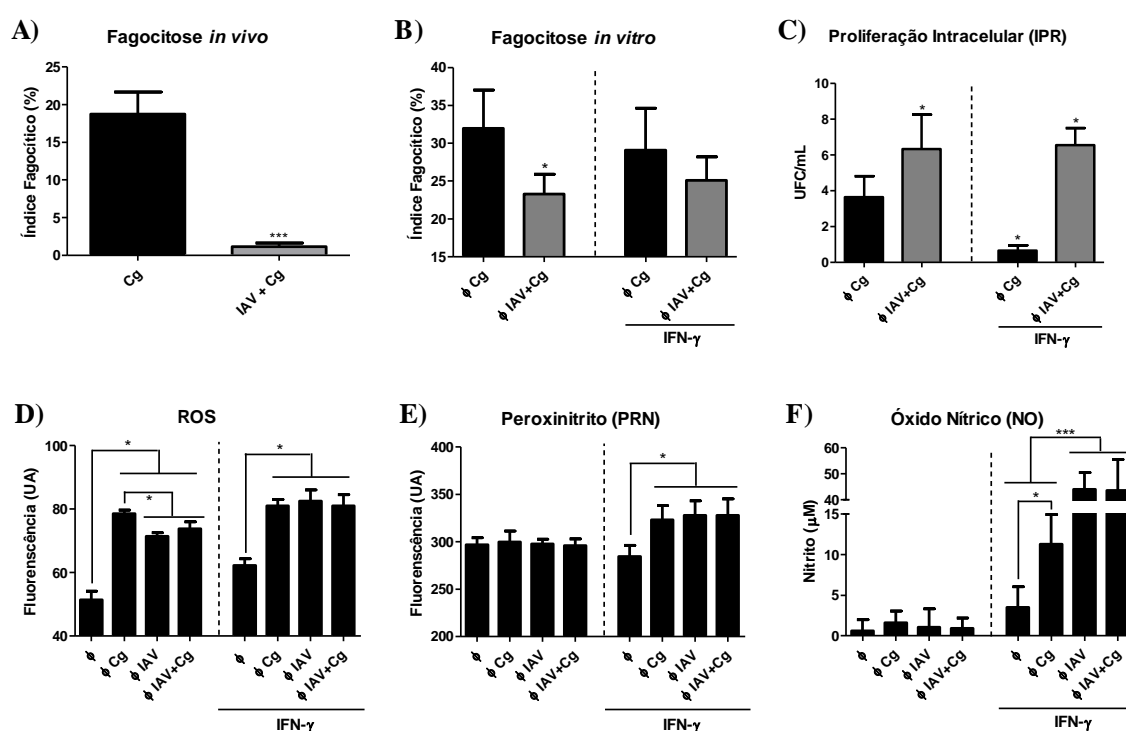


Figura 18: Ensaio de fagocitose *in vivo* e *in vitro*, proliferação intracelular (IPR) e produção de espécies reativas (ROS, PRN e NO). **A)** Fagocitose *in vivo*. Índice fagocítico (%) de leveduras internalizadas em células fagocíticas recuperadas do LBA aspirado de camundongos infectados com *C. gattii* e frente à coinfeção entre *C. gattii* e influenza (3 DAI). **B)** Fagocitose *in vitro* com BMDMs. Índice fagocítico de macrófagos BMDMs após 3h de incubação com *C. gattii*. **C)** Relação da proliferação intracelular (IPR) *in vitro* de *C. gattii* internalizados entre os tempos de 24 e 3 horas (24:3h). Produção de espécies reativas de oxigênio - ROS (**D**); Peroxinitrito - PRN (**E**) e óxido nítrico - NO (**F**) após 3h de infecção por *C. gattii*. Para a fagocitose *in vitro*, IPR, ROS, PRN e NO, grupos independentes de BMDMs foram infectados com *C. gattii* (Cg), Influenza (IAV) ou com Influenza A 2h antes de *C. gattii* (IAV+Cg). Os grupos foram estimulados ou não com IFN-γ. **Cg:** *C. gattii* somente; **IAV:** vírus influenza A somente; **IAV+Cg:** vírus Influenza A 2h antes de *C. gattii*. **φ:** BMDM. *p<0.05 e ***p<0.0005 (diferença estatística quando comparado ao grupo Cg).

O índice fagocítico *in vivo* de *C. gattii* em animais coinfectados (IAV+Cg) foi reduzido em comparação com aqueles animais infectados somente com *C. gattii*. (Figura 18A). Como pode ser visto na figura 18B, esses dados foram confirmados no ensaio de fagocitose *in vitro* usando células BMDMs, no qual o índice fagocítico de macrófagos é diminuído ($p < 0.05$) na presença do vírus, após 3 horas de incubação com *C. gattii*. Além disso, o ensaio de IPR revela que a carga fúngica é aumentada no interior dos macrófagos, indicando maior taxa de proliferação intracelular (figura 18C), ou seja, *C. gattii* tem uma maior capacidade de crescer no interior de BMDMs que têm sido previamente infectados com o vírus influenza.

Investigou-se também o estresse oxidativo gerado durante a fagocitose nos tempos de 3 horas após a infecção por *C. gattii*, controles para produção de ROS e PRN foram feitos e são mostrados no anexo 6. Os resultados demonstraram que o desafio de macrófagos com o vírus influenza, ou com a coinfecção reduziu a produção de ROS comparado a células infectadas somente com *C. gattii* (Figura 18D), mas não reduziu a produção de PRN (Figura 18E), nem de NO (Figura 18F). O tratamento com IFN- γ aumentou a atividade oxidativa dos macrófagos (Figura 18D-F) e diminuiu a IPR para BMDMs desafiados somente com *C. gattii*. Entretanto, em macrófagos coinfectados, o vírus influenza A comprometeu a atividade fungicida dos macrófagos independente da elevação nos níveis de ROS, PRN e NO induzido pelo IFN- γ sendo, mesmo assim, observado maior proliferação intracelular de *C. gattii* (Figura 18C). Portanto, a presença do vírus influenza prejudica a fagocitose e a produção de ROS e aumenta a taxa de proliferação intracelular de *C. gattii*.

5.7 Transmigração de *Cryptococcus* durante a coinfecção, e a manutenção da integridade e permeabilidade da membrana da BBB

Com a finalidade de verificar a transmigração de *C. gattii* na presença ou ausência do vírus Influenza A, foi contruído um modelo *in vitro* de BBB composto por células endoteliais humanas do SNC. As células endoteliais (HBEC) foram infectadas com diferentes concentrações ($2,5 \times 10^4$ UFP [5 μ l]; 5×10^4 UFP [10 μ l] ou $7,5 \times 10^4$ UFP [15 μ l]) do vírus influenza, 30 minutos antes da adição do fungo e incubadas *overnight* a 37°C em 5% CO₂. Como pode ser observado na figura 19 o vírus influenza diminui significativamente o número de colônias de *C. gattii* recuperadas da parte superior da transwell (*Top transwell*), ao passo que aumentou o número de colônias recuperadas da

parte inferior da *transwell* (*Bottom transwell*) quando adicionado na concentração de $2,5 \times 10^4$ UFP (5 μ l) (Figura 19A,B). Esse resultado sugere uma maior transmigração de *C. gattii* na presença do vírus influenza, uma vez que maior número de células foi encontrado na parte de baixo do *transwell*, indicando a transmigração do fungo através BBB.

Um controle para células de *C. gattii* crescidas *overnight* nas mesmas condições (37°C à 5% CO₂), somente nos poços (*well*) sem a adição do *corningt* (*transwell*) foi feito e foi verificado que o influenza não altera o crescimento de *C. gattii*, seja na presença ou ausência das células endoteliais (Figura 19C).

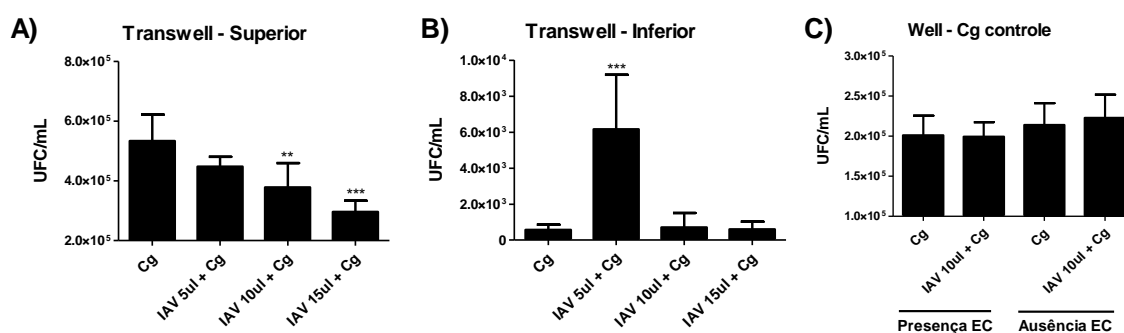


Figura 19: Modelo *in vitro* de transmigração de *C. gattii* através da barreira hematoencefálica. Células endoteliais humanas (HBEC) foram desafiadas somente com *C. gattii* ou coinfectadas com *C. gattii* e o vírus influenza em diferentes concentrações $2,5 \times 10^4$ UFP, 5×10^4 UFP, ou $7,5 \times 10^4$ UFP (5, 10 ou 15 μ l, respectivamente). Após 24 horas de incubação a 37°C em 5% de CO₂, uma alíquota de cada amostra da parte superior e inferior da *transwell* foram plaqueadas em ágar Sabouraud para determinação de UFC/mL de *C. gattii* recuperadas de ambos os lados da *transwell*. **A)** *C. gattii* (UFC/mL) recuperadas da parte superior da *transwell* (*Transwell - Superior*). **B)** *C. gattii* (UFC/mL) recuperadas da parte inferior da *transwell* (*Transwell - Inferior*). **C)** Controle de viabilidade de *C. gattii*, feito em placas de 24 poços sem *transwell* (somente *well*), incubadas na presença ou ausência do vírus Influenza A, e de células endoteliais (EC). **p<0.005 e ***p<0.0005 (diferença estatística quando comparado ao grupo Cg).

Após 24 horas de infecção pelo vírus influenza A, foi também avaliada a integridade e permeabilidade das células endoteliais (HBEC) que compõem o modelo *in vitro* da BBB através da detecção do FITC-Dextran na parte de baixo da *Transwell* (*bottom*). A figura 20 A e B demonstra que independente da presença do vírus influenza, em ambas as concentrações testadas ($2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 UFP, correspondente a 5 e 10 μ l), a integridade da BBB se mantém, uma vez que não é observada diferença significativa entre a quantidade de FITC-Dextran recuperado da parte inferior da *transwell*. Podemos confirmar, analisando a figura 20A, que a BBB composta pelas células endoteliais (HBEC) diminui a permeabilidade, diminuindo significativamente a quantidade de transmigração de FITC-Dextran quando comparada ao grupo sem adição das células endoteliais, que permite alta migração do FICT-Dextran para a parte inferior

da *transwell*. Esse controle é importante, pois mostra a eficiência da BBB formada em nosso modelo, que mimetiza as fortes junções celulares da barreira hematoencefálica, apresentando pouca permeabilidade.

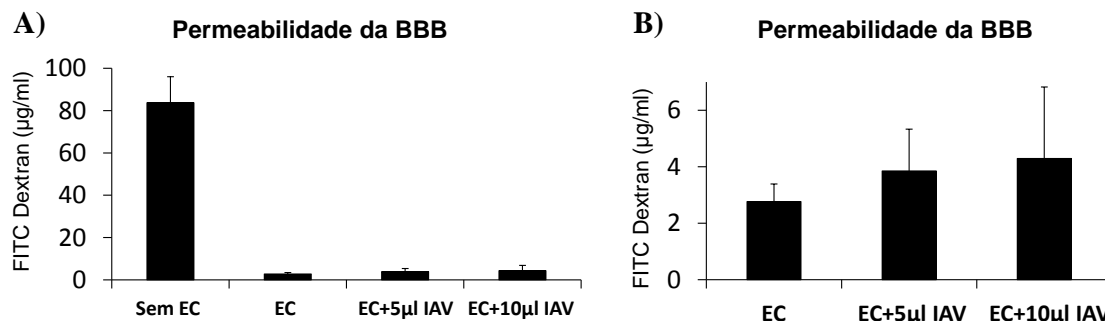


Figura 20: Manutenção da integridade e permeabilidade da BBB desafiadas com o vírus Influenza A. Células endoteliais (HBEC) que compõem a BBB foram desafiadas ou não com o vírus influenza A em diferentes concentrações ($2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 UFP, correspondente a 5 ou 10 µl de IAV). Após 24 horas de incubação a 37°C em 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e uma concentração conhecida de FITC-Dextran foi adicionada na parte superior da *transwell*. Como indicativo de transmigração após 1h e 30 min, uma alíquota foi retirada da parte inferior para quantificação de FITC-Dextran existente na parte inferior da *transwell*. **A)** Permeabilidade da membrana, comparando os grupos da BBB com o controle sem adição das células endoteliais (EC). **B)** Permeabilidade da membrana dos grupos da BBB contendo as células endoteliais na presença ou ausência do vírus. **Sem EC:** grupo sem adição da camada de células endoteliais que formam a BBB. **EC:** grupo com a BBB formada por células endoteliais na ausência do vírus influenza A. **EC + 5 µl IAV:** grupo onde a células endoteliais da BBB foram desafiadas com 5 µl ($2,5 \times 10^4$ UFP) do vírus influenza A. **EC + 10 µl IAV:** grupo onde a células endoteliais da BBB foram desafiadas com 10 µl (5×10^4 UFP) do vírus influenza A.

Para verificar o mecanismo de “Cavalo de Tróia”, onde *C. gattii* ultrapassa a BBB dentro das células fagocíticas para evadir o sistema imune, foi usado células PBMC e monócitos humanos (CD14⁺). Primeiramente, na figura 21A, foi verificado o efeito do vírus influenza na fagocitose de *C. gattii* por células PBMCs humanas. Condizendo ao resultado da fagocitose e IPR com BMDMs acima (Figura 18) o vírus influenza também aumenta o número de células recuperadas no interior das células PBMC (*p<0.05) em relação ao grupo PBMC infectado somente com *C. gattii*. Por outro lado, a viabilidade de *C. gattii* não é alterada quando a levedura é incubada na presença do vírus influenza. Mais uma vez confirma-se que o vírus influenza não afeta o crescimento de *C. gattii*.

No ensaio de transmigração utilizando células PBMC, nenhuma diferença estatística foi observada na carga fúngica, apesar do ligeiro aumento no número de leveduras recuperadas na parte superior (*Top*) da *transwell* na presença do vírus e das células PBMC (Figura 21B). Nesse ensaio não foi possível determinar a taxa de transmigração do fungo, uma vez que nenhuma colônia foi detectada na parte inferior

(Bottom) da *transwell* para ambos os grupos (Figura 21C). Entretanto, quando avaliamos o segundo ensaio de transmigração, Figura 21 D-F, fica evidente que o vírus influenza diminui estatisticamente (***) o número de *C. gattii* recuperado da parte superior da *transwell* (Top) independente da presença das células CD14⁺ ou não (Figura 21D). Além disso, o vírus aumenta o número de células de *C. gattii* na parte inferior (Bottom) da *transwell* (Figura 21E), implicando em maior transmigração da levedura na presença do vírus. Esse dado é confirmado pelo gráfico de porcentagem de transmigração (Figura 21F), no qual *C. gattii* possui maior taxa de transmigração na presença do vírus influenza, principalmente quando na presença das células de monócitos clássicos CD14⁺, indicando a ocorrência do mecanismo de “Cavalo de Troia” nessas condições.

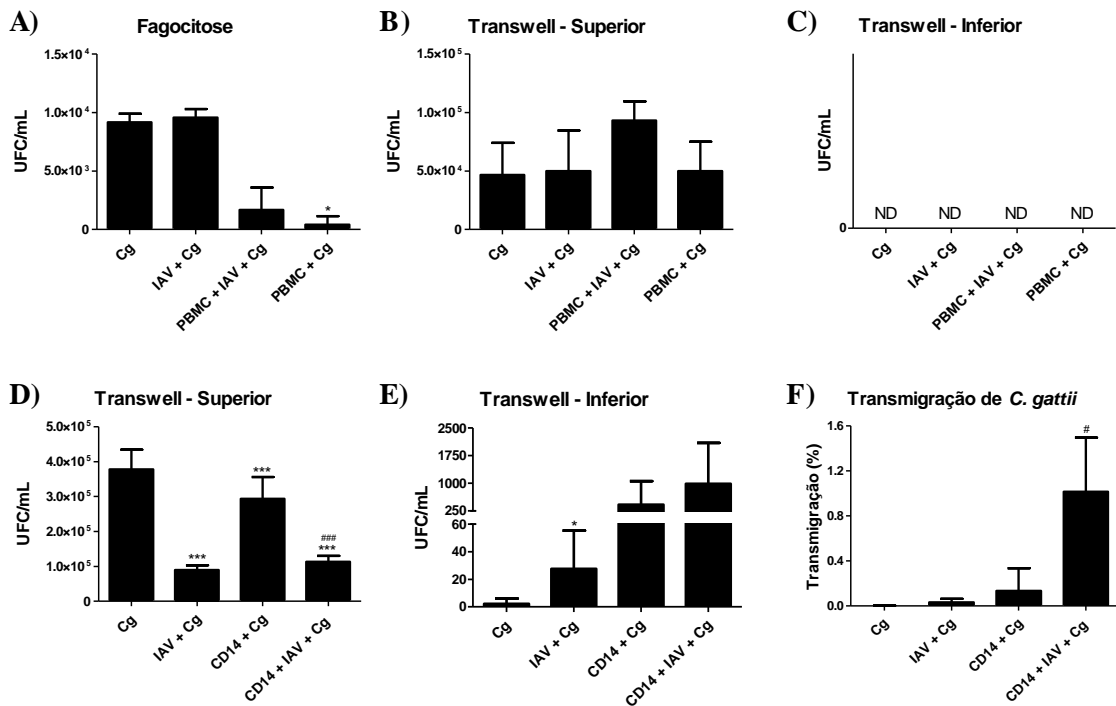


Figura 21: Ensaio de fagocitose e transmigração utilizando células humanas PBMC e CD14. Avaliação da transmigração de *C. gattii* dentro das células fagocíticas com o intuito de verificar o mecanismo de “Cavalo de Tróia”. **A)** Fagocitose de *C. gattii* por células PBMC humanas. **B)** *C. gattii* (UFC/mL) recuperadas da parte superior da *transwell* (*Transwell - Superior*), durante transmigração na presença de células PBMC. **C)** *C. gattii* (UFC/mL) recuperadas da parte inferior da *transwell* (*Transwell - Inferior*), durante transmigração na presença de células PBMC. **D)** *C. gattii* (UFC/mL) recuperadas da parte superior da *transwell* (*Transwell - Superior*), durante transmigração na presença de células CD14⁺ humanas. **E)** *C. gattii* (UFC/mL) recuperadas da parte inferior da *transwell* (*Transwell - Inferior*), durante transmigração na presença de células CD14⁺ humanas. **F)** Porcentagem da transmigração de *C. gattii* na presença de células CD14⁺ humanas. **ND:** Não detectado. *p<0.05 e ***p<0.0005 (diferença estatística quando comparado ao grupo Cg) e #p<0.05 e ###p<0.0005 (diferença estatística quando comparado ao grupo Cg+CD14).

6 DISCUSSÃO

A incidência de infecções invasivas aumentou consideravelmente nos últimos anos, causada por uma maior população de imunocomprometidos (Sá e Zaragoza, 2008). Dentre elas a criptococose é uma infecção fúngica com uma distribuição geográfica universal, que afeta mais de um milhão de pessoas por ano em todo o mundo. Diante da problemática encontrada para seu tratamento, a criptococose muitas vezes tem pobre prognóstico, o que aumenta sua morbimortalidade (Cogliati, 2013; Martín-Peña, Aguilar-Guisado e Cisneros, 2013). *Cryptococcus gattii* surge como um patógeno primário emergente que causa criptococose sistêmica também em hospedeiros imunocompetentes (Soares et al., 2011).

Adicionalmente, o vírus influenza A, é responsável por significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo (Saxena et al., 2017). A infecção pelo vírus influenza acarreta uma patologia cuja evolução pode ser benigna, até graves infecções do trato respiratório sendo frequentemente fatal (Kuiken et al., 2012). Infecções pelo vírus Influenza são de grande interesse na saúde pública, pois além das epidemias sazonais, causam pandemias em intervalos irregulares (Krammer e Palese, 2015). Além disso, mesmo com as normas médicas e a saúde pública moderna, segundo a Organização Mundial de Saúde, as doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortes em todo o mundo depois das doenças cardiovasculares (WHO, 2004). Muitas vezes, ônus das doenças e as maiores despesas para a saúde vêm de várias infecções que ocorrem simultaneamente, isto é, a coinfeção (Pasman, 2012). Uma vez que as coinfeções vêm ganhando mais espaço, atenções devem ser voltadas para lidar com essas infecções que, por se tratar de mais de um patógeno associado ao hospedeiro, resultam em quadros clínicos mais graves, de difícil tratamento, podendo levar ao óbito (Smith et al., 2013). Além disso, o vírus influenza tem sido amplamente associado com aspergilose invasiva secundária, mesmo entre pacientes imunocompetentes, incluindo aqueles sem fatores de risco clássico (Kwon et al., 2013; Alshabani et al., 2015; Crum-Cianflone, 2016).

Dessa maneira, baseado em vários relatos de coinfeções vírus-*Aspergillus* e vírus-bactéria com difícil prognóstico (Aebi et al., 2010; Liu et al., 2013; Cauley e Vella, 2015; Duvigneau et al., 2016), e dado a importância e gravidade da infecção por Influenza A e pelo fungo *Cryptococcus* spp., torna-se necessário entender os mecanismos envolvidos na interação entre Influenza e *Cryptococcus* spp.. Uma vez que estes dois patógenos acometem o trato respiratório e a coinfeção entre eles é possível,

como descrito por Hosseinnezhad e Rapose, (2012) e Gupta et al. (2015). Esses autores mostram uma evidência clínica da coinfeção envolvendo esses patógenos em humanos. Portanto, pelo fato de *C. gattii* ser um patógeno emergente que afeta aparentemente indivíduos saudáveis, e por apresentar um tropismo pulmonar, como o vírus influenza, nesse estudo foi avaliado o impacto da coinfeção entre esses potenciais patógenos em modelo murino. Nesse ponto de vista, o presente estudo é pioneiro em desenvolver um modelo experimental de coinfeção entre o vírus Influenza A e o fungo *C. gattii*.

Inicialmente, fez-se necessário determinar a melhor estratégia experimental para testes de coinfeção *in vivo* entre o vírus influenza A e *C. gattii*, para isso avaliou-se vários tempos de infecção do vírus em relação à levedura. Notavelmente, a infecção secundária de *C. gattii* ao vírus influenza A (3 DAI) provocou aumento na morbidade, e resultou em um quadro precocemente letal da criptococose (Figuras 9 e 12). Igualmente, quando aplicamos esse mesmo modelo de coinfeção (3 DAI) para outras linhagens de *Cryptococcus*, tais como, *C. gattii* R265 e *C. neoformans* H99 o perfil de coinfeção foi exatamente o mesmo, resultando na morte precoce dos camundongos (Figura 10).

Esse dado confirma a importância de se compreender a interação entre esses dois agentes infecciosos e condiz com as respostas clínicas encontradas na literatura, no qual infecções de bactérias secundárias à infecção por Influenza A, são mais graves e causam maior morbidade e mortalidade (Morens et al., 2008; Smith et al., 2013). Adicionalmente, já foi demonstrado em modelo murino que a coinfeção entre o vírus influenza e bactérias, são também precocemente letais (Kash et al., 2011; Jamieson et al., 2013; Tanaka et al., 2013).

Os resultados mostram que é necessária uma infecção viral bem estabelecida (3DAI) para causar uma dramática diferença na sobrevivência do hospedeiro. Pois, quando os camundongos foram infectados com o vírus influenza três, sete e 10 dias após a infecção com *C. gattii*, não houve diferença significativa na sobrevivência desses animais em relação à *C. gattii* sozinho. A infecção resolvida, ou com título viral em declínio, também não afetou a sobrevivência dos animais coinfectados, como nos casos do vírus inoculado 10 e sete dias antes da infecção por *C. gattii*, respectivamente (Figura 9). Especialmente porque o terceiro dia de infecção por influenza coincide com os altos níveis de vírus nos pulmões (Ayala et al., 2011; Pan et al., 2013; Barbosa et al., 2014).

A importância da multiplicação viral ativa na maior susceptibilidade dos animais à infecção por *C. gattii* foi demonstrada pelo tratamento com o antiviral Oseltamivir, que aumentou a sobrevivência dos camundongos coinfectados (Figura 11B); uma vez que o

mesmo perfil não foi observado durante o tratamento do grupo coinfecção com o antifúngico fluconazol (Figura 11C). Jamieson e colaboradores (2013), também demonstraram que o momento da infecção viral frente ao patógeno é primordial, pois apenas quando a infecção viral foi bem estabelecida, os camundongos coinfecção com doses subletais do vírus influenza A e da bactéria *Legionella pneumophila*, apresentaram 100% de letalidade, ao passo que todos os camundongos sobreviveram as infecções de cada patógeno isoladamente.

Nas análises de quantificação da carga fúngica, um resultado intrigante foi o aumento de UFCs no SNC durante a coinfecção (3 DAI), enquanto nos pulmões e nos demais órgãos a carga fúngica não foi estatisticamente diferente entre os grupos. A carga viral nos pulmões também não foi diferente estatisticamente (Figura 13). Esse aumento na disseminação de *C. gattii* para o SNC durante a coinfecção confirma a gravidade da coinfecção observada na curva de sobrevivência, perda de peso corporal e na análise do perfil funcional e comportamental, culminando no pior prognóstico observado (Figura 11B e 12A-F). E, por conseguinte, a análise comportamental realizada ao longo do experimento foi corroborada com os dados da curva de sobrevivência e UFC. Ainda, as alterações comportamentais do grupo infectado somente por *C. gattii* foi semelhante às descritas em camundongos infectados com a levedura (Santos et al., 2014), e em humanos com criptococose, descrito por Chen et al. (2012).

Muito embora, pode-se especular que a disseminação das leveduras para o SNC possa ocorrer devido ao neurotropismo do fungo, uma vez que altas concentrações de substratos no líquido são assimiláveis pelo fungo, como tiamina, ácido glutâmico, carboidratos e minerais (Severo et al., 1999; Franco-Paredes et al., 2015), além da presença abundante de catecolaminas, usadas para síntese de um importante fator de virulência, a melanina. Outra hipótese que justifica essa preferência pelo SNC é o fato dele servir como “refúgio” para o fungo contra a resposta imune do hospedeiro (Lin e Heitman, 2006; Franco-Paredes et al., 2015). Porém, o modo que o fungo alcança o SNC na presença do vírus, levando ao aumento da carga fúngica nesse sítio, ainda permanece inexplicado e mais estudos são imprescindíveis para seu esclarecimento.

A presença do vírus influenza A durante a coinfecção, de uma forma geral modifica a resposta inflamatória no hospedeiro, onde somente a infecção viral ou durante a coinfecção resultou em graves alterações pulmonares e intenso infiltrado inflamatório (Figura 14). De fato, o vírus influenza por si só é conhecido por prejudicar a função ciliar normal (Tavares et al., 2017). Em geral, a vulnerabilidade a infecções

bacterianas secundárias ao vírus influenza é associada com danos pulmonares, comprometimento da fagocitose e de mecanismos de defesa do hospedeiro (Smith et al., 2013; Cauley e Vella, 2015; Tavares et al., 2017). Na literatura, vários são os exemplos de mudanças na resposta inflamatória durante a coinfeção vírus-bactéria, inclusive de respostas imune exacerbada, que resulta em maior gravidade da doença e até letalidade (Kash et al., 2011; Jamieson et al., 2013; Tanaka et al., 2013).

Essa mudança na resposta imune pode ser a chave que elucide o motivo pelo qual a coinfeção é mais grave e letal. E, por isso, foi avaliado o estado imune do hospedeiro, infectado somente o vírus influenza, no momento em que seria inoculado o fungo (três dias de infecção por influenza). O achado, por análises de citometria de fluxo (Figura 17), foi um perfil celular imunológico pró-inflamatório, com altas proporções de macrófagos (predominância de macrófagos M1), bem como o aumento do influxo de neutrófilos e células NK, mas sem alteração na população de linfócitos totais, T CD4, T CD8 e linfócitos B para o local de infecção, comparado aos animais não infectados.

É sabido que as células NK são importantes para a resposta imune inata, pois diretamente reconhece, liga e causa a morte de *C. neoformans* (Li et al., 2013). Além do mais, a atividade anticriptocócica das células NK é dependente de IL-12 em células de pacientes com HIV (Kyei et al., 2016). Além disso, células NK são importantes produtoras de IFN- γ (Uemura et al., 2010). Junto a esse fato, os macrófagos M1 são conhecidos como macrófagos classicamente ativados, que apresentam um fenótipo pró-inflamatório e são considerados eficientes no combate a microorganismos devido a sua aumentada produção de ROS, esses geralmente são ativados por interferon do tipo 2 (IFN- γ) e, portanto, são muito importantes no combate a fungos, como *Cryptococcus* (Hardison et al., 2010; Davis et al., 2013; Davis et al., 2015).

Através da quantificação dos níveis de citocinas, também ficou evidente o aumento do perfil de citocinas pró-inflamatórias, correlacionadas com o recrutamento das populações celulares inflamatórias para o sítio da infecção. Particularmente, notam-se na presença do vírus, maiores níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e da quimiocina CXCL-1 e a diminuição dos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, mas nenhuma mudança nos níveis de TNF- α . Junto com esses dados, foi também observado o aumento da expressão de interferons do tipo 1 (IFN- α 4 e IFN- β) que reflete o estado antiviral, conhecido por proteger as células do hospedeiro contra a infecção viral (Randall and Goodbourn, 2008; Tavares et al., 2017).

Prévios estudos tem demonstrado que a infecção por influenza pode induzir a produção de interferon do tipo 1, porém suprime a atividade fagocítica de macrófagos e compromete a função ciliar normal dos pulmões, que leva a um aumento na susceptibilidade a diferentes patógenos, incluindo o fungo *Aspergillus* spp. (Crum-Cianflone, 2016) e infecções bacterianas secundárias (Shahangian et al., 2009; Kudva et al., 2011; Li et al., 2012).

Intrigantemente, após três dias de infecção, deve-se destacar o significativo decréscimo dos níveis de IFN- γ observado em camundongos infectados com influenza. Esses dados corroboram o estudo de Nguyen e colaboradores (2000), o qual demonstraram que interferons do tipo 1 (IFN- α/β) inibem a produção de IFN- γ por células NK e células T em um processo dependente da regulação de STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1). De acordo com esses dados, Arimori et al. (2013) verificaram que camundongos knockouts para o receptor de interferon do tipo 1 (IFNAR KO), infectados com influenza A PR8 produzem maiores quantidades de IFN- γ nos pulmões (Arimori et al., 2013). Além disso, Sato et al. (2015) mostraram o aumento da eliminação de *C. neoformans* em camundongos knockout para o receptor de IFN- α (IFNAR1KO), que exibiu maior produção de IFN- γ e IL-4. Esses autores também sugerem que interferons do tipo 1 podem estar envolvidos na regulação negativa da resposta imune inicial do hospedeiro contra a criptococose (Sato et al., 2015). Juntos esses dados suportam nossos resultados onde os níveis de IFN- γ é reduzido quando interferon do tipo 1 é aumentado.

A função do IFN- γ nas infecções fúngicas tem sido exaustivamente demonstrada e é considerada uma citocina chave na resposta anti-criptocócica do hospedeiro (Hardison et al., 2010; Davis et al., 2015). Estudos clássicos mostram que IFN- γ estimula a ação de macrófagos, culminando em maior fagocitose e morte do fungo (Flesch et al., 1989; Kawakami et al., 1995; Hardison et al., 2010; Davis et al., 2015). Da mesma forma, Panackal et al. (2015) em um estudo com criptococose em pacientes HIV-negativos, propuseram que a defectiva ativação de macrófagos é primordial para causar aumento da susceptibilidade dos pacientes ao fungo e uma maior predisposição da levedura para o SNC.

Esses dados respaldam nossos resultados do ensaio de fagocitose (Figura 18), no qual a coinfeção resultou na reduzida atividade fungicida de macrófagos, como a redução da habilidade de fagocitar *C. gattii*, menor produção de ROS e aumento da proliferação fúngica no interior de macrófagos, que é correlacionada com a gravidade

da criptococose observada *in vivo*. A diminuição da fagocitose por macrófagos alveolares encontrada na presença do vírus durante a coinfeção, também já foi relatada por Smith e colaboradores (2013), em suas análises durante a coinfeção letal entre o vírus influenza A e a bactéria *Streptococcus pneumoniae*. Dentre os achados, os autores constataram a inibição da fagocitose de *S. pneumoniae* induzida pelo vírus Influenza A (Smith et al., 2013).

Surpreendentemente, a estimulação prévia com IFN- γ não foi suficiente para controlar a taxa de proliferação intracelular do fungo durante a coinfeção com o vírus, independente do aumento da produção de espécies reativas (ROS, PRN e NO) pelas células fagocíticas (Figura 18C). Uetani e colaboradores (2008) demonstraram que o vírus influenza subverte a resposta mediada por IFN- γ através de efeitos nas vias de sinalização intracelular (Uetani et al., 2008).

A reduzida fagocitose durante a coinfeção pode também ser uma consequência da plasticidade morfológica de *C. gattii* (Figura 15), que tem a capacidade de aumentar seu tamanho, sua cápsula polissacarídica e neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Frasas et al., 2009; Kronstad et al., 2011; Chen et al., 2014; Urai et al., 2016). Já é bem descrita na literatura as propriedades da cápsula polissacarídica na infecção por *Cryptococcus*, sendo considerado o principal fator de virulência desse fungo, devido seu papel na inibição de fagocitose e morte por macrófagos, proteção aos tratamentos antifúngicos e ao estresse oxidativo, além de modular o sistema imune (Bovers, Hagen e Boekhout, 2008; Zaragoza et al., 2008; Urai et al., 2016).

Do mesmo modo, a maior frequência de células aumentadas durante a coinfeção (Figura 15D) pode estar relacionada ao aumento da virulência de *Cryptococcus* spp. por diminuir a fagocitose, levar a persistência do fungo no hospedeiro e potencializar a disseminação para o SNC (Okagaki et al., 2010; Zaragoza and Nielsen, 2013). Ainda, a cápsula se torna mais eletronegativa, o que pode inibir a interação entre *C. gattii* e macrófagos (Nosanchuk et al., 1999; Ferreira et al., 2015). Diversos estudos relatam que os polissacarídeos presentes na cápsula de *Cryptococcus* inibem a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos fagócitos (Kronstad et al., 2011; Chen, Meyer e Sorrell, 2014).

Adicionalmente, a IPR de *C. gattii* em PBMCs também foi maior no grupo coinfectado e os dados do modelo *in vitro* de BBB revelam que o vírus influenza, apesar de não alterar a integridade e permeabilidade da membrana, diminui o número de *C. gattii* recuperado da parte superior e aumenta na parte inferior da *transwell*, indicando

maior transmigração da BBB na presença do vírus, principalmente quando na presença de células CD4⁺, monócitos humanos clássicos (Figura 19, 20 e 21). Especula-se então que *C. gattii* usa o macrófago, uma vez que sua atividade fungicida é reduzida, para evadir da resposta imune do hospedeiro e alcançar o SNC, pelo bem estabelecido mecanismo de “Cavalo de Tróia” (Sorrell et al., 2016; Santiago-Tirado et al., 2017), resultando assim no pior prognóstico da criptococose.

Em resumo, podemos destacar que durante a coinfeção, o fungo sofre alterações em sua estrutura para driblar e vencer o sistema imune do hospedeiro. Nessa situação, a célula se torna mais eletronegativa, com maior tamanho da cápsula e do diâmetro celular, que por sua vez, dificulta a fagocitose. Além dos menores índices de fagocitose encontrados, a atividade efetiva dos macrófagos fica debilitada com menor produção de ROS, resultando em aumento da proliferação intracelular e maior evasão da levedura para o SNC. Todos esses eventos juntos auxiliam o fungo em sua sobrevivência no hospedeiro e aumentam sua virulência, que aliado à resposta inflamatória alterada e aos danos pulmonares devido à infecção viral gera quadros clínicos mais graves, com comprometimento neurológico, funcional e comportamental, culminando na letalidade abrupta e precoce do hospedeiro. Contudo, estudos adicionais devem ser realizados para melhor explicar os mecanismos e efeitos dessa interação, durante a coinfeção entre o fungo *C. gattii* e o vírus Influenza A.

Portanto, nós sugerimos que (i) a injúria pulmonar associada com a (ii) diminuição da capacidade fagocítica e (iii) com o aumento da resposta inflamatória observadas nos pulmões dos camundongos; pode potencializar a disseminação de *C. gattii* para o SNC, levando ao pior prognóstico da doença, assim como previamente demonstrado em casos de coinfeções vírus-bactéria (Pittet et al., 2010; Kash et al., 2011; Liu et al., 2013; Wolf et al., 2014). Sendo assim, o vírus influenza A deve ser considerado um fator predisponente para a criptococose.

7 CONCLUSÕES

Como conclusões podemos destacar que a infecção secundária de *C. gattii* ao vírus influenza A provocou maior morbidade e letalidade precoce da criptococose, com aumento da carga fúngica no SNC dos camundongos, mas não nos pulmões. Durante a coinfeção são observados danos histopatológicos no tecido pulmonar e também alterações na morfometria das células de *C. gattii*; a célula se torna mais eletronegativa e com maior cápsula e diâmetro celular. A presença do vírus influenza leva ainda ao comprometimento da fagocitose, resultando em maior número de fungos viáveis recuperados no interior de fagócitos. Além disso, é evidente que o vírus influenza A, em seu pico de infecção (três dias de infecção), modifica a resposta inflamatória do hospedeiro, com aumento de neutrófilos e macrófagos no local da infecção, indução da produção de IFN- α 4/ β , mas diminuição dos níveis de IFN- γ , o que provavelmente desencadeia maior gravidade na criptococose, causada por *C. gattii* em modelo murino. Esses dados juntos indicam que a alteração da virulência de *C. gattii* e do perfil inflamatório durante a infecção simultânea com o vírus influenza A é essencial para aumento da morbidade, resultando na menor sobrevivência dos camundongos.

Este estudo é pioneiro em demonstrar um modelo experimental *in vivo* de coinfeção entre o vírus Influenza A e o fungo *C. gattii*. Além disso, fornecemos conhecimento sem precedente e primordial para compreensão dos mecanismos envolvidos na interação entre esses agentes infecciosos e o hospedeiro durante coinfeções. Todas essas alterações sucedidas à coinfeção auxiliam o fungo em sua sobrevivência no hospedeiro e aumentam sua virulência durante a coinfeção, agravando o quadro da doença e culminando na letalidade precoce de camundongos coinfectados. Dessa forma, concluímos que o vírus influenza A pode ser considerado um fator predisponente para a criptococose.

As conclusões obtidas nesse trabalho estão delineadas no esquema de coinfeção entre o vírus Influenza A e o fungo *C. gattii* representado na figura 22.

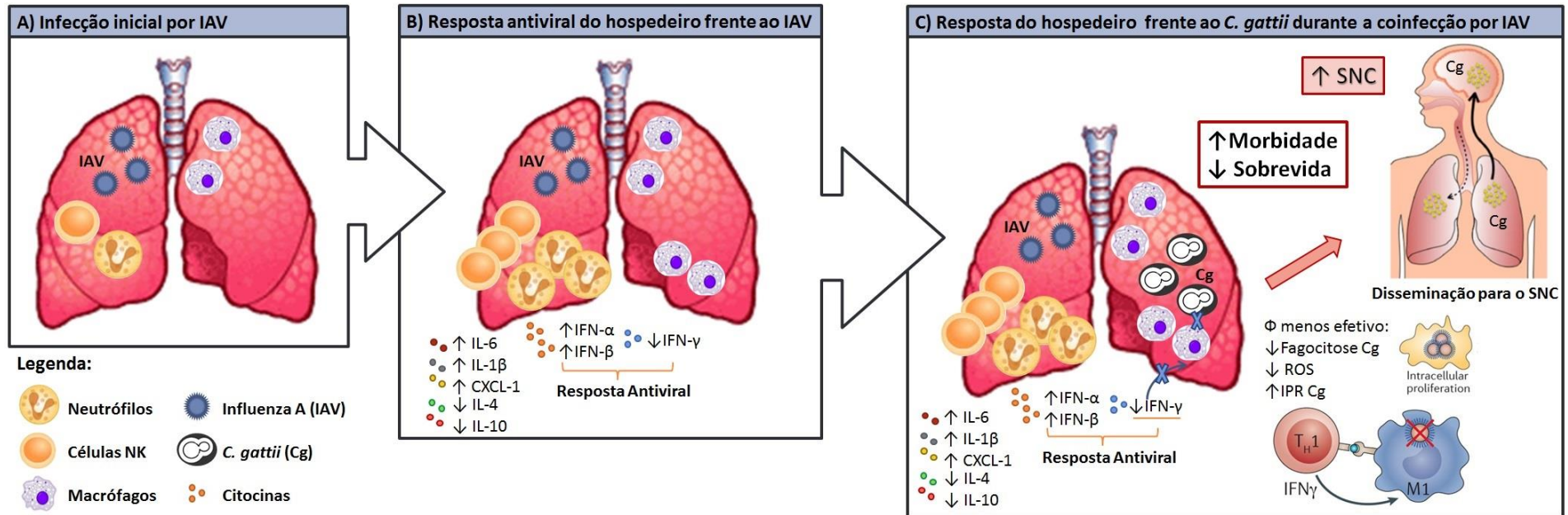


Figura 22: Esquema representando a resposta imune do hospedeiro durante a coinfeção pelo vírus Influenza A (IAV) e *C. gattii* (Cg). **A)** Infecção inicial de camundongos pelo IAV, no qual o vírus alcança os pulmões (figura representativa de pulmões de camundongos) e encontra células imunes *naives*. **B)** Após três dias de infecção, a resposta imune do hospedeiro frente ao Influenza é caracterizada pelo recrutamento de células imunes para o local de infecção, por exemplo, macrófagos, neutrófilos e células NK. Além disso, a presença do vírus resulta em uma resposta antiviral do hospedeiro com maiores níveis de citocinas IL-1 β , IL-6, CXCL-1 e interferons do tipo I, tais como IFN- α e IFN- β e diminuição de IL-4, IL-10 e IFN- γ , comparado a animais não infectados. **C)** Após três dias de infecção por IAV, os animais são coinfectados pelo fungo *C. gattii*, no qual essa levedura encontra um microambiente que apresenta uma resposta antiviral já montada contra o vírus Influenza. Como foram observados menores níveis de IFN- γ , e uma vez que essa citocina desempenha importante função na resposta imune no combate à infecção por *Cryptococcus*, principalmente na ativação da capacidade fungicida de macrófagos alveolares foi, portanto, investigada a atividade fagocítica e fungicida de fagócitos. Durante a coinfeção, a atividade dos macrófagos fica prejudicada, a presença do vírus resulta na diminuição da fagocitose da levedura, menor produção de ROS e menor atividade fungicida, resultando em aumento da proliferação intracelular (IPR) do fungo no interior de fagócitos. Quatro dias depois da infecção por Cg os animais foram eutanasiados e a histopatologia, carga fúngica e a morfometria da levedura foram analisadas; a curva de sobrevivência e morbidade dos camundongos foi também determinada. A infecção concomitante de IAV e Cg resultaram no aumento da carga fúngica no SNC, mas não nos pulmões, porém são observadas lesões histopatológicas pulmonares. Ainda, a levedura apresenta modificações em sua estrutura durante a coinfeção, com maior tamanho celular e capsular, e se torna mais eletronegativa. O aumento da IPR e as lesões histopatológicas podem estar ligados a maior carga fúngica encontrada no SNC. Além disso, a presença do IAV aumenta a morbidade e mortalidade de animais infectados com Cg, possivelmente relacionado ao aumento da disseminação fúngica para o SNC. Portanto, a infecção por IAV deve ser considerada um fator predisponente para a criptococose.

8 PERSPECTIVAS

- Análise da transmigração de *Cryptococcus* ssp. para o SNC durante a coinfeção, através de modelo celular *in vitro* de barreira hematoencefálica (BBB), bem como avaliar fatores do hospedeiro ativados pelo vírus como, por exemplo, a indução de citocinas, na transmigração de *Cryptococcus* ssp. para o SNC usando o modelo de BBB. **Em desenvolvimento.**

- Verificar o efeito da transmigração na manutenção da integridade e permeabilidade da membrana da BBB frente ao *Cryptococcus* ssp.; ao vírus Influenza A e à coinfeção entre eles. **Em desenvolvimento.**

- Determinar a influência de macrófagos ativados ou não pelo vírus influenza A na transmigração de *Cryptococcus* ssp. para o SNC, verificando o mecanismo de cavalo de Tróia para transmigração da BBB. **Em desenvolvimento.**

- Análise das interações vírus-*Cryptococcus* com o hospedeiro em modelos celulares do trato respiratório, para verificar a severidade da criptococose na presença do vírus e para melhor compreender como o vírus modifica a resposta imune que predispõe a criptococose.

9 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. **OLIVEIRA, L.V.N.**; COSTA, M. C.; MAGALHAES, T. F. F.; SANTOS, P. C.; BASTOS, R. W.; CARNEIRO, H.C.S.; RIBEIRO, N.Q.; FERREIRA, G. F.; RIBEIRO, L. S.; GONÇALVES, A.P.; FAGUNDES, C.T.; PASCOAL-XAVIER, M.A.; DJORDJEVIC, J.T.; SORRELL, T.C.; SOUZA, D.G.; MACHADO, A.M.V.; SANTOS, D. A.. Influenza A virus as a predisposing factor for cryptococcosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, In Press, 2017. doi: 10.3389/fcimb.2017.00419.**

2. **OLIVEIRA, L. V. N.**; BASTOS, R. W.; RIBEIRO, N. Q.; COSTA, M. C.; ACURCIO, L. B.; ROCHA, K. M.; SANTOS, J. R. A.; CRUZ, R. C.; SOARES, B. M.; SANTOS, D. A.. In vivo probiotic and antimicrobial photodynamic therapy as alternative therapies against cryptococcosis are ineffective. **Veterinary Microbiology, In Press, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.015>.**



Influenza A Virus as a Predisposing Factor for Cryptococcosis

Lorena V. N. Oliveira¹, Marliete C. Costa¹, Thaís F. F. Magalhães¹, Rafael W. Bastos¹, Patrícia C. Santos², Hellem C. S. Carneiro¹, Noelly Q. Ribeiro¹, Gabriella F. Ferreira³, Lucas S. Ribeiro², Ana P. F. Gonçalves⁴, Caio T. Fagundes^{2,5}, Marcelo A. Pascoal-Xavier⁴, Julianne T. Djordjevic⁶, Tania C. Sorrell⁶, Daniele G. Souza², Alexandre M. V. Machado⁴ and Daniel A. Santos^{1*}

¹ Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Laboratório de Interação Micro-organismo Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora–Campus Governador Valadares, Centro, Governador Valadares, Brazil, ⁴ Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR)/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Minas), Belo Horizonte, Brazil, ⁵ Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biológicas, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁶ Marie Bashir Institute for Infectious Diseases and Biosecurity, University of Sydney and Westmead Institute for Medical Research, Westmead, NSW, Australia

OPEN ACCESS

Edited by:

Brian Wickes,
University of Texas Health Science
Center San Antonio, United States

Reviewed by:

Karen L. Wozniak,
Oklahoma State University,
United States
Jatin Mahesh Vyas,
Massachusetts General Hospital,
United States

*Correspondence:

Daniel A. Santos
dasufmg@gmail.com;
das@ufmg.br

Received: 29 May 2017

Accepted: 11 September 2017

Published: 26 September 2017

Citation:

Oliveira LVN, Costa MC, Magalhães TFF, Bastos RW, Santos PC, Carneiro HCS, Ribeiro NQ, Ferreira GF, Ribeiro LS, Gonçalves APF, Fagundes CT, Pascoal-Xavier MA, Djordjevic JT, Sorrell TC, Souza DG, Machado AMV and Santos DA (2017) Influenza A Virus as a Predisposing Factor for Cryptococcosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:419. doi: 10.3389/fcimb.2017.00419

Influenza A virus (IAV) infects millions of people annually and predisposes to secondary bacterial infections. Inhalation of fungi within the *Cryptococcus* complex causes pulmonary disease with secondary meningo-encephalitis. Underlying pulmonary disease is a strong risk factor for development of *C. gattii* cryptococcosis though the effect of concurrent infection with IAV has not been studied. We developed an *in vivo* model of Influenza A H1N1 and *C. gattii* co-infection. Co-infection resulted in a major increase in morbidity and mortality, with severe lung damage and a high brain fungal burden when mice were infected in the acute phase of influenza multiplication. Furthermore, IAV alters the host response to *C. gattii*, leading to recruitment of significantly more neutrophils and macrophages into the lungs. Moreover, IAV induced the production of type 1 interferons (IFN- α 4/ β) and the levels of IFN- γ were significantly reduced, which can be associated with impairment of the immune response to *Cryptococcus* during co-infection. Phagocytosis, killing of cryptococci and production of reactive oxygen species (ROS) by IAV-infected macrophages were reduced, independent of previous IFN- γ stimulation, leading to increased proliferation of the fungus within macrophages. In conclusion, IAV infection is a predisposing factor for severe disease and adverse outcomes in mice co-infected with *C. gattii*.

Keywords: Cryptococcosis, *Cryptococcus gattii*, influenza A H1N1, co-infection, risk factor

INTRODUCTION

Influenza A virus (IAV) is a negative stranded RNA virus, which belongs to the *Orthomyxoviridae* family. Seasonal influenza causes 3–5 million cases of severe illness and about 500,000 deaths annually (Krammer and Palese, 2015). It is well-recognized that severe influenza infections predispose to secondary bacterial pneumonia, e.g., caused by *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. (Peltola and McCullers, 2004; Tanaka et al., 2013; Duvinneau et al., 2016). In addition,

co-infection with IAV is well-described for the fungus *Aspergillus* spp. (Kwon et al., 2013; Alshabani et al., 2015; Crum-Cianflone, 2016; Nulens et al., 2017); however there are few studies of co-infection with other important respiratory fungal pathogens, e.g., *Cryptococcus* spp. The consequences of the co-infection with IAV-cryptococci are poorly studied, being only available in two case reports describing the secondary cryptococcal meningitis during the 2009-pandemic influenza A H1N1 (Hosseinnezhad and Rapose, 2012; Gupta et al., 2015).

Cryptococcosis is an emerging fungal disease caused by *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* that initially affects lungs, followed by dissemination to the central nervous system (CNS), causing severe meningoencephalitis (Chen et al., 2012, 2014; May et al., 2016). *C. neoformans* affects mainly immunocompromised patients and *C. gattii*, immunocompetent individuals (Kronstad et al., 2011; Bielska and May, 2016). It is estimated 1 million people per year develop cryptococcosis, with about 650,000 deaths (Park et al., 2009; Almeida et al., 2015).

Based on case-control studies in hospitalized patients, the main predisposing factors for *C. gattii* and *C. neoformans* infections are HIV, organ transplantation, decompensated hepatic cirrhosis, cell-mediated immune suppression, autoimmune diseases, pneumonia, other pulmonary disorders, and invasive cancer (Lin et al., 2015). Such studies excluded patients with self-limiting infectious diseases such as viral and easily treated bacterial infections (MacDougall et al., 2011; Pappas, 2013). Notably, according to Pappas (2013), 17–22% of non-HIV and non-transplant patients are considered healthy hosts. These patients manifest more severe complications and permanent neurological sequelae than those with underlying immunocompromise (Pappas, 2013).

Influenza occurs worldwide and *C. gattii* is an emergent and potentially epidemic respiratory fungus, which can cause chronic and severe disease. Moreover, the clinical evidence of co-infection for these pathogens has been reported in humans (Hosseinnezhad and Rapose, 2012; Gupta et al., 2015). In this context, Hosseinnezhad and Rapose (2012) suggested that prolonged influenza A (H1N1) virus infection causes immunologic defects and acute respiratory distress syndrome, which may represent a further emerging risk factor for the development of cryptococcosis in previously healthy individuals. For this reason, we propose that co-infection with influenza and *C. gattii* worsens disease severity and outcomes and here report our investigation of this hypothesis using a murine model.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and Micro-organisms

Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ in complete Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM; SIGMA). Virus stocks of the mouse-adapted influenza A/PR8/34 (H1N1) virus were prepared and titrated on MDCK cells as previously described (Barbosa et al., 2014). *C. gattii* (Cg) VGII, strain L27/01 (UFMG-CM-Y6141) was cultured on Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) by 48 h at 37°C (Santos et al., 2014). Other *Cryptococcus* strains, such as, *C. gattii*

R265 (VGII) and *C. neoformans* H99 (VNI) were also used for mice survival analysis.

Mice and Ethics Statement

Female C57BL/6 mice (6–8 weeks old) were obtained from the animal facilities of the Universidade Federal de Minas Gerais. All experimental procedures were carried out according to the standards of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science/Brazilian College for Animal Experimentation (available at www.sbcal.org.br) and Brazilian Federal Law 11,794. The animal studies were approved by the Ethical Commission on Animals Use of the Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG, protocol n° 354/2015).

Infection and Co-infection Experiments

Six female C57BL/6 mice per group were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). They were then inoculated intranasally (i.n.) with 20 µL of 1×10^3 plaque-forming units (PFU)/animal of IAV diluted in PBS (0.1 LD₅₀) or mock infected with PBS (Barbosa et al., 2014) and/or inoculated intratracheally (i.t.) with 30 µL of 1×10^4 colony-forming units (CFU)/animal of Cg or PBS (controls) (Ferreira et al., 2015). We evaluated two sequential co-infection protocols: (i) inoculation of IAV 10, 7, or 3 days before infection (d.b.i.) with Cg; (ii) Infection with IAV, 3, 7, or 10 days after infection (d.p.i.) with Cg. Behavior, weight and survival of infected animals were monitored daily (**Figure 1A**). After this step, we selected the inoculation of IAV 3 d.b.i. with Cg (IAV+Cg) for all the next analysis.

In another set of experiments, mice ($n = 6$ animals per group) infected with IAV alone or IAV+Cg were treated daily with oral Oseltamivir, 31 mg/kg/day (Oselt, Tamiflu[®], Roche). Alternatively, mice infected with Cg alone or IAV+Cg were treated daily with intraperitoneal fluconazole, 10 mg/kg/day (FLZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Additional co-infected animals were treated with both FLZ and Oselt. Treatment with Oselt was started at the time of infection with IAV, whereas treatment with FLZ was started at the time of infection with Cg. In summary, experimental groups included: Not-treated (NT) Cg, IAV, and IAV+Cg; IAV treated with Oselt, Cg treated with FLZ, IAV+Cg treated with Oselt, IAV+Cg treated with FLZ, and IAV+Cg treated with Oselt+FLZ (**Figure 1A**). All the experiments were performed at least twice to confirm the data and the results were always reproducible.

Behavioral Analysis

Mouse behavior and function was assessed longitudinally in the groups: non-infected (NI), Cg, IAV and IAV+Cg (3 d.b.i.) using the SHIRPA protocol (**Figure 1A**) for neurological diseases (Santos et al., 2014). These tests provide reliable information on murine cerebral dysfunction and their general status. Individual parameters evaluated were grouped into five functional categories: neuropsychiatric state, motor behavior, autonomic function, muscle tone and strength, and reflex and sensory function. Individual parameters were summed up to determine a total score for each category (Santos et al., 2014).

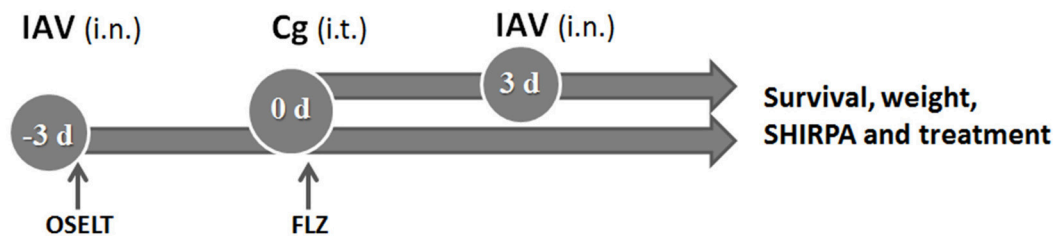
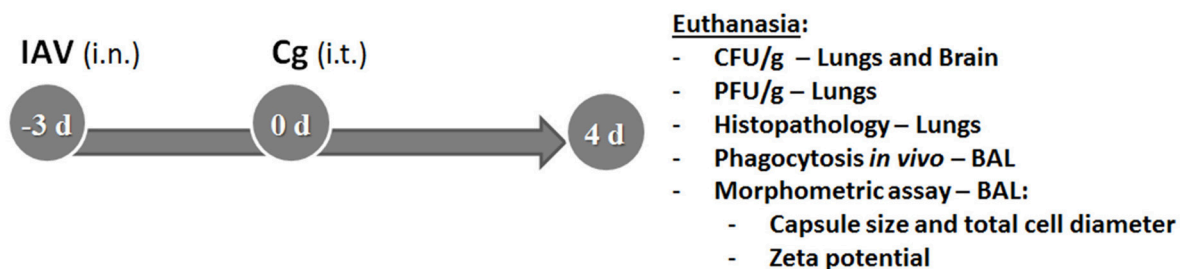
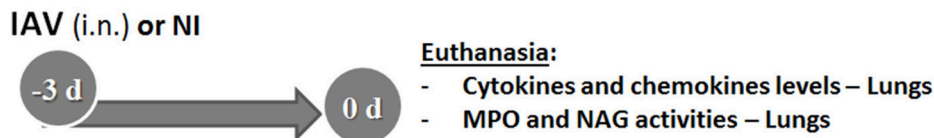
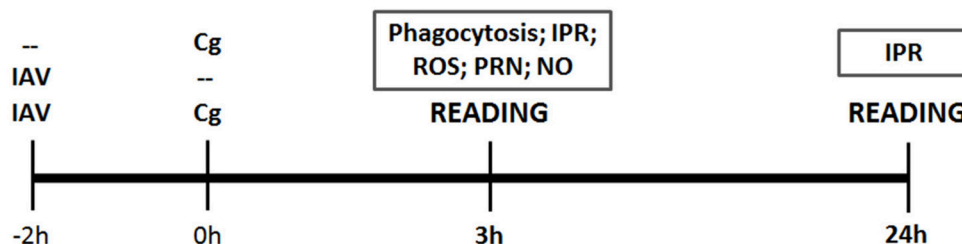
A Survival and behavior assessment:**B Disease profile:****C Immunological profile:****D In vitro analysis (BMDMs):**

FIGURE 1 | Study design. The first aim was to determine the survival and behavior alterations (using the SHIRPA protocol) in mice co-infected with influenza A virus (IAV) and *C. gattii* (A). The top arrow indicates group of mice (C57BL/6) infected with 1×10^4 CFU of *C. gattii* (Cg) intratracheally (i.t.) at day 0 (0 d), followed by intranasally (i.n.) infection with 1×10^3 PFU of influenza A virus (IAV) after 3 days of Cg infection. The bottom arrow indicates the group infected i.n. with 1×10^3 PFU of IAV 3 days before infection (–3 d: –3 d.b.i.) with 1×10^4 CFU of Cg i.t. (day 0). The control groups were mice infected only with Cg, only with IAV and non-infected. The survival, weight and behavior alterations of these animals were monitored daily. After that, the co-infected group of IAV 3 d.b.i. and Cg was chosen for the next experiments. The same strategy of co-infection was used to determine the survival during the treatment of mice with the antiviral Oseltamivir, 31 mg/kg/day (OSELT) or antifungal fluconazole, 10 mg/kg/day (FLZ); each drug was administered intraperitoneally daily and started at the day of infection with IAV (OSELT) or Cg (FLZ). The second aim was to evaluate the disease profile (B). Mice were co-infected with IAV 3 d.b.i. and with Cg (IAV+Cg) or infected only by Cg; IAV or non-infected (NI). Four days post-infection (4 d) with Cg (equivalent to 7 days infection with IAV), these animals were ethically euthanized to assess fungal (CFU/g) and viral burden (PFU/g) in the organs (lungs and brain) and histopathological analysis; also the bronchoalveolar lavage fluid (BAL) was aspirated to determine *in vivo* phagocytosis rate and the morphometric analysis of colonies recovered from BAL. Further, our aim was to verify the role of influenza in immunological profile of mice at the time of Cg infection (C). Mice were infected only with IAV (1×10^3 PFU) or NI and were ethically euthanized after 3 days, then cytokines and chemokine levels were measured in the lungs. Also, the myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosamidase (NAG) activities were quantified as an indirect measurement of neutrophil and macrophage accumulation in lungs, respectively. Lastly, the *in vitro* analysis using bone marrow derived macrophages (BMDM) (D) was performed to assess the influence of IAV infection on Cg phagocytosis and intracellular proliferation rate (IPR), as well as measuring the production of reactive oxygen species (ROS), peroxynitrite (PRN), and nitric oxide (NO). BMDM were infected with IAV 2 h before Cg infection and the reading was performed after 3 or 24 h of BMDM Cg infection. Control groups were BMDM infected with only IAV or only Cg. All the experiments were performed at least twice to confirm the data and the results were always reproducible.

Fungal and Viral Burden and Measurements of Capsule Size and Zeta Potential of *C. gattii*

After analysis of the survival curve, additional mice ($n = 6$ animals per group) were infected with Cg, IAV, or IAV+Cg or NI. The animals were anesthetized and euthanized by cervical dislocation 4 days post-infection with Cg (equivalent to 7 days infection by IAV). Lungs and brain were collected, homogenized in sterile PBS, plated onto SDA and incubated for 48 h at 37°C to determine the fungal burden, expressed as CFU per gram of tissue or milliliter of fluid (Costa et al., 2016). Likewise, viral loads in lung homogenates were assessed by titration in standard plaque assays on MDCK cells (Garcia et al., 2013). The viral titer was expressed as PFU per gram of tissue (Figure 1B).

In addition, bronchoalveolar lavage fluid (BAL) was aspirated as previously described (Santos et al., 2013). Fungal colonies recovered onto SDA after 48 h at 37°C from the BAL of Cg and IAV+Cg mice were further used for morphometric analyzes and Zeta potential (ζ) measurements (Figure 1B) as described previously (Nosanchuk et al., 1999; Ferreira et al., 2015). Briefly, Cg cells were visualized after suspension in Indian ink with an optical microscope (Axioplan; Carl Zeiss); subsequently the capsule size and total cell diameter size (diameter plus capsule) of at least 100 cells was measured in ImageJ 1.40g software (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD). Capsule size was expressed in μm and the total cell diameter size was expressed as a frequency (%) of enlarged cells ($>10 \mu\text{m}$) compared to the size of typical cryptococcal cell (5–10 μm), according to Okagaki et al. (2010). The Zeta potentials of the yeast cells were calculated using a Zeta potential analyzer (Zetasizer NanoZS90; Malvern, United Kingdom).

Histopathological Analysis

Brain and lungs were collected ($n = 6$ animals per group), processed and stained with hematoxylin-eosin (HE) (Figure 1B). Then, the samples were blinded examined under light microscopy at 200x magnification. Each of the following parameters were graded as 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate), 3 (intense), and 4 (severe): lung tissue damage; degeneration of the airways (bronchioles); congestion and edema of the alveolar septa; alveolar edema; bronchiolar inflammatory infiltrate; and alveolar septa inflammatory infiltrate. Results were expressed and summarized as the average of the combined scores for the distinct parameters evaluated.

Lung Myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) Activities and Cytokine and Chemokine Levels

For the better understanding of the increased susceptibility caused by IAV 3 d.b.i., six mice per group were infected with IAV or mock infected (NI), and were euthanized 3 days after infection (Figure 1C). MPO and NAG assays were performed on lung pieces (100 mg) (Costa et al., 2016), providing an indirect measurement of neutrophil and macrophage accumulation in lungs, respectively. The concentrations of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , and CXCL1 were measured by

ELISA using commercially available antibodies from DuoSet Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. Fragments of lung tissue (100 mg) were homogenized with 1 ml of extraction buffer, prepared with phosphate buffered saline—PBS (pH 7.4) containing anti-proteases (0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KI aprotinin A, all purchased from Sigma-Aldrich) and 0.05% Tween 20. The expression of IFN- α 4 and IFN- β genes was measured in lung tissue by qRT-PCR, using primers specific for murine samples (Costa et al., 2014). The primers used were: mIFN α 4, 5'-CCA CAG CCC AGA GAG TGA CCA GC-3' (forward) and 5'-AGG CCC TCT TGT TCC CGA GGT TA-3' (reverse); mIFN β , 5'-GAA AGG ACG AAC ATT CGG AAA T-3' (forward) and 5'-CGT CAT CTC CAT AGG GAT CTT GA-3' (reverse); and 18S ribosomal RNA, 5'-CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG-3' (forward) and 5'-CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC-3' (reverse).

Phagocytosis, Intracellular Proliferation, ROS, Peroxynitrite, and Nitric Oxide Production by Macrophages

Initially, phagocytosis was studied *in vivo* during co-infection by counting yeast cells internalized by phagocyte cells in BAL (Figure 1B). The phagocytic index was determined as the number of internalized yeast cells per 100 mononuclear cells and results were expressed as a percentage. Further, bone marrow-derived macrophages (BMDM) were isolated as described previously (Ribeiro et al., 2017). Briefly, bone marrow cells recovered from mice femurs and tibias were counted using a hemocytometer and the concentration adjusted to 2×10^6 cells/mL for incubation in BMM medium (RPMI supplemented with 30% L929 growth conditioning media, 20% bovine fetal serum [Gibco], 2 mM glutamine [Sigma-Aldrich], 25 mM HEPES pH 7.2, 100 units/mL of penicillin-streptomycin [Life Technologies]). Fresh media were added every 48 h. BMDMs were collected on day 7 and used for subsequent experiments. Then, 2×10^5 BMDM/mL were plated into 24-well plates for determining phagocytosis and Intracellular Proliferation Rate (IPR) and 96-well plates for detection of Reactive Oxygen Species (ROS) and peroxynitrite (PRN), and incubated overnight in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C under 5% CO₂ (Figure 1D).

To this aim, cells were inoculated with IAV (M.O.I. = 1) 2 h before (IAV+Cg) infection with Cg (5 cells:1 yeast) or with Cg or IAV alone (Figure 1D). The phagocytic index post 3 h inoculation with Cg was determined as described above. For the IPR assay, cell culture supernatants were removed and non-internalized and adherent yeast cells were removed by two washes with PBS. BMDMs then were lysed with 200 μL of sterile distilled water for 30 min at 37°C, and 50 μL of this suspension were plated on SDA for CFU determination. The IPR was calculated as the quotient of the CFU/mL at 24 and 3 h post Cg inoculation (Ma et al., 2009; Ribeiro et al., 2017).

The above experiments were also performed using RPMI-1640 without phenol red (Sigma-Aldrich), followed by

incubation with 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA; Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) or dihydrorhodamine-123 (DHR-123; Invitrogen) for ROS and PRN measurements, respectively. Fluorescence was assessed 3 h post-inoculation of Cg using a fluorometer (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader; Biotek) with excitation and emission wavelengths of 485/530 nm. The data are expressed as arbitrary units of fluorescence (Ferreira et al., 2013). The supernatant from the phagocytosis assay was used to quantify nitric oxide (NO) production using the Griess assay. The nitrite concentration was determined by extrapolation from a sodium nitrite standard curve, read at 540 nm with a microplate reader. For all these tests, we also have groups pre-incubated overnight with IFN- γ (50 U/mL).

Statistical Analyses

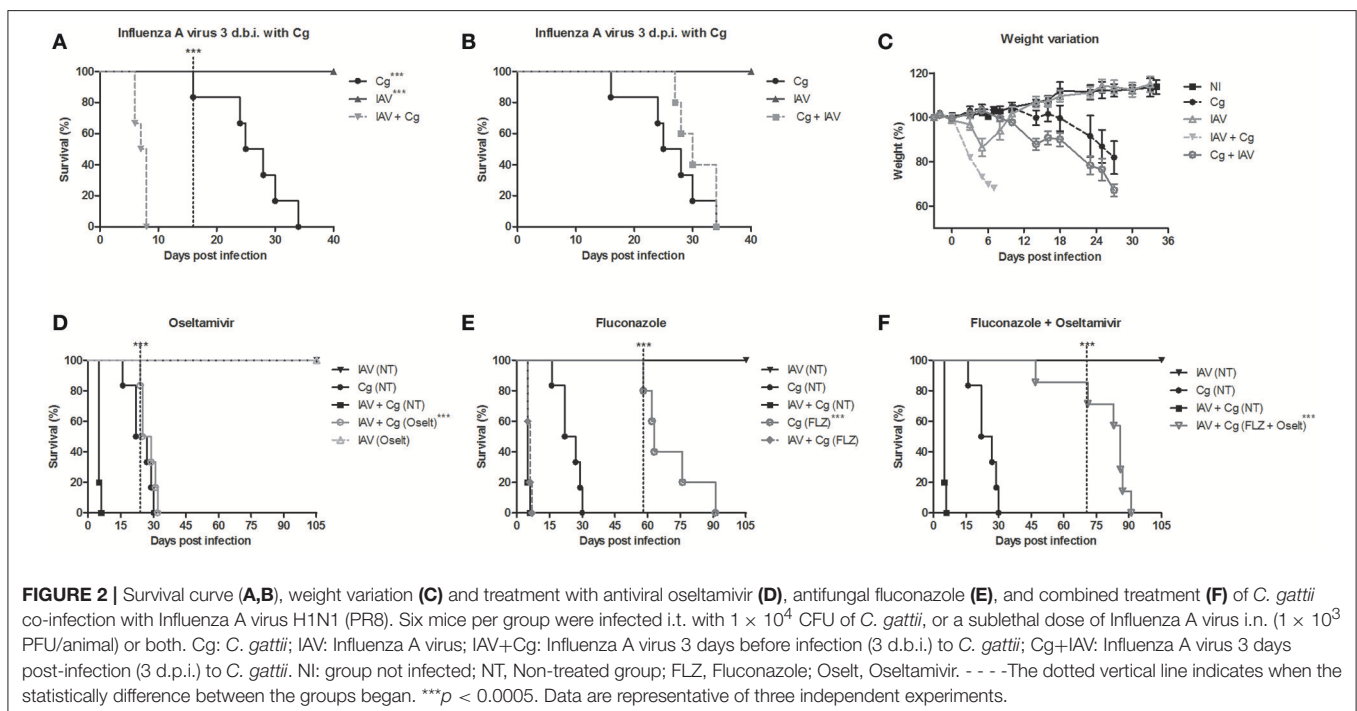
All statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 5.00, for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) with $p < 0.05$ considered to be significant. Kaplan-Meier survival curves were generated and analyzed using the log rank test. SHIRPA data were analyzed using the area under the curve, followed by analysis of variance (ANOVA) and a Tukey test. The histopathology analysis, phagocytosis and IPR assay, ROS, PRN, and NO measurements were analyzed by ANOVA followed by Tukey test to compare different groups. The results of CFU/g, PFU/g, capsule size, zeta potential, MPO and NAG activities, cytokines and chemokines levels were analyzed by the non-parametric Friedman test, used to compare two groups. All the tests were performed at least twice and the results were always reproducible.

RESULTS

Co-infection with IAV and *C. gattii* Leads to Increased Morbidity and Reduces Survival Rates in Mice

Initially we demonstrate that a sublethal dose of influenza virus alters the survival of mice infected with *C. gattii*. Survival studies reveal that infection with Cg alone causes 100% mortality by 35 days of infection (Figures 2A,B). Mice inoculated with IAV alone, lost substantial weight up to day 6 (Figure 2C), but survived the infection (Figure 2A). Notably, infection with IAV 3 days before Cg resulted in faster and higher weight lost and reduced survival of infected mice (death within 8 days) ($p < 0.05$) compared with mice infected with Cg (Figures 2A,C). Identical results were obtained using *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99 strains (Supplementary Figure 1). In contrast, when we compare Figures 2A,B, we observed that mice infected with IAV 3 days after Cg did not present difference in survival compared to animals infected only by Cg (Figure 2B); otherwise mice infected with IAV 3 days before Cg has a marked increase in the rate of mortality. In the same way, there was no difference in survival of mice infected with IAV 10 or 7 days prior to inoculation with Cg (Supplementary Figure 2). Similarly, there was no difference in survival of mice when IAV was inoculated 7 or 10 days after Cg (Supplementary Figure 2).

Our previous study showed that the IAV load in lungs peaked at about the fourth day after infection and that IAV was cleared by day 10 (Barbosa et al., 2014). Therefore, our data strongly suggested a link between high viral replication and increased susceptibility to Cg during acute influenza infections. To test this hypothesis, we treated mice daily with oseltamivir and/or fluconazole. Remarkably, we verified that treatment



with oseltamivir delayed the mortality in co-infected mice (Figure 2D). While treatment with the antifungal fluconazole improved survival of mice infected with Cg, it did not improve survival in co-infected mice (Figure 2E). However, combined treatment (Oselt+FLZ) significantly improved survival in co-infected mice (Figure 2F).

Application of the SHIRPA protocol showed that infection with IAV resulted in undetectable cerebral impairment while infection with Cg did cause cerebral dysfunction. Moreover, morbidity in co-infected mice was increased compared with all other groups, showing a severe decline ($p < 0.0005$) in each of the five functional categories evaluated (Figures 3A–E).

Co-infection (IAV+Cg) Increases Fungal Burden in Brain and Causes Severe Histopathological Changes in Lungs

To evaluate the disease caused by Influenza-*Cryptococcus* co-infection, mice were infected with IAV 3 days before infection by Cg (IAV+Cg) or infected only by Cg; IAV or non-infected (NI). Four days (7 days of protocol) post-infection with Cg, these animals were ethically euthanized for disease profile investigation. We found no significant differences ($p > 0.05$) in the viral (Figure 4A) and fungal burdens (Figure 4B) in lungs of mice infected with IAV or Cg alone, respectively, compared with co-infected mice. However, fungal loads in the brain were significantly higher in co-infected mice than in mice infected with Cg alone (Figure 4D). In addition, histopathological scores were higher in lungs of mice infected with IAV or co-infected when compared with those infected with Cg alone (Figure 4C). Histopathological findings in the groups infected with IAV alone or co-infected showed that the virus directly damages the lung

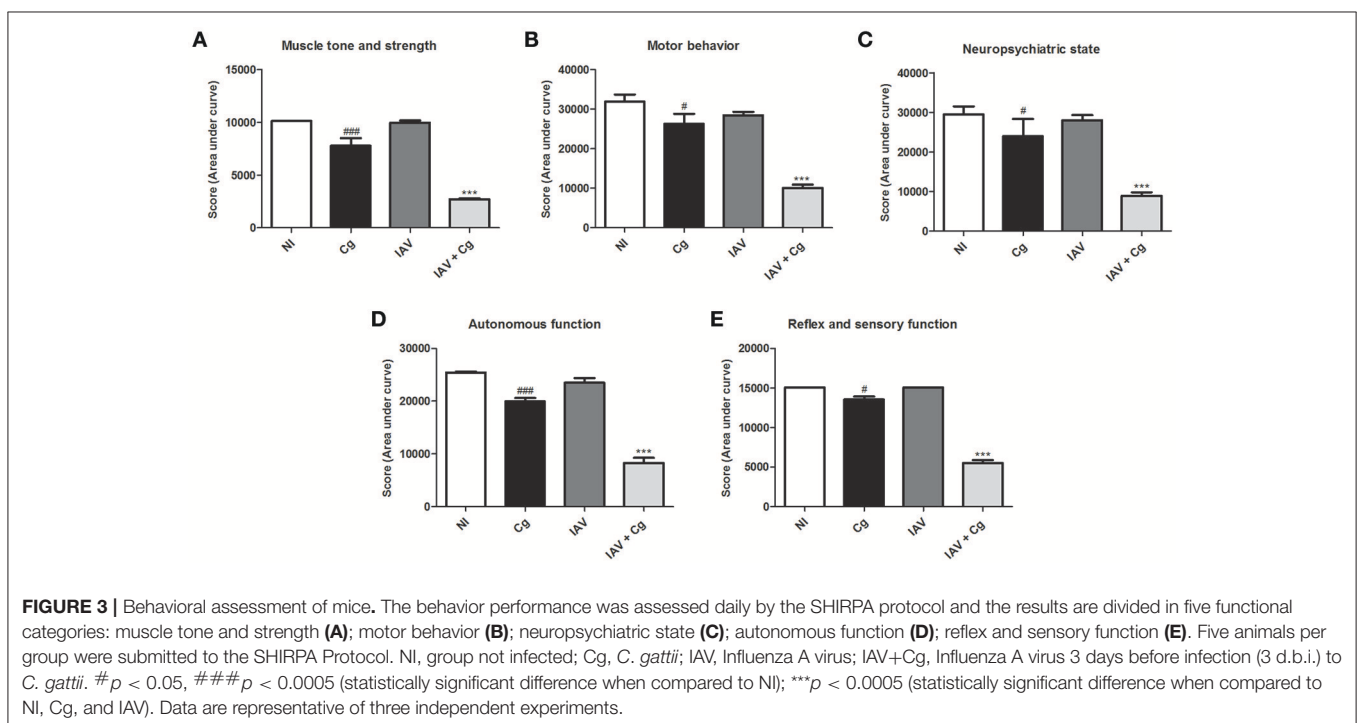
structure, including the mild airway degeneration, congestion and edema of the alveolar septa and increased bronchial and septal inflammation (Figure 4E). The presence of the fungus is evidenced by arrow in the Cg group (amplified box, Figure 4E).

Co-infection Increased Capsule Thickness and Electronegativity of the Fungal Cell Surface

Considering the higher transmigration of Cg to CNS, we verified if this fact could be associated with the fungal adaptation (morphological modifications of Cg during co-infection) to the host in the presence of virus. For this, colonies recovered from BAL of mice co-infected or infected only by Cg were submitted to capsule size and zeta potential determination. Our data demonstrated an increased capsule size (Figure 5A) and increased electronegativity (Figure 5B) in the fungal cells recovered from BAL of mice infected with IAV+Cg, when compared with those infected with Cg alone and cultured fungi (Cg control). Figure 5C demonstrates a phagocyte (arrow head) attempting to engulf an enlarged encapsulated Cg cell (thick arrow, Figure 5C). In the same way, our results for the total cell diameter size showed the higher proportion of enlarged cells ($>10 \mu\text{m}$) in the co-infected group (35.9%), while mice infected only by Cg present only 18.0% of enlarged cells (Figure 5D).

IAV Increased Expression of IFN- α 4 and IFN- β and pro-Inflammatory Mediators, but Decreased IFN- γ Levels

Given the severe histopathological alterations caused by IAV infection, we investigated the host response against IAV that may



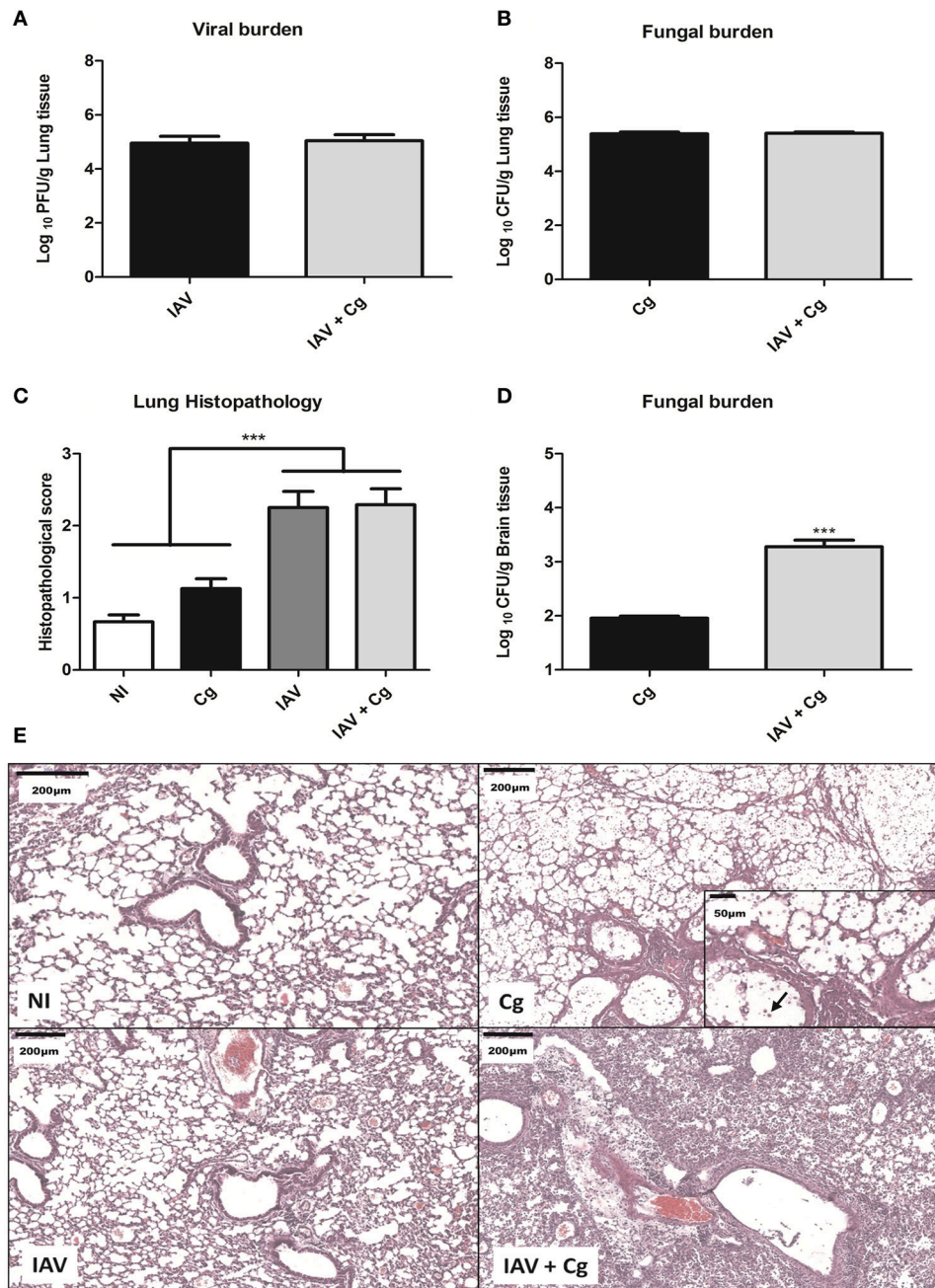
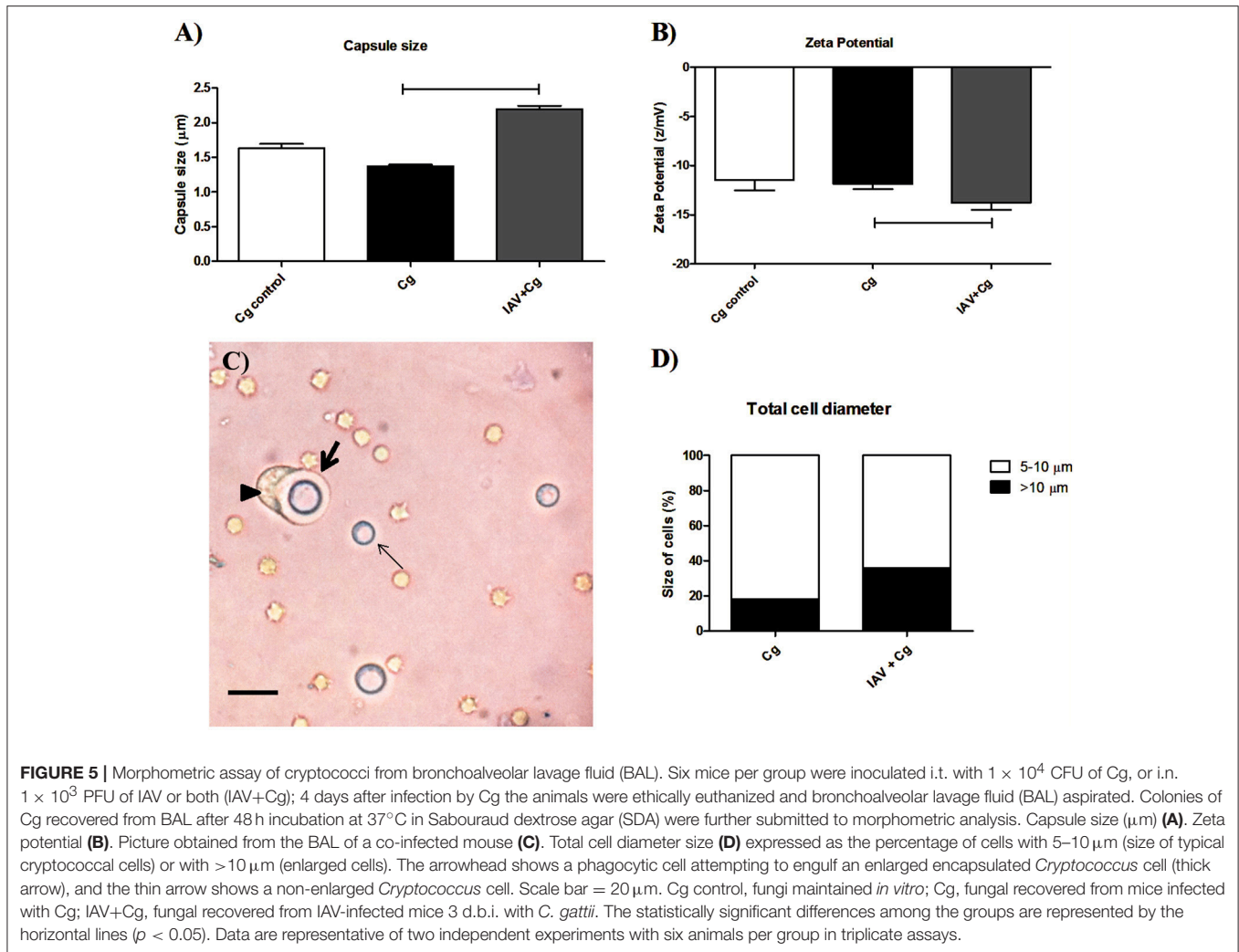


FIGURE 4 | Viral and fungal burdens and histopathology. Six mice per group were inoculated i.t. with 1×10^4 CFU of *C. gattii*, or i.n. 1×10^3 PFU/animal of Influenza A virus or both. After 4 days of infection with Cg (equivalent to 7 days infection by IAV) the animals were ethically euthanized to assess the viral and fungal burden and histopathology. Histological sections of lungs were stained with H&E and visualized at $200\times$ magnification with at least 10 fields per coverslip. Viral burden in the lungs (A). Fungal burden in the lungs (B). Histopathological score of the lungs (C). Fungal burden in the brain (D). Histopathological panel: representative pictures of the histopathology of the lungs (Scale bar = $200\ \mu\text{m}$) (E). The arrow indicates cryptococci in the amplified box (Scale bar = $50\ \mu\text{m}$). Cg, *C. gattii*; IAV, Influenza A virus; IAV+Cg, Influenza A virus 3 days before infection (3 d.b.i.) with *C. gattii*. NI, non-infected group. $***p < 0.0005$ (statistically significant difference when compared to Cg). Data are representative of two independent experiments.

also be responsible for the increased susceptibility to secondary *C. gattii* infection. Further, to determine the inflammatory profile of mice at the time they would be infected with Cg, mice were

infected only by IAV (1×10^3 PFU) or NI and they were ethically euthanized and lungs collected 3 days after IAV infection. The expression of the genes of type 1 interferons, i.e., interferon



alpha (IFN- α 4) and beta (IFN- β) were significantly increased ($p < 0.0005$) in the IAV infection (Figures 6A,B, respectively). Interestingly, the levels of interferon gamma (IFN- γ) were reduced ($p < 0.005$) in comparison with non-infected mice (Figure 6C). Additionally, the levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were not altered by IAV (Figure 6D). We verified increased levels of CXCL-1 (Figure 6E), interleukin 1- β (IL-1 β) (Figure 6F), and IL-6 (Figure 6G). Moreover, the levels of cytokines IL-4 (Figure 6H) and IL-10 (Figure 6I) were lower than those in NI mice. Here we used MPO as an indirect measurement of neutrophil accumulation, since MPO is the most abundant pro-inflammatory enzyme stored in the azurophilic granules of neutrophilic granulocytes (Pulli et al., 2013). In the same way, an estimate of macrophage infiltration is given by the level of NAG which is present in high specific activity in activated macrophages (Bailey, 1988). The activities of the enzymes MPO (Figure 6J) and NAG (Figure 6K) were significantly ($p < 0.05$) increased in lungs of mice infected with IAV compared with NI mice, suggesting that neutrophils and macrophages, respectively, had been recruited to the site of infection.

Co-infection Impairs Phagocytosis of *C. gattii* and Production of ROS and Increases the Intracellular Proliferation Rate

In order to assess the influence of IAV infection in Cg phagocytosis, we performed the *in vivo* and *in vitro* phagocytosis assays. The phagocytic index of Cg, as assessed using mononuclear cells of BAL aspirated from IAV+Cg-co-infected mice, was reduced in comparison with those infected with Cg alone (Figure 7A). These data were confirmed in the *in vitro* assay using BMDM (Figure 7B). Furthermore, the IPR assay revealed an increased ability of Cg to grow inside BMDMs that had been virus-infected 2 h prior to the addition of Cg (IAV+Cg) (Figure 7C). In addition, challenge with IAV or IAV+Cg reduced the ability of macrophages to produce ROS compared to cells infected with Cg (Figure 7D), but not PRN (Figure 7E) and NO (Figure 7F). Treatment with IFN- γ improved the oxidative burst activity of macrophages and decreased the IPR for BMDM challenged with Cg alone. However, in co-infected BMDMs, IAV impaired the fungicide activity of macrophages independently

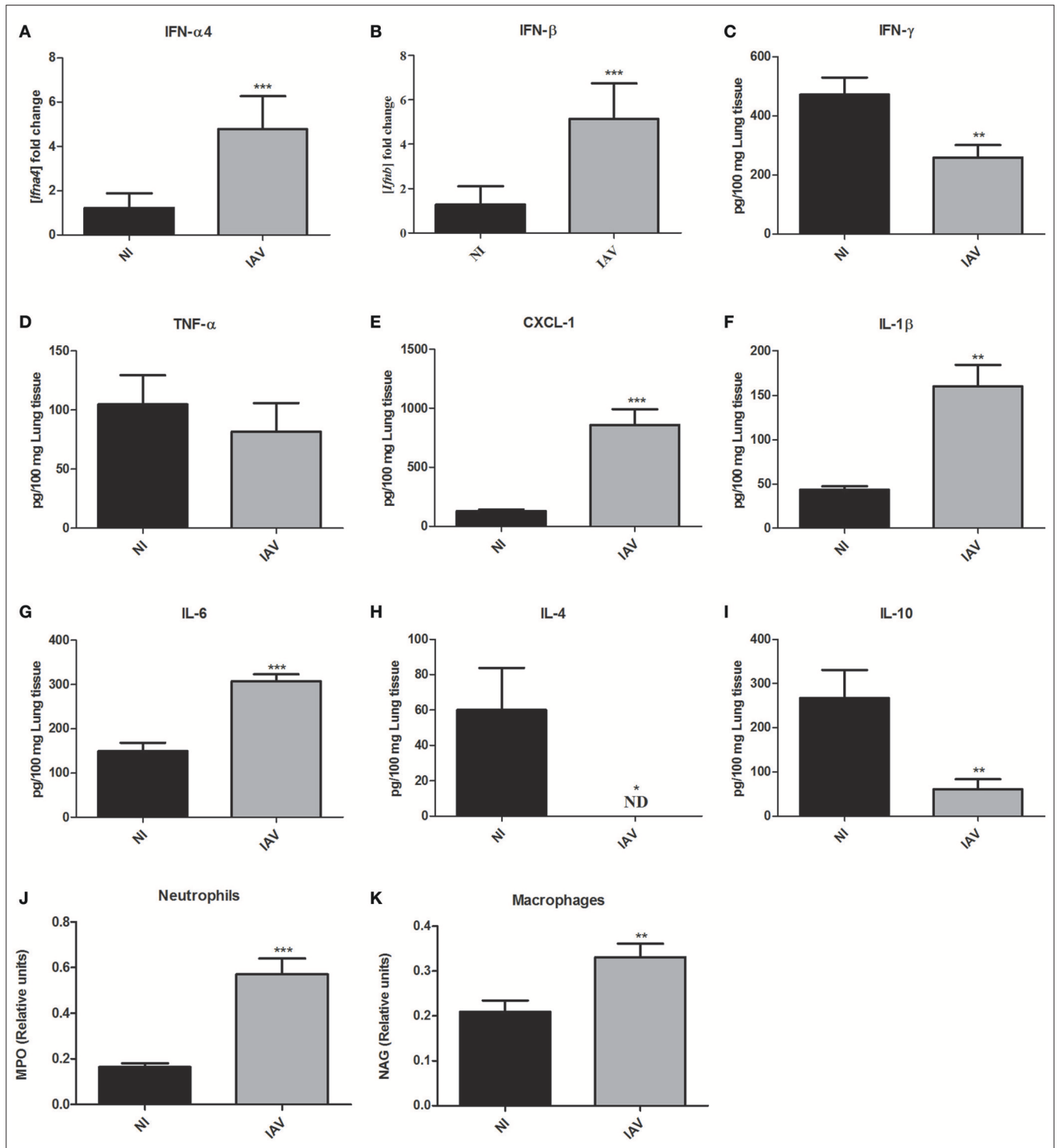
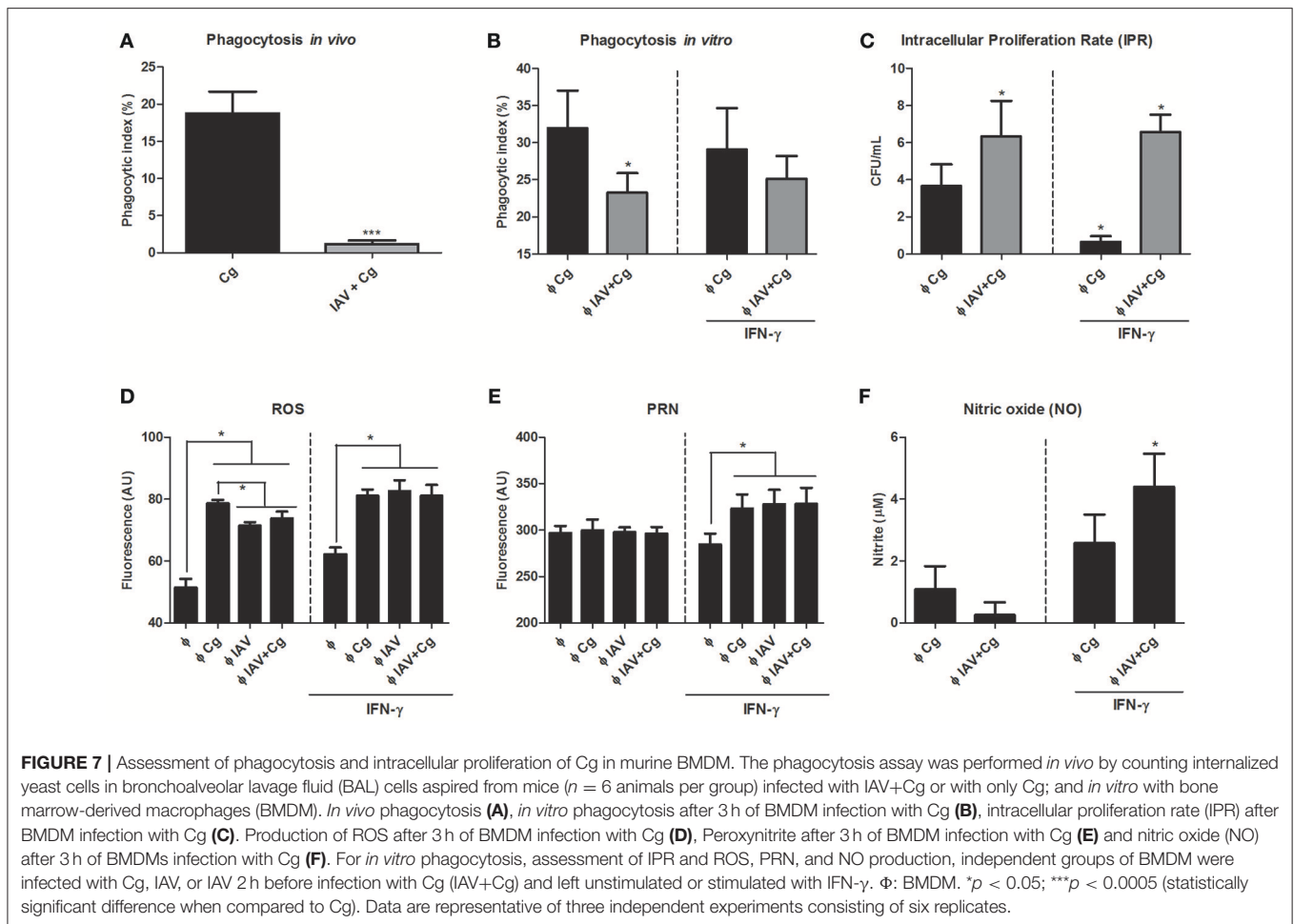


FIGURE 6 | Measurement of cytokines and chemokine in the lungs and myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) activities in the lungs of mice after 3 days of influenza A virus (IAV) infection compared to non-infected (NI) group. Six mice per group were infected only with IAV or non-infected (NI) to investigate the immunological response induced by influenza. The animals were ethically euthanized 3 days after IAV infection to assess cytokines and chemokine levels and MPO and NAG activities in the lungs. Fold increase of mRNA of IFN- α 4 (A) and IFN- β (B). Levels of IFN- γ (C), TNF- α (D), CXCL-1 (E), IL-1 β (F), IL-6 (G), IL-4 (H), and IL-10 (I). The relative number of neutrophils was indirectly measured by the MPO activity (J) and the relative number macrophages was indirectly measured by the NAG activity (K). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0005$ (statistically significant difference when compared to NI). ND, non detected. Data are representative of three independent experiments with six animals per group.



of the increase in ROS, PRN, and NO production induced by IFN- γ .

DISCUSSION

IAV is a major cause of epidemics and pandemics in humans, occasioning high morbidity and mortality worldwide (Saxena et al., 2017). The IAV infections are widely associated with secondary invasive aspergillosis, even among immunocompetent hosts, including those without classic risk factors (Kwon et al., 2013; Alshabani et al., 2015; Crum-Cianflone, 2016). Although the contribution of secondary bacterial infection to the morbidity and mortality of influenza has been studied extensively, there is a remarkable paucity of information on co-infection with other respiratory pathogens (Peltola and McCullers, 2004; Smith et al., 2013; Duvigneau et al., 2016). *Cryptococcus gattii* is an airborne fungal pathogen, which infects the lungs and secondarily, the CNS. Unlike the majority of infections with *C. neoformans*, those caused by *C. gattii* frequently occur in non-immunocompromised hosts (Bielska and May, 2016). As far as we know, there are only two case reports describing an association between *C. neoformans* and influenza virus (Hosseinnezhad and Rapose,

2012; Gupta et al., 2015), both caused by the 2009-pandemic H1N1 influenza A, showing clinical evidence of co-infection among these pathogens. Because Cg is an emergent and still poorly understood pathogen, which infects apparently healthy hosts and displays the lung tropism as widespread IAV, we evaluated the impact of co-infection in a murine model.

Our preliminary findings showed that a deleterious effect of co-infection was evident only in mice exposed to IAV 3 days before inoculation with Cg. Notably, day 3 of IAV infection coincides with high levels of virus in infected lungs (Ayala et al., 2011; Pan et al., 2013; Barbosa et al., 2014). The importance of active viral multiplication in this predisposition to severe pulmonary cryptococcal disease was demonstrated by treatment with the antiviral oseltamivir, which delayed mortality of mice co-infected. Similar sequence of effects were reported in mice initially infected with IAV and inoculated later with *Legionella pneumophila*, which displayed increased weight loss and succumbed to infection, whereas the animals infected only with one pathogen survived (Jamieson et al., 2013).

Although there were no differences in viral or fungal loads in lungs of mice co-infected when compared with those of mice infected with IAV or Cg alone, cerebral loads of cryptococci were higher in the presence of co-infection. These results may

explain their impaired neuronal responses as assessed by SHIRPA and the worse prognosis. Moreover, infection with IAV alone or with Cg resulted in a more intense inflammatory infiltrate and severe lung damage. Indeed, the influenza virus itself is known to impair normal ciliary function (Tavares et al., 2017). In general, vulnerability to secondary infections is associated with lung damage, impairment of host defense mechanisms and impairment of phagocytosis (Smith et al., 2013; Cauley and Vella, 2015; Tavares et al., 2017). We suggest that (i) IAV-associated lung injury along with (ii) impairment of phagocytosis of the yeast and (iii) an increased inflammatory response observed in the lungs of mice may enhance the dissemination of *C. gattii* to the CNS, leading to the poor prognosis of the disease, similar to the previously demonstrated in cases of bacterial co-infections (Pittet et al., 2010; Kash et al., 2011; Liu et al., 2013).

In order to better understand the host response to IAV, we demonstrated that an increased proinflammatory cytokine profile correlated with recruitment of inflammatory cell populations. In particular, we noted higher levels of cytokines IL-1 β , IL-6, and chemokine CXCL-1 and decreased levels of IL-4 and IL-10 in the presence of IAV, but no change in TNF- α production. Together with these data, the increased expression of IFN- α 4 and IFN- β that we verified in the presence of IAV reflects the development of the antiviral state, which is known to protect the cells from the virus (Randall and Goodbourn, 2008; Tavares et al., 2017). Previous studies have shown that IAV infection can induce the production of type 1 IFN, suppress the macrophage activity and disrupt the normal ciliary clearance, which lead to an increased susceptibility to different pathogens, including the fungus *Aspergillus* spp. (Crum-Cianflone, 2016) and secondary bacterial infections (Shahangian et al., 2009; Kudva et al., 2011; Li et al., 2012).

Intriguingly, 3 days after infection, we observed a significant decrease in IFN- γ levels in mice infected with IAV. These data corroborate the study of Nguyen et al. (2000), who demonstrated that type 1 interferons (IFN- α/β) inhibit the production of IFN- γ by NK and T cells by a process that requires STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) regulation (Nguyen et al., 2000). Accordingly, Arimori et al. (2013) verified that knockout mice for the receptor of type 1 interferon (IFNAR KO) infected by influenza PR8 produce increased amounts of IFN- γ in the lungs (Arimori et al., 2013). Moreover, Sato et al. (2015) demonstrated the increased clearance of *C. neoformans* in mice knockout for the receptor of IFN- α (IFNAR1KO), which exhibited enhanced synthesis of IFN- γ and the IL-4. The authors also suggested that type I IFNs may be involved in the negative regulation of early host defense to this infection (Sato et al., 2015). Taken together, these data support our finding that IFN- γ is reduced when type 1 interferon is increased.

The role of IFN- γ in fungal infections has been demonstrated exhaustively and it is considered to be a key cytokine in anti-cryptococcal host defense (Hardison et al., 2010; Davis et al., 2015). Classical studies showed that IFN- γ promotes macrophage engulfment and killing of the fungus (Flesch et al., 1989; Kawakami et al., 1995; Hardison et al., 2010; Davis et al., 2015). In addition, M1 (classically-activated) macrophages are considered efficient killers via oxidative bursts, which are usually activated by

IFN- γ (Hardison et al., 2010; Davis et al., 2015). Also, Panackal et al. (2015), in a study with non-HIV related cryptococcal disease, proposed that macrophage activation defects along with intact T-cell activation is pivotal to cause increased susceptibility of the patient to the fungus and severe CNS disease (Panackal et al., 2015). These findings support our observation that IAV+Cg led to reduced macrophage fungicidal activity, i.e., reduced ability to engulf Cg, lower ROS production and increased fungal proliferation, which is correlated with the severity of cryptococcosis disease.

Surprisingly, IFN- γ exposure did not control intracellular proliferation rates during co-infection although it did augment macrophage oxidative bursts. Uetani et al. (2008) demonstrated that IAV subverts the response mediated by IFN- γ through effects on the intracellular signaling pathways (Uetani et al., 2008). The reduced phagocytosis during co-infection may also be a consequence of the morphological plasticity of *C. gattii*, which has the ability to enlarge its polysaccharide capsule, neutralize ROS and peroxynitrite (Frasers et al., 2009; Kronstad et al., 2011; Chen et al., 2014; Urai et al., 2015). In the same way, the higher frequency of enlarged cells during co-infection may be related to the increased virulence of *Cryptococcus* spp. through of decreasing phagocytosis, leading to the fungal persistence in the host and enhanced dissemination to the CNS (Okagaki et al., 2010; Zaragoza and Nielsen, 2013). In addition, the capsule became more electronegative, which may inhibit the interaction between Cg and macrophages (Nosanchuk et al., 1999). We speculate that Cg uses the macrophage, since its fungicidal activity is reduced, to evade the inflammatory response and enters the CNS by the well-established “Trojan horse” mechanism (Sorrell et al., 2016; Santiago-Tirado et al., 2017), leading to the poor prognosis of the disease.

In conclusion, we have shown that IAV (at the peak of infection) causes (i) lung tissue damage, (ii) impairment of phagocytosis, and (iii) an immune profile that likely triggers *C. gattii* disease of increased severity. Thus, it may be considered as a predisposing factor for this mycosis. In addition, we provide unprecedented knowledge on the interaction between these infectious agents and the host during co-infection.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LO: performed all experiments procedures involving animals analysis, immunological assays, flow cytometry, experimental procedures *in vitro*, results analysis and wrote the paper. MC: performed experimental procedures *in vivo*, *in vitro*, as well as theoretical aspects of the paper. TM, RB, HC, and NR: contributed in all experimental procedures with animals. PS: contributed in experiments procedures of immunological assays. GF: conducted the morphometric analysis and Zeta potential of Cg. LR: contributed in immunological assays. AG: carried out experiments with influenza virus, such as viral stock preparation and viral titration. CF: participated in the analysis of inflammatory factors and theoretical aspects of immunology of the paper. MP: performed the histopathological analysis. JD, and TS: substantial contributions to design

some experiments, important intellectual content for research development and theoretical aspects of the paper, revising it critically. DS, and AM: supervised the development of tests in their expertise area and discussed the results. DS: coordinated the project, designed and supervised the study, and wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG (Grants APQ-00727-16 and

01/2012) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (Grants 403006/2016-3, 14/2012 and 14/2014) and INCT Vaccines CNPq/FAPEMIG N° 015/2008. DS and AM are research fellows of the CNPq (Grants 305154/2014-1 and 305133/2015-2, respectively).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00419/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Almeida, F., Wolf, J. M., and Casadevall, A. (2015). Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 14, 1173–1185. doi: 10.1128/EC.00103-15
- Alshabani, K., Haq, A., Miyakawa, R., Palla, M., and Soubani, A. O. (2015). Invasive pulmonary aspergillosis in patients with influenza infection: report of two cases and systematic review of the literature. *Expert Rev. Respir. Med.* 9, 89–96. doi: 10.1586/17476348.2015.996132
- Arimori, Y., Nakamura, R., Yamada, H., Shibata, K., Maeda, N., Kase, T., et al. (2013). Type I interferon limits influenza virus-induced acute lung injury by regulation of excessive inflammation in mice. *Antivir. Res.* 99, 230–237. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.05.007
- Ayala, V. I., Teijaro, J. R., Farber, D. L., Dorsey, S. G., and Carbonetti, N. H. (2011). *Bordetella pertussis* infection exacerbates influenza virus infection through pertussis toxin-mediated suppression of innate immunity. *PLoS ONE* 6:e19016. doi: 10.1371/journal.pone.0019016
- Bailey, P. J. (1988). Sponge implants as models. *Methods Enzymol.* 162, 327–334. doi: 10.1016/0076-6879(88)62087-8
- Barbosa, R. P., Salgado, A. P., Garcia, C. C., Filho, B. G., Gonçalves, A. P., Lima, B. H., et al. (2014). Protective immunity and safety of a genetically modified influenza virus vaccine. *PLoS ONE* 9:e98685. doi: 10.1371/journal.pone.0098685
- Bielska, E., and May, R. C. (2016). What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? *FEMS Yeast Res.* 16:fov106. doi: 10.1093/femsyr/fov106
- Cauley, L. S., and Vella, A. T. (2015). Why is coinfection with influenza virus and bacteria so difficult to control? *Discov. Med.* 19, 33–40.
- Chen, S. C., Slavin, M. A., Heath, C. H., Playford, E. G., Byth, K., Marriott, D., et al. (2012). Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. *Clin. Infect. Dis.* 55, 789–798. doi: 10.1093/cid/cis529
- Chen, S. C. A., Meyer, W., and Sorrell, T. C. (2014). *Cryptococcus gattii* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 980–1024. doi: 10.1128/CMR.00126-13
- Costa, M. C., Santos, J. R. A., Ribeiro, M. J. A., Freitas, G. J. C., de Bastos, R. W., Ferreira, G. F., et al. (2016). The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 187–195. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.03.010
- Costa, V. V., Fagundes, C. T., Valadão, D. F., Ávila, T. V., Cisalpino, D., Rocha, R. F., et al. (2014). Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice. *Med. Microbiol. Immunol.* 203, 231–250. doi: 10.1007/s00430-014-0334-5
- Crum-Cianflone, N. F. (2016). Invasive Aspergillosis associated with severe influenza infections. *Open Forum Infect. Dis.* 3:ofw171. doi: 10.1093/ofid/ofw171
- Davis, M. J., Eastman, A. J., Qiu, Y., Gregorka, B., Kozel, T. R., Osterholzer, J. J., et al. (2015). *Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. *J. Immunol.* 194, 2219–2231. doi: 10.4049/jimmunol.1402376
- Duvigneau, S., Sharma-Chawla, N., Boianelli, A., Stegemann-Koniszewski, S., Nguyen, V. K., Bruder, D., et al. (2016). Hierarchical effects of pro-inflammatory cytokines on the post-influenza susceptibility to pneumococcal coinfection. *Sci. Rep.* 6:37045. doi: 10.1038/srep37045
- Ferreira, G. F., de Baltazar, L. M., Santos, J. R. A., Monteiro, A. S., Fraga, L. A., Resende-Stoianoff, M. A., et al. (2013). The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1801–1811. doi: 10.1093/jac/dkt114
- Ferreira, G. F., Santos, J. R. A., da Costa, M. C., de Holanda, R. A., Denadai, M. L., de Freitas, G. J. C., et al. (2015). Heteroresistance to itraconazole alters the morphology and increases the virulence of *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4600–4609. doi: 10.1128/AAC.00466-15
- Flesch, I. E., Schwamberger, G., and Kaufmann, S. H. (1989). Fungicidal activity of IFN-gamma-activated macrophages. extracellular killing of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 142, 3219–3224.
- Frases, S., Pontes, B., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Viana, N. B., and Casadevall, A. (2009). The elastic properties of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Biophys. J.* 97, 937–945. doi: 10.1016/j.bpj.2009.04.043
- Garcia, C. C., Weston-Davies, W., Russo, R. C., Tavares, L. P., Rachid, M. A., Alves-Filho, J. C., et al. (2013). Complement C5 activation during influenza A infection in mice contributes to neutrophil recruitment and lung injury. *PLoS ONE* 8:e64443. doi: 10.1371/journal.pone.0064443
- Gupta, A., Kapoor, M. R., Gupta, S., and Sachdeva, H. C. (2015). Concomitant infections of influenza A H1N1 and disseminated Cryptococcosis in an HIV seropositive patient. *J. Lab. Phys.* 7, 134–136. doi: 10.4103/0974-2727.163137
- Hardison, S. E., Ravi, S., Wozniak, K. L., Young, M. L., Olszewski, M. A., and Wormley, F. L. (2010). Pulmonary infection with an interferon-gamma-producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection. *Am. J. Pathol.* 176, 774–785. doi: 10.2353/ajpath.2010.090634
- Hosseinnhezad, A., and Rapose, A. (2012). Cryptococcal meningoencephalitis after H1N1 influenza. *BMJ Case Rep.* 2012:bcr1120115224. doi: 10.1136/bcr.11.2011.5224
- Jamieson, A. M., Pasman, L., Yu, S., Gamradt, P., Homer, R. J., Decker, T., et al. (2013). Role of tissue protection in lethal respiratory viral-bacterial coinfection. *Science* 340, 1230–1234. doi: 10.1126/science.1233632
- Kash, J. C., Walters, K. A., Davis, A. S., Sandouk, A., Schwartzman, L. M., Jagger, B. W., et al. (2011). Lethal synergism of 2009 pandemic H1N1 influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* coinfection is associated with loss of murine lung repair responses. *MBio* 2:e00172-11. doi: 10.1128/mBio.00172-11
- Kawakami, K., Kohno, S., Kadota, J., Tohyama, M., Teruya, K., Kudaken, N., et al. (1995). T cell-dependent activation of macrophages and enhancement of their phagocytic activity in the lungs of mice inoculated with heat-killed *Cryptococcus neoformans*: involvement of IFN-gamma and its protective effect against cryptococcal infection. *Microbiol. Immunol.* 39, 135–143. doi: 10.1111/j.1348-0421.1995.tb02180.x
- Krammer, F., and Palese, P. (2015). Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 167–182. doi: 10.1038/nrd4529
- Kronstad, J. W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., DSouza, C. A., Griffiths, E. J., et al. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 193–203. doi: 10.1038/nrmicro2522

- Kudva, A., Scheller, E. V., Robinson, K. M., Crowe, C. R., Choi, S. M., Slight, S. R., et al. (2011). Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice. *J. Immunol.* 186, 1666–1674. doi: 10.4049/jimmunol.1002194
- Kwon, O. K., Lee, M. G., Kim, H. S., Park, M. S., Kwak, K. M., and Park, S. Y. (2013). Invasive pulmonary aspergillosis after influenza A infection in an immunocompetent patient. *Tuberc. Respir. Dis.* 75, 260–263. doi: 10.4046/trd.2013.75.6.260.
- Li, W., Moltedo, B., and Moran, T. M. (2012). Type I interferon induction during influenza virus infection increases susceptibility to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection by negative regulation of $\gamma\delta$ T cells. *J. Virol.* 86, 12304–12312. doi: 10.1128/JVI.01269-12
- Lin, Y. Y., Shiao, S., and Fang, C. T. (2015). Risk factors for invasive *Cryptococcus neoformans* diseases: a case-control study. *PLoS ONE* 10:e0119090. doi: 10.1371/journal.pone.0119090
- Liu, X., He, Y., Xiao, K., White, J. R., Fusco, D. N., and Papanicolaou, G. A. (2013). Effect of linezolid on clinical severity and pulmonary cytokines in a murine model of influenza A and *Staphylococcus aureus* coinfection. *PLoS ONE* 8:e57483. doi: 10.1371/journal.pone.0057483
- Ma, H., Hagen, F., Stekel, D. J., Johnston, S. A., Sionov, E., Falk, R., et al. (2009). The fatal fungal outbreak on Vancouver island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 12980–12985. doi: 10.1073/pnas.0902963106
- MacDougall, L., Fyfe, M., Romney, M., Starr, M., and Galanis, E. (2011). Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 193–199. doi: 10.3201/eid1702.101020
- May, R. C., Stone, N. R., Wiesner, D. L., Bicanic, T., and Nielsen, K. (2016). Cryptococcus: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 106–117. doi: 10.1038/nrmicro.2015.6
- Nguyen, K. B., Cousens, L. P., Doughty, L. A., Pien, G. C., Durbin, J. E., and Biron, C. A. (2000). Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat. Immunol.* 1, 70–76. doi: 10.1038/76940
- Nosanchuk, J. D., Cleare, W., Franzot, S. P., and Casadevall, A. (1999). Amphotericin B and Fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 233–239.
- Nulens, E. F. L., Bourgeois, M. J. C., and Reyniers, M. B. M. L. (2017). Post-influenza aspergillosis, do not underestimate influenza B. *Infect. Drug Resist.* 10, 61–67. doi: 10.2147/IDR.S122390
- Okagaki, L. H., Strain, A. K., Nielsen, J. N., Charlier, C., Baltes, N. J., and Heitman, J. (2010). Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog* 6:e1000953. doi: 10.1371/journal.ppat.1000953
- Pan, W., Dong, Z., Li, F., Meng, W., Feng, L., Niu, X., et al. (2013). Visualizing influenza virus infection in living mice. *Nat. Commun.* 4, 2369. doi: 10.1038/ncomms3369
- Panackal, A. A., Wuest, S. C., Lin, Y., Wu, T., Zhang, N., Kosa, P., et al. (2015). Paradoxical immune responses in non-HIV Cryptococcal Meningitis. *PLoS Pathog* 11:e1004884. doi: 10.1371/journal.ppat.1004884
- Pappas, P. G. (2013). Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. *Trans. Am. Clin. Clim. Assoc.* 124, 61–79.
- Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., and Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23, 525–530. doi: 10.1097/QAD.0b013e328322ffac
- Peltola, V. T., and McCullers, J. A. (2004). Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23, S87–S97. doi: 10.1097/01.inf.0000108197.81270.35
- Pittet, L. A., Hall-Stoodley, L., Rutkowski, M. R., and Harmsen, A. G. (2010). Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 450–460. doi: 10.1165/rcmb.2007-0417OC
- Pulli, B., Ali, M., Forghani, R., Schob, S., Hsieh, K. L. C., Wojtkiewicz, G., et al. (2013). Measuring Myeloperoxidase activity in biological Samples. *PLoS ONE* 8:e67976. doi: 10.1371/journal.pone.0067976
- Randall, R. E., and Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89, 1–47. doi: 10.1099/vir.0.83391-0
- Ribeiro, N. Q., Costa, M. C., Magalhães, T. F. F., Carneiro, H. C. S., Oliveira, L. V., Fontes, A. C. L., et al. (2017). Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49, 695–702. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.005
- Santiago-Tirado, F. H., Onken, M. D., Cooper, J. A., Klein, R. S., and Doering, T. L. (2017). Trojan horse transit contributes to blood-brain barrier crossing of a Eukaryotic pathogen. *MBio* 8:e02183-16. doi: 10.1128/mBio.02183-16
- Santos, J. R. A., Holanda, R. A., Frases, S., Bravim, M., Araujo, G. S., Santos, P. C., et al. (2014). Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. *PLoS ONE* 9:e112669. doi: 10.1371/journal.pone.0112669
- Santos, P. C., Santos, D. A., Ribeiro, L. S., Fagundes, C. T., de Paula, T. P., Avila, T. V., et al. (2013). The Pivotal role of 5-Lipoxygenase-derived LTB(4) in controlling pulmonary Paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2390. doi: 10.1371/journal.pntd.0002390
- Sato, K., Yamamoto, H., Nomura, T., Matsumoto, I., Miyasaka, T., Zong, T., et al. (2015). *Cryptococcus neoformans* infection in mice lacking Type I interferon signaling leads to increased fungal clearance and IL-4-dependent Mucin production in the lungs. *PLoS ONE* 10:e0138291. doi: 10.1371/journal.pone.0138291
- Saxena, S., Singh, D., Zia, A., Umrao, J., Srivastava, N., Pandey, A., et al. (2017). Clinical characterization of influenza A and human respiratory syncytial virus among patients with influenza like illness. *J. Med. Virol.* 89, 49–54. doi: 10.1002/jmv.24607
- Shahangian, A., Chow, E. K., Tian, X., Kang, J. R., Ghaffari, A., Liu, S. Y., et al. (2009). Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 1910–1920. doi: 10.1172/JCI35412
- Smith, A. M., Adler, F. R., Ribeiro, R. M., Gutenkunst, R. N., McAuley, J. L., McCullers, J. A., et al. (2013). Kinetics of coinfection with influenza A virus and *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* 9:e1003238. doi: 10.1371/journal.ppat.1003238
- Sorrell, T. C., Juillard, P. G., Djordjevic, J. T., Kaufman-Francis, K., Dietmann, A., Milonig, A., et al. (2016). Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. grubii strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. *Microbes Infect.* 18, 57–67. doi: 10.1016/j.micinf.2015.08.017
- Tanaka, A., Nakamura, S., Seki, M., Fukudome, K., Iwanaga, N., Imamura, Y., et al. (2013). Toll-like receptor 4 agonistic antibody promotes innate immunity against severe pneumonia induced by coinfection with influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Immunol.* 20, 977–985. doi: 10.1128/CI.00010-13
- Tavares, L. P., Teixeira, M. M., and Garcia, C. C. (2017). The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two edged sword. *Inflamm. Res.* 66, 283–302. doi: 10.1007/s00011-016-0996-0
- Uetani, K., Hiroi, M., Meguro, T., Ogawa, H., Kamisako, T., Ohmori, Y., et al. (2008). Influenza A virus abrogates IFN-gamma response in respiratory epithelial cells by disruption of the Jak/Stat pathway. *Eur. J. Immunol.* 38, 1559–1573. doi: 10.1002/eji.200737045
- Urai, M., Kaneko, Y., Ueno, K., Okubo, Y., Aizawa, T., Fukazawa, H., et al. (2015). Evasion of innate immune responses by the highly virulent *Cryptococcus gattii* by altering capsule Glucuronoxylomannan structure. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 5:101. doi: 10.3389/fcimb.2015.00101
- Zaragoza, O., and Nielsen, K. (2013). Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 409–413. doi: 10.1016/j.mib.2013.03.006

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Oliveira, Costa, Magalhães, Bastos, Santos, Carneiro, Ribeiro, Ferreira, Ribeiro, Gonçalves, Fagundes, Pascoal-Xavier, Djordjevic, Sorrell, Souza, Machado and Santos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Accepted Manuscript

Title: *In vivo* probiotic and antimicrobial photodynamic therapy as alternative therapies against cryptococcosis are ineffective

Authors: Lorena Vívien Neves de Oliveira, Rafael Wesley Bastos, Noelly de Queiroz Ribeiro, Marliete Carvalho Costa, Leonardo Borges Acurcio, Karen Maia Rocha, Julliana Ribeiro Alves Santos, Rosana de Carvalho Cruz, Betânia Maria Soares, Daniel de Assis Santos



PII: S0378-1135(17)30587-4
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.015>
Reference: VETMIC 7729

To appear in: *VETMIC*

Received date: 8-5-2017
Revised date: 18-8-2017
Accepted date: 23-8-2017

Please cite this article as: de Oliveira, Lorena Vívien Neves, Bastos, Rafael Wesley, de Queiroz Ribeiro, Noelly, Costa, Marliete Carvalho, Acurcio, Leonardo Borges, Rocha, Karen Maia, Santos, Julliana Ribeiro Alves, de Carvalho Cruz, Rosana, Soares, Betânia Maria, de Assis Santos, Daniel, *In vivo* probiotic and antimicrobial photodynamic therapy as alternative therapies against cryptococcosis are ineffective. *Veterinary Microbiology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.015>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

***In vivo* probiotic and antimicrobial photodynamic therapy as alternative therapies against cryptococcosis are ineffective**

Lorena Vívien Neves de Oliveira^{1,&}, Rafael Wesley Bastos^{1,&}, Noelly de Queiroz Ribeiro¹, Marliete Carvalho Costa¹, Leonardo Borges Acurcio², Karen Maia Rocha¹, Julliana Ribeiro Alves Santos³, Rosana de Carvalho Cruz⁴, Betânia Maria Soares^{4,5}, Daniel de Assis Santos^{1,*}.

¹Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³Universidade CEUMA (UNICEUMA), São Luís, Maranhão, Brazil.

⁴Laboratório de Bioengenharia, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁵Universidade de Itaúna, Itaúna, Minas Gerais, Brazil.

[&]These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author: Daniel de Assis Santos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 31270-901. Fax: +55 31 3409 2733; E-mail: das@ufmg.br or dasufmg@gmail.com

Highlights

- Cryptococcosis treatment is difficult and new therapies need to be developed.
- Probiotic and aPDT alternative therapies against cryptococcosis are proposed.
- Both probiotic and aPDT did not improve the survival of mice with cryptococcosis.
- This study highlights the importance of correlating in vitro and in vivo therapies.
- Negative results may help in tests of new therapies against cryptococcosis.

Abstract

Cryptococcosis, an invasive fungal infection distributed worldwide that affects both domestic and wild animals, has incredible rates regarding treatment failure, leading to the necessity of the development of new therapies. In this way, we aimed to evaluate the probiotic (*Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus paracasei* ST-11, and *Lactobacillus rhamnosus* GG) and antimicrobial photodynamic alternative therapies against *Cryptococcus gattii* in a murine model. Although previous studies suggest that these therapies can be promising against cryptococcosis, our experimental conditions for both probiotic and antimicrobial photodynamic therapies (aPDT) were not able to improve the survival of mice with cryptococcosis, even with the treatment combined with fluconazole. Our results may help other researchers to find the best protocol to test alternative therapies against *Cryptococcus gattii*.

Key words. *Cryptococcus gattii*, *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus paracasei* ST-11 and *Lactobacillus rhamnosus* GG, fluconazole.

Introduction

Cryptococcosis is a fungal infection caused mainly by *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* and affects both domestic, predominantly dogs and cats, and wild animals, with many possible sites of infection, such as the skin, lungs, upper respiratory tract, lymph nodes, central nervous system (CNS), eyes, joints, and periarticular connective tissue (Lester et al., 2011; Chen et al., 2014). The treatment with antifungals, such as amphotericin B (AMB) and fluconazole (FCZ), has some known drawbacks. As AMB is not available in many countries and is nephrotoxic, patients treated with this drug need more attention and care. The liposomal AMB usually solves the problem of

toxicity, but this formulation is more expensive (Perfect and Bicanic, 2015). Regarding FCZ, this drug has a good bioavailability and lower toxicity and cost (Allen et al., 2015). However, an increasing number of strains less susceptible to FCZ has been observed (Chen et al., 2015; Smith et al., 2015; Sykes et al., 2016), especially considering the intrinsic heteroresistance to azoles by *C. neoformans* and *C. gattii* (Sionov et al., 2009; Varma and Kwon-Chung, 2010). This reinforces the need to search for new drugs and alternative therapies, such as the administration of probiotics and antimicrobial photodynamic therapy, against this disease.

Recently, it was demonstrated that the gut microbiota is important to protect mice against *C. gattii*, preventing fungal translocation to the brain at the beginning of the infection (Costa et al., 2016). Besides, there are some reports demonstrating that probiotics (administered intranasally or intragastrically) could protect animals against lung bacterial infections through immune system stimulation (Villena et al., 2011; Vieira et al., 2016). Trompette et al. (2013) also demonstrated that the ingestion of short-chain fatty acids (SCFA), which can also be produced by probiotics (LeBlanc et al., 2017), induce the formation of dendritic cells with high phagocytic capacity, that may act in lung diseases (Trompette et al., 2014). Based on these studies, we assumed that probiotics, defined as ‘live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host’ (FAO/WHO, 2002), could be also used as an alternative therapy to treat cryptococcosis (Costa et al., 2016).

In addition, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) arises as an alternative to antimicrobial therapy (Baltazar et al., 2015a) and an innovative tool for use in veterinary medicine (Nascimento et al., 2015; Sellera et al., 2016). It is based on the use of a photosensitizer (PS) and visible light, which leads to the production of reactive oxygen species (ROS) and cell death (Dai et al., 2012). The aPDT is highly effective *in*

in vitro against viruses, protozoa, bacteria (Donnelly et al., 2008; Carpenter et al., 2015), and fungi such as *Trichophyton rubrum*, *Sporothrix schenckii*, *Malassezia furfur*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Candida* spp., *C. neoformans* and *C. gattii* (Baltazar et al., 2015a; Liang et al., 2016), which indicates that it is a promising alternative to treat cryptococcosis.

Previously, we have shown the reduction of *in vitro* viability of *C. gattii*, including antifungal resistant isolates, using TBO as a PS and LED as the light source (Soares et al., 2011). These results support aPDT as a new approach against cryptococcosis. In addition, *in vivo* aPDT has been successfully performed against superficial skin and oral *C. albicans* infection in mice (Mima et al., 2010; Sherwani et al., 2015). Also, aPDT, using TBO and LED, efficiently controlled dermatophytosis caused by *T. rubrum* in a murine model (Baltazar et al., 2015b). However, the *in vivo* aPDT efficacy in systemic infections is unknown, and our study is the first to approach and evaluate this *in vivo* therapy in cryptococcosis and systemic fungal infections.

Overall, we aimed to evaluate the effects of probiotics and aPDT on the survival of murine cryptococcosis caused by *C. gattii*.

Materials and Methods

We used C57BL/6 male mice, 6-8 weeks-old; water and food were administered *ad libitum*. The study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG, protocols 368/2013 and 130/2014).

The L27/01 VGII strain of *C. gattii* (Costa et al., 2016) was cultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) for 48 h at 37°C and used to infect mice for all the tests. Prior to infection, animals were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection with ketamine

hydrochloride (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and then inoculated via the intratracheal (i.t.) route with 30 μ L of 1×10^4 colony forming units (CFU) of *C. gattii*. Mice were monitored daily for survival assessment (Fontes et al., 2016).

The probiotic microorganisms used in this study were *Saccharomyces boulardii* (Floratil[®]), *Lactobacillus rhamnosus* GG (Culturelle[®]), and *Lactobacillus paracasei* ST-11 (Duocap[®]). *Saccharomyces boulardii* was cultured on YPD broth as described previously (Bastos et al., 2016). Probiotic bacteria samples were cultured in MRS (Man, Rogosa & Sharpe) broth over a period of 24 h at 37°C. Mice (n = 6) received $8.0 \log_{10}$ CFU *S. boulardii* (Sb), *L. rhamnosus* GG (LGG), or *L. paracasei* (Lp) daily. For the therapy with Sb, mice started receiving this probiotic at day 10 or 5 prior to the infection or at the day or five days after infection with *C. gattii*. For therapy with Lp, mice were divided into two groups, one that received and one that did not receive the probiotic and the therapy started at the day of infection, as well for the LGG. The LGG was administered by intranasal (i.n.) or intragastric (i.g.) routes, with or without fluconazole (Sigma Aldrich[®]) (i.p., 10 mg/Kg/day). Control groups (CTL) were administered with PBS.

In the aPDT tests, we used toluidine blue O (TBO) (Sigma Aldrich[®]) as a PS and light-emitting diode (LED) as a light source (wavelength at 635 ± 10 nm) (Soares et al., 2011). Infected mice (n = 6) were anesthetized and received TBO (20 mM) intravenously (i.v.), under light protection. After 20 minutes, mice were irradiated with LED (power of 210-290mW) for 2 minutes (energy density of 8.88-12.24 J/cm²) or 30 seconds (energy density of 2.22-3.06 J/cm²) using a cluster of LEDs (DMC, São Carlos, SP, Brazil) (Fig. 2A). Mice were placed at the sector 5 of the equipment. The aPDT treatment began one day after infection and mice were treated in intervals of 72h or seven days depending on the therapeutic scheme used. The aPDT for 7 to 7 days was

also associated with fluconazole (i.p., 10mg/kg/day). In the control groups (CTL), the animals were not treated.

Results and Discussion

Initially, we tested the therapy with *Saccharomyces boulardii* against cryptococcosis. *Saccharomyces boulardii* is the only probiotic yeast commercially available and has been proposed to prevent and treat some diseases, e.g. acute adult diarrhea (Hochter et al., 1990; Mansour-Ghanaei et al., 2003; McFarland, 2010), ulcerative colitis (Guslandi et al., 2003; McFarland, 2010), and *Clostridium difficile* infection (Kelesidis and Pothoulakis, 2012). However, it is believed that their effects are restricted to the gastrointestinal tract (McFarland, 2010). Mice infected with *C. gattii* and not treated (CTL group) survived for 23 days (Fig. 1A). The therapy with Sb did not significantly protect mice ($p > 0.05$) from the infection, even when we varied the starting day of the therapy (Fig. 1A). Subsequently, we investigated the therapy with *Lactobacillus paracasei* ST-11, a probiotic bacterium with extra-intestinal effect (Benyacoub et al., 2014). However, this probiotic also did not increase ($p > 0.05$) the survival of infected animals with *C. gattii* when compared to the control group (Fig. 1B).

Lastly, we tested *Lactobacillus rhamnosus* GG using a typical (intra-gastric) and alternative (intra-nasal) route of administration with or without combination with FCZ. The LGG is widely studied and its effectiveness is well defined, including the prevention and treatment of gut infections, diarrhea, allergic symptoms, and reducing the risk on respiratory tract infections (Segers and Lebeer, 2014). The groups that received FCZ (combined or not with LGG) showed improved survival ($p < 0.05$) (Fig. 1C and D), but there were no differences ($p > 0.05$) between the groups that received

the combination and the antifungal substance alone, regardless of the probiotic administration route (Fig. 1C and D).

Despite of the negative results obtained, it is important to highlight that we used a typical dose of probiotic yeast and bacteria ($8.0 \log_{10}$ CFU), based on studies that had positive results in gut diseases and lung infections (Martins et al., 2009; Martins et al., 2010; Bastos et al., 2016; Vieira et al., 2016). However, it has been shown that, for some diseases, the probiotic therapy was efficient only when administrated in higher than the typical dose of probiotics (Kelesidis and Pothoulakis, 2012; Justino et al., 2014).

For the aPDT analysis, mice infected with *C. gattii* were initially treated with aPDT every 72 hours. In this first test, we evaluated 2 minutes ($8.88-12.24 \text{ J/cm}^2$) and 30 seconds ($2.22-3.06 \text{ J/cm}^2$) of irradiation with LED at 210-290 mW, 20 minutes after applying the photosensitizer TBO (i.v., 20mM), and survival was determined (Fig. 2B). The results show that aPDT in intervals of 72 hours did not improve the survival ($p > 0.05$) of animals during the infection in comparison to the control group, independently on the irradiation time (LED by 2 min or 30 s) (Fig. 2B). We also used a second approach, increasing treatment time for aPDT to once a week in order to improve the effectiveness of the treatment, since we noted that aPDT (2 min) treatment every 72 hours was weakening mice, and then verified the survival of mice (Fig. 2C). Similar to the previous result, the non-treated animals (CTL group) died after 20 days and the survival rate did not increase ($p > 0.05$) with aPDT, although it was evident that LED irradiation for 30 seconds (median survival: 21 days) was better than that for 2 minutes (median survival: 13 days) (Fig. 2C).

Since the drug combination can be more effective in killing microorganisms and has already been used in the treatment of cryptococcosis (Zhai and Lin, 2011), we

combined LED irradiation for 30s (2.22-3.06 J/cm²) with antifungal treatment. Once again, aPDT did not significantly increase ($p > 0.05$) animal survival when compared to the control (Fig. 2D). Moreover, FCZ therapy significantly increased mice survival ($p < 0.05$) in comparison to groups that did not receive the drug. However, the combination between aPDT and FCZ did not result in statistical differences ($p > 0.05$) from the group treated with FLZ alone (Fig. 2D). In spite of the positive *in vitro* results with aPDT against *Cryptococcus* spp. found in some studies (Soares et al., 2011; Prates et al., 2013), our results indicate that aPDT did not protect mice against *C. gattii* under the protocols presented in this study. Unfortunately, longer irradiation times with LED were harmful to the animals at higher irradiation times. This may have impaired the effectiveness of the therapy, since short periods of light treatment may not be sufficient to inhibit fungal growth; most likely, this is the reason why the survival of the mice was not improved. In any case, it is important to emphasize that this is the first study to demonstrate aPDT therapy *in vivo* for systemic fungal infections using systemic LED irradiation, but our tested conditions of the aPDT were unsuccessful in the treatment of cryptococcosis *in vivo*.

Conclusion

In conclusion, probiotic therapy, using a typical dose of *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus paracasei* ST-11, or *Lactobacillus rhamnosus* GG, as well as antimicrobial photodynamic therapy with TBO (i.v., 20 mM) and systemic LED irradiation (2.22-3.06 J/cm²), combined or not with fluconazole, did not protect mice against cryptococcosis caused by *C. gattii* in a murine model. This study highlights the importance of evaluating new therapies and correlating both *in vitro* and *in vivo* models, since some treatments can be effective only *in vitro*. Altogether, these data may help

researchers to find the best protocol for testing alternative therapies against cryptococcosis.

Conflict of interest

None to declare.

Acknowledgments

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (Grant APQ-00727-16), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Grant 403006/2016-3). DAS is a research fellow of the CNPq (Grant 305154/2014-1).

Figure legends**Figure 1. Probiotic therapy does not protect C57BL/6 mice against *C. gattii*.**

Survival of mice (n = 6) infected with 1×10^4 cells of *Cryptococcus gattii* VGII L27/01 and treated or not with *Saccharomyces boulardii* (Sb) (A), *Lactobacillus paracasei* ST-11 (Lp) (B), and *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), administered intragastrically (i.g.) (C) or intranasally (i.n.) (D), combined or not with fluconazole (FCZ). CTL: control group (non-treated); d.b.i: days before infection, d.a.i: days after infection. ***p < 0.0001 statistical differences compared to the CTL group (Log-rank test).

Figure 2. aPDT does not protect C57BL/6 mice against *C. gattii*.

Survival of mice (n = 6) infected with 1×10^4 cells of *Cryptococcus gattii* VGII L27/01 and treated or not with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). The aPDT was performed with TBO (20 mM) as photosensitizer (PS), intravenously, and LED irradiation for 2 minutes (LED: 2 min) or 30 seconds (LED: 30 s) (20 minutes after PS administration). (A) Schematic representation of the LED cluster used for light irradiation, where each gray circle represents one LED lamp. The mice were always placed in the sector 5 of the equipment for minimum variation of power (210-190 mW in this sector). Mice were treated with aPDT in intervals of 72 hours (B); 7 days (C); and 7 days associated with fluconazole (FCZ) (10 mg/kg/day) (D). CTL: control group (non-treated). ***p < 0.0001 statistical differences compared to the CTL group (Log-rank test).

References

- (FAO/WHO), F. and A.O. of the U.N.H.O., 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [WWW Document]. Rep. a Jt. FAO/WHO Work. Gr. Draft. Eval. probiotics food. URL <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Allen, D., Wilson, D., Drew, R., Perfect, J., 2015. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 13, 787–798. doi:10.1586/14787210.2015.1032939
- Baltazar, L.M., Ray, A., Santos, D.A., Cisalpino, P.S., Friedman, A.J., Nosanchuk, J.D., 2015a. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Front. Microbiol.* 6, 202. doi:10.3389/fmicb.2015.00202
- Baltazar L.M., Werneck, S.M.C., Carneiro, H.C.S., Gouveia, L.F., de Paula, T., Byrro, R.M.D., Cunha Júnior, A.S., Soares, B.M., Ferreira, M.V.L., Souza, D., Pinotti, M., Cisalpino, P.S., Santos, D.A., 2015b. Photodynamic therapy efficiently controls dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in a murine model. *Br. J. Dermatol.* 172, 801–804. doi:10.1111/bjd.13494
- Bastos, R.W., Pedroso, S.H.S.P., Vieira, A.T., Moreira, L.M.C., França, C.S., Cartelle, C.T., Arantes, R.M.E., Generoso, S. V, Cardoso, V.N., Neves, M.J., Nicoli, J.R., Martins, F.S., 2016. *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. *Benef. Microbes* 7, 549–557. doi:10.3920/BM2015.0190
- Benyacoub, J., Bosco, N., Blanchard, C., Demont, A., Philippe, D., Castiel-Higounenc, I., Guéniche, A., 2014. Immune modulation property of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 (ST11) strain and impact on skin defences. *Benef. Microbes* 5, 129–136.

doi:10.3920/BM2013.0014

- Bing Zhai, X.L., 2011. Recent Progress on Antifungal Drug Development. *Curr. Pharm. Biotechnol.* doi:http://dx.doi.org/10.2174/138920111796117292
- Carpenter, B., Situ, X., Scholle, F., Bartelmess, J., Weare, W., Ghiladi, R., 2015. Antiviral, Antifungal and Antibacterial Activities of a BODIPY-Based Photosensitizer. *Molecules* 20, 10604–10621. doi:10.3390/molecules200610604
- Chen, S.C.-A., Meyer, W., Sorrell, T.C., 2014. *Cryptococcus gattii* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 980–1024. doi:10.1128/CMR.00126-13
- Chen, Y.-C., Chang, T.-Y., Liu, J.-W., Chen, F.-J., Chien, C.-C., Lee, C.-H., Lu, C.-H., 2015. Increasing trend of fluconazole-non-susceptible *Cryptococcus neoformans* in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. *BMC Infect. Dis.* 15, 277. doi:10.1186/s12879-015-1023-8
- Costa, M.C., Santos, J.R.A., Ribeiro, M.J.A., Freitas, G.J.C. de, Bastos, R.W., Ferreira, G.F., Miranda, A.S., Arifa, R.D.N., Santos, P.C., Martins, F. dos S., Paixão, T.A., Teixeira, A.L., Souza, D.G., Santos, D.A., 2016. The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 187–195. doi:10.1016/j.ijmm.2016.03.010
- Dai, T., Fuchs, B.B., Coleman, J.J., Prates, R.A., Astrakas, C., St. Denis, T.G., Ribeiro, M.S., Mylonakis, E., Hamblin, M.R., Tegos, G.P., 2012. Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform. *Front. Microbiol.* 3, 120. doi:10.3389/fmicb.2012.00120
- Donnelly, R.F., McCarron, P.A., Tunney, M.M., 2008. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol. Res.* 163, 1–12. doi:10.1016/j.micres.2007.08.001
- Fontes, A.C.L., Bretas Oliveira, D., Santos, J.R.A., Carneiro, H.C.S., Ribeiro, N. de Q., Oliveira, L.V.N. de, Barcellos, V.A., Paixão, T.A., Abrahão, J.S., Resende-

- Stoianoff, M.A., Vainstein, M.H., Santos, D.A., 2016. A subdose of fluconazole alters the virulence of *Cryptococcus gattii* during murine cryptococcosis and modulates type I interferon expression. *Med. Mycol.* 55, 203–212.
- Guslandi, M., Giollo, P., Testoni, P.A., 2003. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 697–698.
- Hochter, W., Chase, D., Hagenhoff, G., 1990. *Saccharomyces boulardii* in acute adult diarrhea: efficacy and tolerability of treatment. *Munch Med Wschr.* 132,188-192.
- Jane E. Sykes, Greg Hodge, Anil Singapuri, Mai Lee Yang, Angie Gelli, George R. Thompson, I., 2016. In vivo development of fluconazole resistance in serial *Cryptococcus gattii* isolates from a cat. *Med. Mycol.* doi:doi:10.1093/mmy/myw104
- Justino, P.F.C., Melo, L.F.M., Nogueira, A.F., Costa, J.V.G., Silva, L.M.N., Santos, C.M., Mendes, W.O., Costa, M.R., Franco, A.X., Lima, A.A., Ribeiro, R.A., Souza, M.H.L.P., Soares, P.M.G., 2014. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Br. J. Nutr.* 111, 1611–1621. doi:DOI: 10.1017/S0007114513004248
- Kelesidis, T., Pothoulakis, C., 2012. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 5, 111–125. doi:10.1177/1756283X11428502
- LeBlanc, J.G., Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L.G., Courau, S., Langella, P., 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb. Cell Fact.* 16, 79. doi:10.1186/s12934-017-0691-z
- Lester, S.J., Malik, R., Bartlett, K.H., Duncan, C.G., 2011. Cryptococcosis: update and

- emergence of *Cryptococcus gattii*. *Vet. Clin. Pathol.* 40, 4–17. doi:10.1111/j.1939-165X.2010.00281.x
- Liang, Y.I., Lu, L.-M., Chen, Y., Lin, Y.-K., 2016. Photodynamic therapy as an antifungal treatment. *Exp. Ther. Med.* 12, 23–27. doi:10.3892/etm.2016.3336
- Mansour-Ghanaei, F., Dehbashi, N., Yazdanparast, K., Shafaghi, A., 2003. Efficacy of *saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. *World J. Gastroenterol.* 9, 1832–1833. doi:10.3748/wjg.v9.i8.1832
- Martins, F.S., Silva, A.A., Vieira, A.T., Barbosa, F.H.F., ARANTES, R.M.E., Teixeira, M.M., Nicoli, J. R., 2009. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Archives of Microbiology* 191, 623-630.
- Martins, F.S., Dalmaso, G., Arantes, R.M.E., Doye, A., Lemichez, E., Lagadec, P., Imbert, V., Peyron, J.-F., Rampal, P., Nicoli, J.R., Czerucka, D., 2010. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Protects Mice and Modifies T84 Cell Response to the Infection. *PLoS One* 5, e8925.
- McFarland, L. V, 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* 16, 2202–2222. doi:10.3748/wjg.v16.i18.2202
- Mima, E.G. de O., Pavarina, A.C., Dovigo, L.N., Vergani, C.E., Costa, C.A. de S., Kurachi, C., Bagnato, V.S., 2010. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* 109, 392–401. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.10.006
- Nascimento, C.L., Ribeiro, M.S., Sellera, F.P., Dutra, G.H.P., Simões, A., Teixeira,

- C.R., 2015. Comparative study between photodynamic and antibiotic therapies for treatment of footpad dermatitis (bumblefoot) in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 12, 36–44. doi:10.1016/j.pdpdt.2014.12.012
- Perfect, J.R., Bicanic, T., 2015. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genet. Biol.* 78, 49–54. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.003
- Prates, R.A., Fuchs, B.B., Mizuno, K., Naqvi, Q., Kato, I.T., Ribeiro, M.S., Mylonakis, E., Tegos, G.P., Hamblin, M.R., 2013. Effect of Virulence Factors on the Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* 8, e54387. doi:10.1371/journal.pone.0054387
- Segers, M.E., Lebeer, S., 2014. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microb. Cell Fact.* 13, S7–S7. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S7
- Sellera, F.P., Sabino, C.P., Ribeiro, M.S., Gargano, R.G., Benites, N.R., Melville, P.A., Pogliani, F.C., 2016. In vitro photoinactivation of bovine mastitis related pathogens. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 13, 276–281. doi:10.1016/j.pdpdt.2015.08.007
- Sherwani, M.A., Tufail, S., Khan, A.A., Owais, M., 2015. Gold Nanoparticle-Photosensitizer Conjugate Based Photodynamic Inactivation of Biofilm Producing Cells: Potential for Treatment of *C. albicans* Infection in BALB/c Mice. *PLoS One* 10, e0131684. doi:10.1371/journal.pone.0131684
- Sionov, E., Chang, Y.C., Garraffo, H.M., Kwon-Chung, K.J., 2009. Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Is Intrinsic and Associated with Virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2804–2815.

doi:10.1128/AAC.00295-09

Smith, K.D., Achan, B., Hullsiek, K.H., McDonald, T.R., Okagaki, L.H., Alhadab, A.A., Akampurira, A., Rhein, J.R., Meya, D.B., Boulware, D.R., Nielsen, K., 2015. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7197–7204. doi:10.1128/AAC.01299-15

Soares, B.M., Alves, O.A., Ferreira, M.V.L., Amorim, J.C.F., Sousa, G.R., de Barros Silveira, L., Prates, R.A., Ávila, T.V., de Matos Baltazar, L., da Glória de Souza, D., Santos, D.A., Modolo, L.V., Cisalpino, P.S., Pinotti, M., 2011. *Cryptococcus gattii*: In Vitro Susceptibility to Photodynamic Inactivation. *Photochem. Photobiol.* 87, 357–364. doi:10.1111/j.1751-1097.2010.00868.x

Trompette, A., Gollwitzer, E.S., Yadava, K., Sichelstiel, A.K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L.P., Harris, N.L., Marsland, B.J., 2014. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* 20, 159–166.

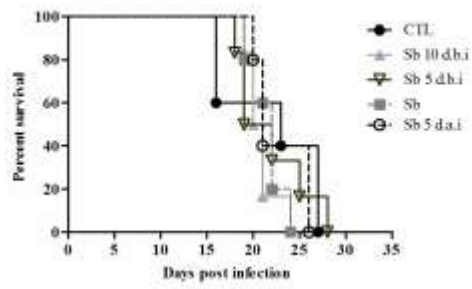
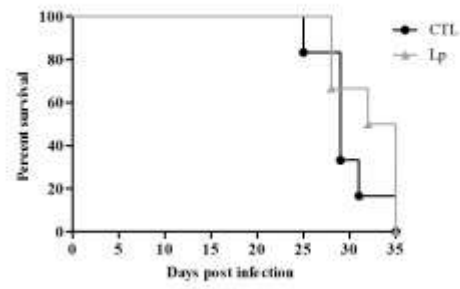
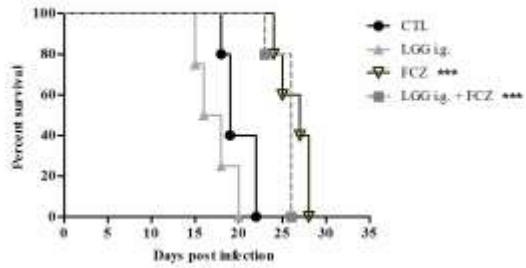
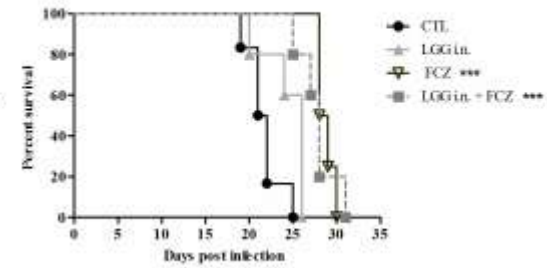
Varma, A., Kwon-Chung, K.J., 2010. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2303–2311. doi:10.1128/AAC.00153-10

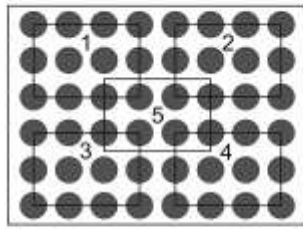
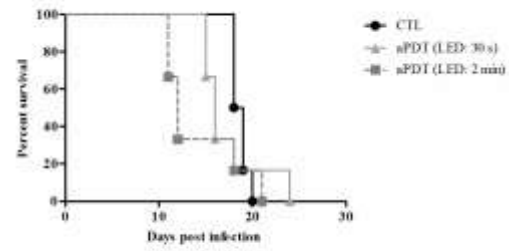
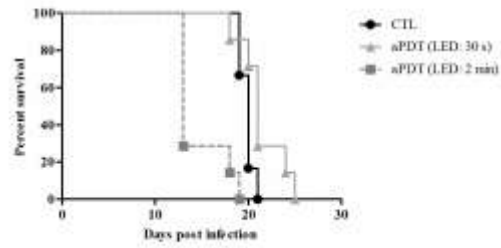
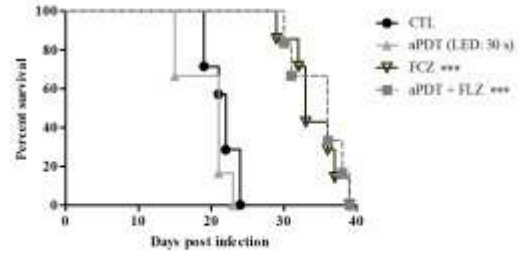
Vieira, A.T., Rocha, V.M., Tavares, L., Garcia, C.C., Teixeira, M.M., Oliveira, S.C., Cassali, G.D., Gamba, C., Martins, F.S., Nicoli, J.R., 2016. Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 51A. *Microbes Infect.* 18, 180–189. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2015.10.008

Villena, J., Oliveira, M.L.S., Ferreira, P.C.D., Salva, S., Alvarez, S., 2011. Lactic acid bacteria in the prevention of pneumococcal respiratory infection: Future

opportunities and challenges. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1633–1645.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.06.004>

A *Saccharomyces boulardii* (Sb)**B** *Lactobacillus paracasei* ST-11 (Lp)**C** *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) i.g.**D** *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) i.n.

A LED Cluster**B aPDT in intervals of 72 hours****C aPDT in intervals of 7 days****D aPDT in intervals of 7 days plus antifungal therapy**

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- Aebi, T; Weisser, M; Bucher, E; Hirsch, HH; Marsch, S; Siegemund, M. **Co-infection of Influenza B and Streptococci causing severe pneumonia and septic shock in healthy women.** BMC Infectious Diseases, v.10, p.308. 2010.
- Almeida, F.; Wolf, J.M.; Casadevall, A. **Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*.** Eukaryot Cell, v. 14, n. 12, p. 1173-85. 2015.
- Alshabani K, Haq A, Miyakawa R, Palla M, Soubani AO. **Invasive pulmonary aspergillosis in patients with influenza infection: report of two cases and systematic review of the literature.** Expert Rev Respir Med., v. 9, n. 1, p. 89-96. 2015.
- Arias, CF; Escalera-Zamudio, M; Rfo, MDS; Cobián-Güemes, AG; Isa, P; Lopez, S. **Molecular Anatomy of 2009 Influenza Virus A (H1N1).** Archives of Medical Research, v. 40, n. 8 , 643 – 654. 2009.
- Arimori, Y., Nakamura, R., Yamada, H., Shibata, K., Maeda, N., Kase, T., Yoshikai, Y., 2013. **Type I interferon limits influenza virus-induced acute lung injury by regulation of excessive inflammation in mice.** Antivir. Res, v. 99, p. 230–237.
- Arranz, R.; Coloma, R.; Chichón, F.J.; Conesa, J.J.; Carrascosa, J.L.; Valpuesta, J.M.; Ortín, J.; Martín-Benito, J. **The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins.** Science, v. 338, n. 6114, p. 1634-1637. 2012.
- Ayala, V.I., Teijaro, J.R., Farber, D.L., Dorsey, S.G., Carbonetti, N.H.. **Bordetella pertussis infection exacerbates influenza virus infection through pertussis toxin-mediated suppression of innate immunity.** PLoS One 6, e19016. 2011.
- Bailey, P.J., **Sponge implants as models.** Methods Enzymol., v. 162, p. 327–334. 1988.
- Barbosa, R.P., Salgado, A.P., Garcia, C.C., Filho, B.G., Gonçalves, A.P., Lima, B.H., Lopes, G.A., Rachid, M.A., Peixoto, A.C., de Oliveira, D.B., Ataíde, M.A., Zirke, C.A., Cotrim, T.M., Costa, E., Almeida, G.M., Russo, R.C., Gazzinelli, R.T., Machado, A.. M.. **Protective immunity and safety of a genetically modified influenza virus vaccine.** PLoS One 9, e98685. 2014.
- Belshe, R.B.; Edwards, K.M.; Vesikari, T.; Black, S.V.; Walker, R.E.; Hultquist, M.; Kemble, G.; Connor, E.M.; CAIV-T Comparative Efficacy Study Group. **Live Attenuated versus Inactivated Influenza Vaccine in Infants and Young Children.** N Engl J Med., v. 356, n. 7, p. 685-96. 2007.
- Blanco, J. L.; Garcia, M. E.. **Immune response to fungal infections.** Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 125, p. 47-70. 2008.
- Blyth, C. C.; Palasathiran, P.; O'Brien, T. A.. **Antifungal Therapy in Children With Invasive Fungal Infections: A Systematic Review.** Pediatrics, v. 119, p. 772–784. 2007.
- Bouvier, N. M., and P. Palese. **The biology of influenza viruses.** Vaccine 26 Suppl 4:D49-53. 2008.
- Bovers, M.; Hagen, F.; Boekhout, T.. **Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex.** Revista Iberoamericana de Micología, v. 25, n. 1, p. S4-S12. 2008.
- Brown, S. M.; Campbell, L. T.; Lodge, J. K.. ***Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress.** Current Opinion in Microbiology, v. 10, p. 320–325. 2007.
- Brunke, S.; Hube, B.. **Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies.** Cellular Microbiology, v. 15, n. 5, p. 701-708. 2013.

- Buschke, A. 1895. **Über eine durch Coccidien Hervergerufene Krankheit des menschen.** Dtsch. Med. Wochenschr, v.21, p.14. 1895.
- Busse, O. 1894. **Über parasita`re zelleinschlu`sse und ihre zu`chtung.** Zentralbl. Bakteriolog, v. 16, p.175–180. 1894.
- Butts, A.; DiDone, L.; Koselny, K.; Baxter, B. K.; Rosello, Y. C.; Wellington, M.; Krysan, D. J. **A Repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis.** Eukaryotic Cell, v. 12, n. 2, p. 278-287. 2013.
- Byrnes III, E. J.; Bartlett, K. H.; Perfect, J. R.; Heitman, J.. **Cryptococcus gattii: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals.** Microbes and Infection, v. 13, p. 895-907. 2011.
- Carneiro, M.; Trench, F.J.P.; Waib, L.F.; Pedro, F.L.; Motta, F. **H1N1 Influenza 2009: review of the first pandemic of the XXI century.** Revista da AMRIGS, v. 54, n. 2, p. 206-213. 2010.
- Casalnuovo, I. A.; Di Francesco, P.; Garaci, E.. **Fluconazole resistance in Candida albicans: a review of mechanism.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences, v. 8, n. 2, p. 69-77. 2004.
- Cauley, LS; Vella, AT. **Why is co-infection with influenza virus and bacteria so difficult to control?** Discov Med. V.19, n.102, p. 33–40. 2015.
- Chaturvedi, V.; Chaturvedi, S.. **Cryptococcus gattii: A resurgent fungal pathogen.** Trends in Microbiology, v. 19, n. 11, p. 564-570. 2011.
- Chayakulkeeree, M.; Perfect, J. R.. **Cryptococcosis.** Infectious Diseases Clinical of North American, v. 20, p. 507–544. 2006.
- Chen, S. C-A.; Playford, E. G.; Sorrell, T. C.. **Antifungal therapy ininvasive fungal infections.** Current Opinion in Pharmacology, v. 10, p. 1–9. 2010.
- Chen, S. C-A.; Slavin, M. A.; Heath, C. H.; Playford, E. G.; Byth, K.; et al. **Clinical manifestations of Cryptococcus gattii infection: determinants of neurological sequelae and death.** Clin Infect Dis, v. 55, n. 6, p. 789–798. 2012.
- Chen, S.; Sorrell, T. C.; Nimmo, G.; Speed, B.; Currie, B.; Ellis, D.; Marriott, D.; Pfeiffer, T.; Parr, D.; Byth, K.. **Epidemiology and Host- and Variety-Dependent Characteristics of Infection Due to Cryptococcus neoformans in Australia and New Zealand.** Clinical Infectious Diseases, v. 31, p. 499–508. 2000.
- Chen, SCA; Meyer, W; Sorrell TC. **Cryptococcus gattii Infections.** Clin. Microbiol. Rev., v. 27, n. 4, p. 980-1024. 2014.
- Coelho C; Bocca A; Casadevall A. **The intracelular life of Cryptococcus neoformans.** Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 9:219–38, 2013.
- Cogliati, M., D’Amicis, R., Zani, A., Montagna, M.T., Caggiano, G., De Giglio, O., Balbino, S., De Donno, A., Serio, F., Susever, S., Ergin, C., Velegraki, A., Ellabib, M.S., Nardoni, S., Macci, C., Oliveri, S., Trovato, L., Dipineto, L., Rickerts, V., McCormick-Smith, I., Akcaglar, S., Tore, O., Mlinaric-Missoni, E., Bertout, S., Mallié, M., Martins, M. da L., Vencà, A.C.F., Vieira, M.L., Sampaio, A.C., Pereira, C., Criseo, G., Romeo, O., Ranque, S., Al-Yasiri, M.H.Y., Kaya, M., Cerikcioglu, N., Marchese, A., Vezzulli, L., Ilkit, M., Desnos-Ollivier, M., Pasquale, V., Korem, M., Polacheck, I., Scopa, A., Meyer, W., Ferreira-Paim, K., Hagen, F., Theelen, B., Boekhout, T., Lockhart, S.R., Tintelnot, K., Tortorano, A.M., Dromer, F., Varma, A., Kwon-Chung, K.J., Inácio, J., Alonso, B., Colom, M.F.. **Environmental distribution of Cryptococcus neoformans and C. gattii around the Mediterranean basin.** FEMS Yeast Res. v. 16, fow086-fow086. 2016.
- Cogliati, M.. **Global Molecular Epidemiology of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii: An Atlas of the Molecular Types.** Scientifica, v. 2013, p. 1-23. 2013.

Corrêa, M. P. S. C.; Oliveira, E. C.; Duarte, R. R. B. S.; Pardal, P. P. O.; Oliveira, F. M.; Severo, L. C.. **Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasil, v. 32, n. 5, p. 505-508, 1999.

Costa, M.C., Santos, J.R.A., Ribeiro, M.J.A., Freitas, G.J.C. de, Bastos, R.W., Ferreira, G.F., Miranda, A.S., Arifa, R.D.N., Santos, P.C., Martins, F. dos S., Paixão, T.A., Teixeira, A.L., Souza, D.G., Santos, D.A.. **The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*.** Int. J. Med. Microbiol. v. 306, p. 187–195. 2016.

Costa, V. V, Fagundes, C.T., Valadão, D.F., Ávila, T. V, Cisalpino, D., Rocha, R.F., Ribeiro, L.S., Ascenção, F.R., Kangussu, L.M., Celso, M.Q., Astigarraga, R.G., Gouveia, F.L., Silva, T.A., Bonaventura, D., Sampaio, D. A., Leite, A.C., Teixeira, M.M., Souza, D.G.. **Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice.** Med Microbiol Immunol, v. 203, p. 231–250. 2014.

Coughlan, L.; Lambe, T. **Measuring Cellular Immunity to Influenza: Methods of Detection, Applications and Challenges.** Vaccines (Basel), v. 3, n. 2, p. 293-319. 2015.

Coulombe, F.; Jaworska, J.; Verway, M.; Tzelepis, F.; Massoud, A.; Gillard, J.; Wong, G.; Kobinger, G.; Xing, Z.; Couture, C.; Joubert, P.; Fritz, J.H.; Powell, W.S.; Divangahi, M.. **Targeted Prostaglandin E2 Inhibition Enhances Antiviral Immunity through Induction of Type I Interferon and Apoptosis in Macrophages.** Immunity, v. 40, p. 554–568. 2014.

Crum-Cianflone, N.F.. **Invasive Aspergillosis Associated With Severe Influenza Infections.** Open Forum Infect. Dis., v 3, ofw171-ofw171. 2016.

Datta, K.; Bartlett, K. H.; Marr, K. A.. ***Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche.** Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, v. 2009, n. 176532, p. 1-8. 2009.

Davis, M.J., Eastman, A.J., Qiu, Y., Gregorka, B., Kozel, T.R., Osterholzer, J.J., Curtis, J.L., Swanson, J.A., Olszewski, M.A.. ***Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence.** J Immunol, v. 194, p. 2219–2231. 2015.

Davis, M.J., Tsang, T.M., Qiu, Y., Dayrit, J.K., Freij, J.B., Huffnagle, G.B., Olszewski, M.A.. **Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection.** MBio, v. 4, p. e00264-13. 2013.

Del Poeta, M.; Casadevall, A.. **Ten Challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis.** Mycopathologia, v. 173, p. 303–310. 2012.

Del Valle, L.; Pina-Oviedo, S.. **HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis.** Frontiers in Bioscience, v. 11, p. 718–32, 2006.

Engelthaler, D. M., Hicks, N. D., Gillece, J. D., et al. ***Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: Whole-Population Genome Analysis Provides Insights into Species Evolution and Dispersal.** Mbio.asm.org., v. 5. 2014.

Fagundes, C. T.; Amaral, F. A.; Vieira, A. T.; Soares, A. C.; Pinho, V.; Nicoli, J. R.; Vieira, L. Q.; Teixeira, M. M.; Souza, D. G.. **Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice.** The Journal of Immunology, v. 188, p. 1411-1420. 2012.

Fang, F.C.. **Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies.** Nature reviews, v. 2, p. 820-832. 2004.

Ferreira, G. F.; Baltazar, L. M.; Santos, J. R.; Monteiro, A. S.; Fraga, L. A.; Resende-Stoianoff, M. A.; Santos, D. A.. **The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 68, n. 8, p. 1801-11. 2013.

- Ferreira, G.F., Santos, J.R.A., Costa, M. C., et al. **Heteroresistance to itraconazole alters the morphology and increases the virulence of *Cryptococcus gattii***. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, n. 8. 2015.
- Ferreira, M. C.; Brito, V. N.; Gameiro, J.; Costa, M. R.; Vasconcellos, E. C.; Cruz-Hofling, M. A.; Verinaud, L.. **Effects of HeNe laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions**. *J Photochem Photobiol B*, v. 84, n. 2, p. 141-9. 2006.
- Fica, A. C.. **Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas primeira parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol**. *Revista Chilena de Infectología*, v. 21, p. 26-38. 2004.
- Flesch, I.E., Schwamberger, G., Kaufmann, S.H.. **Fungicidal activity of IFN-gamma-activated macrophages. Extracellular killing of *Cryptococcus neoformans***. *J Immunol*, v. 142, p. 3219–3224. 1989.
- Francis, T., Salk, J. E., Pearson, H. E. & Brown, P. N. **Protective effect of vaccination against induced influenza A**. *J. Clin. Invest.*, v. 24, p. 536–546. 1945.
- Franco-Paredes, C.; Womack, T.; Bohlmeier, T.; Sellers, B.; Hays, A.; Patel, K.; Lizarazo, J.; Lockhart, S.R.; Siddiqui, W.; Marr, K.A. **Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis**. *Lancet Infect Dis.*, v. 15, n. 3, p. 348-55. 2015.
- Frases, S., Pontes, B., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L., Viana, N.B., Casadevall, A.. **The elastic properties of the *Cryptococcus neoformans* capsule**. *Biophys J*, v. 97, p. 937–945. 2009.
- Full, F.; Gack, M. U. **Prostaglandin E2: the Villain in the Host Response to Influenza Virus**. *Immunity*, v. 40, p. 453-454.
- Garcia CC, Weston-Davies W, Russo RC, Tavares LP, Rachid MA, et al. **Complement C5 Activation during Influenza A Infection in Mice Contributes to Neutrophil Recruitment and Lung Injury**. *PLoS ONE* 8(5): e64443. 2013.
- Girard, M. P.; Tam, J. S.; Assossou, O. M.; Kieny, M.P.. **The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review**. *Vaccine*, v. 28, p. 4895–4902. 2010.
- Groll, A. H.; Kolve, H.. **Antifungal agents: *in vitro* susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy**. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 23, p. 256–270. 2004.
- Gupta, A., Capoor, M.R., Gupta, S., Sachdeva, H.C.. **Concomitant Infections of Influenza A H1N1 and Disseminated Cryptococcosis in an HIV Seropositive Patient**. *J Lab Physicians*, v. 7, p. 134–136. 2015.
- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., Falk, R., Parnmen, S., Lumbsch, H.T., Boekhout, T.. **Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii* / *Cryptococcus neoformans* species complex**. *Fungal Genet. Biol.*, v. 78, p. 16–48. 2015.
- Hagen, F., Lumbsch, H.T., Arsic Arsenijevic, V., Badali, H., Bertout, S., Billmyre, R.B., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J., Carbia, M., Chakrabarti, A., Chaturvedi, S., Chaturvedi, V., Chen, M., Chowdhary, A., Colom, M.-F., Cornely, O.A., Crous, P.W., Cuétara, M.S., Diaz, M.R., Espinel-Ingroff, A., Fakhim, H., Falk, R., Fang, W., Herkert, P.F., Ferrer Rodríguez, C., Fraser, J.A., Gené, J., Guarro, J., Idnurm, A., Illnait-Zaragozi, M.-T., Khan, Z., Khayhan, K., Kolecka, A., Kurtzman, C.P., Lagrou, K., Liao, W., Linares, C., Meis, J.F., Nielsen, K., Nyazika, T.K., Pan, W., Pekmezovic, M., Polacheck, I., Posteraro, B., de Queiroz Telles, F., Romeo, O., Sánchez, M., Sampaio, A., Sanguinetti, M., Sriburee, P., Sugita, T., Taj-Aldeen, S.J., Takashima, M., Taylor, J.W., Theelen, B., Tomazin, R., Verweij, P.E., Wahyuningsih, R., Wang, P., Boekhout, T.. **Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus**. *mSphere*, v. 2, n. 4 2017.
- Hammer, C.; Begemann, M.; McLaren, P.J.; Bartha, I.; Michel, A.; Klose, B.; Schmitt, C.; Waterboer, T.; Pawlita, M.; Schulz, T.F.; Ehrenreich, H.; Fellay, J. **Amino Acid Variation in HLA Class II Proteins Is a Major Determinant of Humoral Response to Common Viruses**. *Am J Hum Genet.*, v. 97, n. 5, p. 738-43. 2015.

- Hansemann, DV. **Über eine bisher nicht beobachtete Gehirner Krankheit durch Hefen.** Verh. Dtsch. Ges. Pathol, v.9, p.21–24. 1905.
- Hardison, S. E.; Herrera, G.; Young, M. L.; Hole, C. R.; Wozniak, K. L.; Wormley Jr., F. L.. **Protective Immunity against Pulmonary Cryptococcosis Is Associated with STAT1-Mediated Classical Macrophage Activation.** The Journal of Immunology, v. 189, p. 4060–4068. 2012.
- Hardison, S.E., Ravi, S., Wozniak, K.L., Young, M.L., Olszewski, M.A., Wormley, F.L. **Pulmonary infection with an interferon-gamma-producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection.** Am J Pathol, v. 176, p. 774–785. 2010.
- Hasejima, N.; Yamato, K.; Takezawa, S.; Kobayashi, H.; Kadoyama, C. **Invasive pulmonary aspergillosis associated with influenza B.** Respiriology, v. 10, n. 1, p. 116-9. 2005.
- Herold S, Ludwig S, Pleschka S, Wolff T. **Apoptosis signaling in influenza virus propagation, innate host defense, and lung injury.** J Leukoc Biol., v. 92, n. 1, p. 75-82. 2012.
- Hoang, L. M. N.; Philips, P.; Galanis, E.. ***Cryptococcus gattii*: a Review of the Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Management of This Endemic Yeast in the Pacific Northwest.** Clinical Microbiology Newsletter, v. 33, n. 24, p. 187-195. 2011.
- Hosseinnezhad A, Rapose A. **Cryptococcal meningoencephalitis after H1N1 influenza.** BMJ Case Reports, 1-3. 2012.
- Jamieson, AM; Lesley Paskan, L; Shuang Yu, S; Gamradt, P; Homer, RJ; Decker, T; Medzhitov, R. **Role of Tissue Protection in Lethal Respiratory Viral-Bacterial Coinfection.** Science v. 340, p. 1230-34. 2013.
- Janeway, C. A. Jr. **How the immune system protects the host from infection.** Microbes Infect., v. 3, p. 1167-71. 2001.
- Jarvis, J. N.; Casazza, J. P.; Stone, H. H.; Meintjes, G.; Lawn, S. D.; Levitz, S. M.; Harrison, T. S.; Koup, R. A.. **The phenotype of the *Cryptococcus*-specific CD4+ memory T-cell response is associated with disease severity and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis.** Journal of Infectious Diseases, v. 207, n. 12, p. 1817–28. 2013.
- Jin, H.; Subbarao, K. **Live attenuated influenza vaccine.** Curr. Top. Microbiol. Immunol., v. 386, p. 181–204. 2014.
- Johnston, S. A.; May, R. C. **Cryptococcus interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen.** Cellular Microbiology, v. 15, n. 3, p. 403–411. 2013.
- Kash JC, et al. **Lethal synergism of 2009 pandemic H1N1 influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* coinfection is associated with loss of murine lung repair responses.** mBio v. 2, n. 5, p. e00172-11. 2011.
- Kash, J.C., Walters, K.A., Davis, A.S., Sandouk, A., Schwartzman, L.M., Jagger, B.W., Chertow, D.S., Li, Q., Kuestner, R.E., Ozinsky, A., Taubenberger, J.K.. **Lethal synergism of 2009 pandemic H1N1 influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* coinfection is associated with loss of murine lung repair responses.** MBio, v. 2. 2011.
- Kawakami, K., Kohno, S., Kadota, J., Tohyama, M., Teruya, K., Kudaken, N., Saito, A., Hara, K.. **T cell-dependent activation of macrophages and enhancement of their phagocytic activity in the lungs of mice inoculated with heat-killed *Cryptococcus neoformans*: involvement of IFN-gamma and its protective effect against cryptococcal infection.** Microbiol Immunol 39, 135–143. 1995.
- Kidd, S. E.; Hagen, F.; Tschärke, R. L.; Huynh, M.; Bartle, K. H.; Fyfe, M.; Macdougall, L.; Boekhout, T.; Kwon-Chung, K. J.; Meyer, W.. **A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada).** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 101, n. 49, p. 17258–17263. 2004.

- Kozel, T. R.. **Virulence factors of *Cryptococcus neoformans***. Trends in Microbiology, v. 3, n. 8, p. 295-299. 1995.
- Krammer, F; Palese, P. **Advances in the development of influenza virus vaccines**. Nature Reviews, Drug Discovery. v. 14, p. 167-182. 2015.
- Kronstad, J. W.; Attarian, R.; Cadieux, B.; Choi, J.; D'Souza, C. A.; Griffiths, E. J.; Geddes, J. M. H.; Hu, G.; Jung, W. H.; Kretschmer, M.; Saikia, S.; Wang, J.. **Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic Box**. Nature Reviews Microbiology, v. 9, p. 193-203. 2011.
- Kudva, A., Scheller, E. V, Robinson, K.M., Crowe, C.R., Choi, S.M., Slight, S.R., Khader, S.A., Dubin, P.J., Enelow, R.I., Kolls, J.K., Alcorn, J.F.. **Influenza A Inhibits Th17-Mediated Host Defense against Bacterial Pneumonia in Mice**. J. Immunol., v. 186, p. 1666–1674. 2011.
- Kuiken, T., B. Riteau, R. A. Fouchier, and G. F. Rimmelzwaan. **Pathogenesis of influenza virus infections: the good, the bad and the ugly**. Current opinion in virology 2:276-286. 2012.
- Kwon, O.K.; Lee, M.G.; Kim, H.S.; Park, M.S.; Kwak, K.M.; Park, S.Y. **Invasive Pulmonary Aspergillosis after Influenza A Infection in an Immunocompetent Patient**. Tuberc Respir Dis (Seoul), v. 75, n. 6, p. 260–263. 2013.
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E., Wickes, B.L., Meyer, W., Cuomo, C.A., Wollenburg, K.R., Bicanic, T.A., Castañeda, E., Chang, Y.C., Chen, J., Cogliati, M., Dromer, F., Ellis, D., Filler, S.G., Fisher, M.C., Harrison, T.S., Holland, S.M., Kohno, S., Kronstad, J.W., Lazera, M., Levitz, S.M., Lionakis, M.S., May, R.C., Ngamskulrongroj, P., Pappas, P.G., Perfect, J.R., Rickerts, V., Sorrell, T.C., Walsh, T.J., Williamson, P.R., Xu, J., Zelazny, A.M., Casadevall, A.. **The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis**. mSphere, v. 2, n. 1. 2017.
- Kyei, S.K., Ogbomo, H., Li, S., Timm-McCann, M., Xiang, R.F., Huston, S.M., Ganguly, A., Colarusso, P., Gill, M.J., Mody, C.H.. **Mechanisms by Which Interleukin-12 Corrects Defective NK Cell Anticryptococcal Activity in HIV-Infected Patients**. MBio, v. 7. 2016.
- Lackner, P.; Beer, R.; Heussler, V.; Goebel, G.; Rudzki, D.; Helbok, R.; Tannich, E.; Schmutzhard, E.. **Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria**. Neuropathol Appl Neurobiol, v. 32, n. 1, p. 177–188. 2006.
- Larsen, R. A.; Bauer, M.; Thomas, A. M.; Graybill, J. R.. **Amphotericin B and Fluconazole, a Potent Combination Therapy for Cryptococcal Meningitis**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, n. 3, p. 985–991. 2004.
- Lat A, Bhadelia N, Miko B, Furuya EY, Thompson GR 3rd. **Invasive aspergillosis after pandemic (H1N1) 2009**. Emerg Infect Dis., v. 16, p.971-3. 2010.
- Lester, S. J.; Malik, R.; Bartlett, K. H.; Duncan, C. G.. **Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii***. Veterinary Clinical Pathology, v.40, n. 1, p. 4–17. 2011.
- Lewis, R. E.; Viale, P.; Kontoyiannis, D. P.. **The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida***. Virulence, v. 3, n. 4, p. 368-76. 2012.
- Li, S. S.; Mody, C. H. **Cryptococcus**. Proceedings of The American Thoracic Society, vol. 7, p. 186-196, Oct. 2010.
- Li, S.S., Kyei, S.K., Timm-McCann, M., Ogbomo, H., Jones, G.J., Shi, M., Xiang, R.F., Oykhman, P., Huston, S.M., Islam, A., Gill, M.J., Robbins, S.M., Mody, C.H.. **The NK receptor NKp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients**. Cell Host Microbe, v. 14, p. 387–397. 2013.
- Li, W., Moltedo, B., Moran, T.M.. **Type I Interferon Induction during Influenza Virus Infection Increases Susceptibility to Secondary Streptococcus pneumoniae Infection by Negative Regulation of $\gamma\delta$ T Cells**. J. Virol., v. 86, p. 12304–12312. 2012.

- Lietzén, N.; Ohman, T.; Rintahaka, J.; Julkunen, I.; Aittokallio, T.; Matikainen, S.; Nyman, T. A. **Quantitative Subcellular Proteome and Secretome Profiling of Influenza A Virus-Infected Human Primary Macrophages.** PLoS Pathogens, v. 7, n. 5, p. e1001340. 2011.
- Lin, X.; Heitman, J.. **The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex.** Annual Review Microbiology, v. 60, p. 69–105. 2006.
- Liu X, He Y, Xiao K, White JR, Fusco DN, Papanicolaou GA. **Effect of Linezolid on Clinical Severity and Pulmonary Cytokines in a Murine Model of Influenza A and Staphylococcus aureus Coinfection.** PLoS ONE, v. 8, n. 3, p. e57483. 2013.
- Liu, X., He, Y., Xiao, K., White, J.R., Fusco, D.N., Papanicolaou, G.A.. **Effect of linezolid on clinical severity and pulmonary cytokines in a murine model of influenza A and Staphylococcus aureus coinfection.** PLoS One, v. 8, p. e57483. 2013.
- Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. **Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages.** Curr Biol, v.16, p.2156e60. 2006.
- MA, H. et al. **The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 106, n. 31, p. 12980-12985. 2009.
- Ma, H.; May, R. C.. **Virulence in *Cryptococcus* species.** Advances in Applied Microbiology, v. 67, p. 131-190. 2009.
- Machado, A.A. **How to prevent, recognize and diagnose infection with the swine-origin Influenza A (H1N1) virus in humans.** J Bras Pneumol., v. 35, n. 5, p. 464-469. 2009.
- Machado, P.R.L.; Araújo, M.I.A.S.; Carvalho, L.; Carvalho, E.M. **Immune response mechanisms to infections.** An bras Dermatol, v. 79, n. 6, p. 647-664. 2004.
- Marr, K. A.. ***Cryptococcus gattii* as an important fungal pathogen of western North America.** Expert Rev Anti Infect Ther., v. 10, n. 6, p. 637–643. 2012.
- Martín-Peña, A.; Aguilar-Guisado, M.; Cisneros, J. M.. **Does the current treatment of invasive fungal infection need to be reviewed?** Enferm Infecc Microbiol Clin. Epub ahead of print. 2013.
- Maxeiner, J. H. et al. **A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators.** Nature Protocols, v. 2, p.105-112, 2007.
- McClelland, E. E.; Hobbs, L. M.; Rivera, J.; Casadevall, A.; Potts, W. K.; Smith, J. M.; Ory, J. J.. **The Role of Host Gender in the Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* Infections.** PLoS ONE, v. 8, n. 5, p. e63632. 2013.
- Mendes, F. E. S.; Oliveira, L. V. N.; Faria, E. S.; Alvarenga, D. G.; Pinto, M. R.; Taborda, C. P.; Soares, B. M.; Cisalpino, P. S.; Santos, D. A.. **Correlation of the *in vitro* antifungal drug susceptibility with the *in vivo* activity of fluconazole in a murine model of cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 29, n. 12, p. 1525-32. 2010.
- Mitchell, T. G.; Perfect, J. R.. **Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*.** Clinical Microbiology Reviews, v. 8, n. 4, p. 515-548. 1995.
- Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. **Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness.** J Infect Dis. v.198, n.7, p. 962–970. 2008.
- Mueller-Loebnitz, C.; Ostermann, H.; Franzke, A.; Loeffler, J.; Uharek, L.; Topp, M.; Einsele, H.. **Immunological aspects of *Candida* and *Aspergillus* systemic fungal infections.** Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, v. 2013, n. 102934, p. 1-7. 2013.

- Negroni, R.. **Cryptococcosis**. Clinics in Dermatology, v. 30, p. 599–609. 2012.
- Neumann, G.; Noda, T.; Kawaoka, Y. **Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus**. Nature, v. 459, p. 931-939. 2009.
- Nguyen, K.B., Cousens, L.P., Doughty, L.A., Pien, G.C., Durbin, J.E., Biron, C.A.. **Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox**. Nat Immunol, v. 1, p. 70–76. 2000.
- Nicoll, A.; Ciancio, B.; Kramarz, P.; Influenza Project Team. **Observed oseltamivir resistance in seasonal influenza viruses in Europe interpretation and potential implications**. Euro Surveill., v. 13, n. 5, p. 8025. 2008.
- Nishikawa, M. M.; Lazera, M. S.; Barbosa, G. G.; Trilles, L.; Balassiano, B. R.; Macedo, R. C. L.; Bezerra, C. C. F.; Pérez, M. A.; Cardarelli, P.; Wanke, B.. **Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns**. Journal of Clinical Microbiology, v. 41, n. 1, p. 73–77. 2003.
- Nooney, L.; Matthews, R. C.; Burnie, J. P.. **Evaluation of Mycograb, amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies**. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 51, p. 19-29. 2005.
- Nosanchuk, J. D.; Stark, R. E.; Casadevall, A. **Fungal Melanin: What do We Know About Structure?** Frontiers Microbiol., v. 22, n. 6, p. 1463. 2015.
- Nosanchuk, J.D., Cleare, W., Franzot, S.P., Casadevall, A.. **Amphotericin B and Fluconazole Affect Cellular Charge, Macrophage Phagocytosis, and Cellular Morphology of *Cryptococcus neoformans* at Subinhibitory Concentrations**. Antimicrob. Agents Chemother., v. 43, p. 233–239. 1999.
- Nulens, E.F.L., Bourgeois, M.J.C., Reynders, M.B.M.L.. **Post-influenza aspergillosis, do not underestimate influenza B**. Infect. Drug Resist., v. 10, p. 61–67. 2017.
- Ohradanova-Repic A, Machacek C, Fischer MB, Stockinger H. **Differentiation of human monocytes and derived subsets of macrophages and dendritic cells by the HLDA10 monoclonal antibody panel**. Clinical & Translational Immunology., v. 5, n. 1, p. e55. 2016.
- Okagaki, L.H., Strain, A.K., Nielsen, J.N., Charlier, C., Baltes, N.J., Heitman, J.. **Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity**. PLoS Pathog, v. 6, n. 6, p. e1000953. 2010.
- O'Meara, T. R.; Holmer, S. M.; Selvig, K.; Dietrich, F.; Alspaugh, J. A.. ***Cryptococcus neoformans* Rim101 is associated with cell wall remodeling and evasion of the host immune responses**. MBio., v. 4, n. 1, p. e00522-12. 2013.
- Pammi, M.. (2012) **Treatment of Candida infection in neonates**. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-candida-infection-in-neonates>> Acesso em: julho de 2013.
- Pan, W., Dong, Z., Li, F., Meng, W., Feng, L., Niu, X., Li, C., Luo, Q., Li, Z., Sun, C., Chen, L.. **Visualizing influenza virus infection in living mice**. Nat Commun, v. 4, p. 2369. 2013.
- Panackal, A.A., Wuest, S.C., Lin, Y., Wu, T., Zhang, N., Kosa, P., Komori, M., Blake, A., Browne, S.K., Rosen, L.B., Hagen, F., Meis, J., Levitz, S.M., Quezado, M., Hammoud, D., Bennett, J.E., Bielekova, B., Williamson, P.R.. **Paradoxical Immune Responses in Non-HIV Cryptococcal Meningitis**. Plos Pathog., v. 11, n. 5, p. e1004884. 2015.
- Pappalardo, M. C. S. M.; Melhem, M. S. C.. **Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 45, n. 6, p. 299-305. 2003.
- Pasman, L. **The Complication of Coinfection**. Yale J Biol Med., v. 85, n. 1, p. 127–132. 2012.

- Pedroso VSP, Vilela MC, Santos PC, Cisalpino OS, Arantes RME, et al. **Development of a murine model of neuroparacoccidioidomycosis.** J Neuroparasitology, v. 1, p. 39–44. 2010.
- Perfect, J. R. **The Impact of the Host on Fungal Infections.** The American Journal of Medicine, v.125, p. 39–51. 2012.
- Perfect, J. R.; Durack, D. T.. **Penetration of imidazoles and triazoles into cerebrospinal fluid of rabbits.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 16, p. 81-86. 1985.
- Pessoa, C. C. B.; Silva, S. H. M.; Gomes, F. S.; **Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil.** Revista Pan-Amaz Saúde, v. 3, n. 2, p.59-65. 2012.
- Pinsent, A.; Fraser, C.; Ferguson, N. M.; Riley, S. **A systematic review of reported reassortant viral lineages of influenza A.** BMC Infect Dis., v. 16, n. 3, p. 1-13. 2016.
- Pittet, L.A., Hall-Stoodley, L., Rutkowski, M.R., Harmsen, A.G.. **Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*.** Am J Respir Cell Mol Biol, v. 42, p. 450–460. 2010.
- Proia, L. A.. **New Antifungal Therapies.** Clin Microbiology Newsletter; v. 28, p. 169-173. 2006.
- Pulli, B., Ali, M., Forghani, R., Schob, S., Hsieh, K.L.C., Wojtkiewicz, G., Linnoila, J.J., Chen, J.W.. **Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples.** PLoS One, v. 8, p. e67976. 2013.
- Pybus OG, Tatem AJ, Lemey P. **Virus evolution and transmission in an ever more connected world.** Proc Biol Sci., v. 282, p. 1821. 2015.
- Rajasingham, R., Smith, R.M., Park, B.J., Jarvis, J.N., Govender, N.P., Chiller, T.M., Denning, D.W., Loyse, A., Boulware, D.R.. **Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis.** Lancet Infect. Dis., v. 17, p. 873–881. 2017.
- Ramirez-Ortiz, Z. G.; Means, T. K.. **The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*).** Virulence, v. 3, n. 7, p. 635-46. 2012.
- Randall, R.E., Goodbourn, S.. **Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures.** J Gen Virol, v. 89, p. 1–47. 2008.
- Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. **Dose translation from animal to human studies revisited.** FASEB J., v. 22, n. 3, p. 659-61. 2007.
- Reis-Filho, J. B.; Neves, A. C.; Zymberg, S. T.; Oliveira, R. M. C.. **O líquido cefalorraquidiano inicial nas meningoencefalites por *Cryptococcus neoformans*.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 27, p. 173-178. 1985.
- Retini, C.; Kozel, T. R.; Pietrella, D.; Monari, C.; Bistoni, F.; Vecchiarelli, A. **Interdependency of interleukin-10 and interleukin-12 in regulation of T-cell differentiation and effector function of monocytes in response to stimulation with *Cryptococcus neoformans*.** Infection and Immunity, v. 69, n. 10, p. 6064-6073. 2001.
- Revankar, S. G.; Fu, J.; Rinaldi, M. G.; Kelly, S. L., Kelly, D. E.; Lamb, D. C.; Keller, S. M., Wickes, B. L.. **Cloning and characterization of the lanosterol 14 α -demethylase (ERG11) gene in *Cryptococcus neoformans*.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 324, p. 719-728. 2004.
- Rivera, J.; Mukherjee, J.; Weiss, L. M.; Casadevall, A.. **Antibody efficacy in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection: a role for nitric oxide.** Journal Immunology, v. 168, n. 7, p. 3419-3427. 2002.
- Rogers, D. C.; Fisher, E. M.; Brown, S. D.; Peters, J.; Hunter, A. J.; Martin, J. E.. **Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment.** Mamm Genome, v. 8, p. 711–713. 1997.

- Romani, L.. **Immunity to fungal infections**. Nature Review Immunology, v. 4, p. 1–23. 2004.
- Sá, M. B.; Zaragoza, R.. **Critical overview of clinical guidelines relating to invasive fungal infections**. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 32, Suppl 2, p. S155-9. 2008.
- Saag, M. S.; Graybill, R. J.; Larsen, R. A.; Pappas, P. G.; Perfect, J. R.; Powderly, W. G.; Sobel, J. D.; Dismukes, W. E.. **Practice guidelines for the management of Cryptococcal disease**. Clinical Infectious Diseases, v. 30, p. 710-718. 2000.
- Salk, J. E., Pearson, H. E., Brown, P. N. & Francis, T. **Protective effect of vaccination against induced influenza B**. J. Clin. Invest., v. 24, p. 547–553. 1945.
- Samji, T. **Influenza A: understanding the viral life cycle**. Yale J Biol Med., v. 82, n. 4, p. 153-9. 2009.
- Santiago-Tirado, F.H., Onken, M.D., Cooper, J.A., Klein, R.S., Doering, T.L.. **Trojan Horse Transit Contributes to Blood-Brain Barrier Crossing of a Eukaryotic Pathogen**. MBio, v 8. 2017.
- Santos Jr., I. D.; Souza, I. A. M.; Borges, R. G.; Souza, L. B. S.; Santatana, W. J.; Coutinho, H. D. M.. **Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol**. Scientia Medica, v.15, p.189-197. 2005.
- Santos, J. R. A., Holanda, R. A., Frases, S., Bravim, M, et al. **Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of Cryptococcus gattii and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis**. PLoS ONE, v. 9, n.11. 2014.
- Santos, J. R. A.; Gouveia, L. F.; Taylor, E. L. S.; Stoianoff, M. A. R.; Pianetti, G. A.; Cesar, I. C., Santos, D. A. **Dynamic Interaction between Fluconazole and Amphotericin B against Cryptococcus gattii**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, n. 5, p. 2553-2558. 2012.
- Santos, P.C., Santos, D.A., Ribeiro, L.S., Fagundes, C.T., de Paula, T.P., Avila, T.V., Baltazar, L. de M., Madeira, M.M., Cruz, R. de C., Dias, A.C.F., Machado, F.S., Teixeira, M.M., Cisalpino, P.S., Souza, D.G.. **The Pivotal Role of 5-Lipoxygenase-Derived LTB(4) in Controlling Pulmonary Paracoccidioidomycosis**. PLoS Negl. Trop. Dis., v. 7, p. e2390. 2013.
- Sato, K., Yamamoto, H., Nomura, T., Matsumoto, I., Miyasaka, T., Zong, T., Kanno, E., Uno, K., Ishii, K., Kawakami, K.. **Cryptococcus neoformans Infection in Mice Lacking Type I Interferon Signaling Leads to Increased Fungal Clearance and IL-4-Dependent Mucin Production in the Lungs**. PLoS One, v. 10, p. e0138291. 2015.
- Saxena, S., Singh, D., Zia, A., Umrao, J., Srivastava, N., Pandey, A., Singh, S., Bhattacharya, P., Kumari, R., Kushwaha, R., Dhole, T.N.. **Clinical characterization of influenza A and human respiratory syncytial virus among patients with influenza like illness**. J Med Virol, v. 89, p. 49–54. 2017.
- Schmidt, A.G.; Do, K.T.; McCarthy, K.R.; Kepler, T.B.; Liao, H.X.; Moody, M.A.; Haynes, B.F.; Harrison, S.C. **Immunogenic Stimulus for Germline Precursors of Antibodies that Engage the Influenza Hemagglutinin Receptor-Binding Site**. Cell Rep., v. 13, n. 12, p. 2842–2850. 2015.
- Schnitzler, US; Schnitzler, P. **An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review** Virus Genes, v. 39, Issue 3, p. 279-292. 2009.
- Schoffelen, T.; Illnait-Zaragozi, M. T.; Joosten, L. A.; Netea, M. G.; Boekhout, T.; Meis, J. F.; Sprong, T.. **Cryptococcus gattii induces a cytokine pattern that is distinct from other cryptococcal species**. PLoS ONE, v. 8, n. 1, p. e55579. 2013.
- Schultz-Cherry, S.; McCullers, J.A. **A step closer to meeting the threat of avian influenza**. PLoS Medicine, v. 3, p. e375. 2006.
- Severo, C. B.; Gazzoni, A. F.; Severo, L. C. **Criptococose pulmonar**. J Bras Pneumol., v. 35, n. 11, p. 1136-1144. 2009.

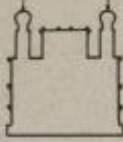
- Severo, L. C.; Oliverira, F. M.; Londero, A. T.. **Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases.** Revista Iberoamericana de Micologia, v. 16, p. 152-154. 1999.
- Shahangian, A., Chow, E.K., Tian, X., Kang, J.R., Ghaffari, A., Liu, S.Y., Belperio, J.A., Cheng, G., Deng, J.C. **Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice.** J. Clin. Invest., v. 119, p. 1910–1920. 2009.
- Shanon, C. A.; Sorrel, T. C.. **Antifungal agents.** The Medical Journal of Australia, v. 187, p. 404-409. 2007.
- Short, K. R., E. J. Kroeze, R. A. Fouchier, and T. Kuiken. **Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome.** The Lancet infectious diseases 14:57-69. 2014.
- Shun LI, S.; Mody, C.H.. **Cryptococcus.** Proceedings of the American Thoracic Society, v.10, p.186–196. 2010.
- Siddiqui, A. A.; Brouwer, A. E.; Wuthiekanun, V.; Jaffar, S.; Shattock, R.; Irving, D.; Sheldon, J.; Chierakul, W.; Peacock, S.; Day, N.; White, N. J.; Harrison, T. S.. **IFN-gamma at the site of infection determines rate of clearance of infection in cryptococcal meningitis.** Journal of Immunology, v. 174, p. 1746-1750. 2005.
- Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>> Acesso em: 20 de maio de 2013.
- Smith AM, Adler FR, Ribeiro RM, Gutenkunst RN, McAuley JL, et al. **Kinetics of Coinfection with Influenza A Virus and *Streptococcus pneumoniae*.** PLoS Pathog, v.9, n.3, p.e1003238. 2013.
- Soares, B. M.; Alves, O. A.; Ferreira, M. V.; Amorim, J. C.; Sousa, G. R.; Silveira, L. B.; Prates, R. A.; Avila, T. V.; Baltazar, L. M.; Souza D. G.; Santos, D. A.; Modolo, L. V.; Cisalpino, P. S.; Pinotti, M.. ***Cryptococcus gattii*: In vitro susceptibility to photodynamic inactivation.** Photochemistry and Photobiology, v. 87, p. 357-364. 2011.
- Sorrell, T.C., Juillard, P.G., Djordjevic, J.T., Kaufman-Francis, K., Dietmann, A., Milonig, A., Combes, V., Grau, G.E.. **Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265.** Microbes Infect, v. 18, p. 57–67. 2016.
- Spellberg, B. J.; Filler, S. G.; Edwards Jr, J. E.. **Current Treatment Strategies for Disseminated Candidiasis.** Clin Infect Diseases, v.42, p.44-51, 2006.
- Springer, D. J.; Chaturvedi, J. **Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*.** Emerging Infectious Diseases, v. 16, n. 1, p. 14-20. 2010.
- Tanaka, A.; Nakamura, S.; Seki, M.; Fukudome, K.; Iwanaga, N.; Imamura, Y.; Miyazaki, T.; Izumikawa, K.; Kakeya, H.; Yanagihara, K.; Kohno, S.. **Toll-Like Receptor 4 Agonistic Antibody Promotes Innate Immunity against Severe Pneumonia Induced by Coinfection with Influenza Virus and *Streptococcus pneumoniae*.** Clinical and Vaccine Immunology, v. 20, n. 7, p. 977–985. 2013.
- Tantisiriwat, W.; Powderly, W. G.. **Cryptococcal Infection.** J Infect Dis Antimicrob Agents, v. 21, p. 29-40. 2004.
- Tavares, L.P., Teixeira, M.M., Garcia, C.C.. **The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two edged sword.** Inflamm Res, v. 66, p. 283–302. 2017.
- Testoni, D.; Smith, P. B.; Benjamin Jr, D. K.. **The Use of Antifungal Therapy in Neonatal Intensive Care.** Clin Perinatology; v. 39, p. 83–98. 2012.

- Thorlund K, Awad T, Boivin G, Thabane L. **Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors.** BMC Infect Dis. v.11:134. 2011.
- Tierney, L.; Kuchler, K.; Rizzetto, L.; Cavaliere, D.. **Systems biology of host-fungus interactions: turning complexity into simplicity.** Current Opinion in Microbiology, v. 15, n. 4, p. 440-446. 2012.
- Tong, S., X. Zhu, Y. Li, M. Shi, J. Zhang, M. Bourgeois, H. Yang, X. Chen, S. Recuenco, J. Gomez, L. M. Chen, A. Johnson, Y. Tao, C. Dreyfus, W. Yu, R. McBride, P. J. Carney, A. T. Gilbert, J. Chang, Z. Guo, C. T. Davis, J. C. Paulson, J. Stevens, C. E. Rupprecht, E. C. Holmes, I. A. Wilson, and R. O. Donis. **New world bats harbor diverse influenza A viruses.** PLoS pathogens 9:e1003657. 2013.
- Tricco, A. C. *et al.* **Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis.** BMC Med., v. 11, p. 153. 2013.
- Trilles, L.; Lazéra, M. S.; Wanke, B.; Oliveira, R. V.; Barbosa, G. G.; Nishikawa, M. M.; Morales, B. P.; Meyer, W.. **Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 103, p. 455-462. 2008.
- Uemura, A; Takehara, T; Miyagi, T; Suzuki, T; Tatsumi, T; Ohkawa, K; Kanto, T; Hiramatsu, N; Hayashi, N.. **Natural killer cell is a major producer of interferon gamma that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice.** Cancer Immunol Immunother, v. 59, n. 3, p. 453-63. 2010.
- Uetani, K., Hiroi, M., Meguro, T., Ogawa, H., Kamisako, T., Ohmori, Y., Erzurum, S.C.. **Influenza A virus abrogates IFN-gamma response in respiratory epithelial cells by disruption of the Jak/Stat pathway.** Eur J Immunol, v. 38, p. 1559–1573. 2008.
- Urai, M.; Kaneko, Y.; Ueno, K.; Okubo, Y.; Aizawa, T.; Fukazawa, H.; Sugita, T.; Ohno, H.; Shibuya, K.; Kinjo, Y.; Miyazaki, Y. **Evasion of Innate Immune Responses by the Highly Virulent *Cryptococcus gattii* by Altering Capsule Glucuronoxylomannan Structure.** Front Cell Infect Microbiol., v. 6, n. 5, p. 101. 2016.
- Vago, J.P., Tavares, L.P., Garcia, C.C., Lima, K.M., Perucci, L.O., Vieira, É.L., Nogueira, C.R., Soriani, F.M., Martins, J.O., Silva, P.M., Gomes, K.B., Pinho, V., Bruscoli, S., Riccardi, C., Beaulieu, E., Morand, E.F., Teixeira, M.M., Sousa, L.P.. **The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution.** J Immunol, v. 194, p. 4940–4950. 2015.
- Vanbreuseghem, R.; Takashio, M.. **An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin, 1894. Part. II - *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var nov.** Ann. Soc. belge Méd. trop., v. 50, p. 695-702. 1970.
- Voelz, K.; Lammas, D. A.; May, R. C.. **Cytokine Signaling Regulates the Outcome of Intracellular Macrophage Parasitism by *Cryptococcus neoformans*.** Infection and Immunity, v. 77, n. 8, p. 3450–3457. 2009.
- Voelz, K.; May, R. C.. **Cryptococcal interactions with the immune system.** Eukariotic Cell, v. 9, n. 6, p. 835-846. 2010.
- Vu, K., Tham, R., Uhrig, J. P., Thompson, G. R., Na Pombejra, S., Jamklang, M., Bautos, J. M., Gelli, A. **Invasion of the Central Nervous System by *Cryptococcus neoformans* Requires a Secreted Fungal Metalloprotease.** mBio, 5(3), e01101–14. 2014.
- Wager, C.M.L., Hole, C.R., Wozniak, K.L., Montes, H.M., Wormley, F.L.. ***Cryptococcus* and Phagocytes : Complex Interactions that Influence Disease Outcome.** Frontiers in Microbiology, v. 7, n. 105, p. 1–16. 2016.
- Wang, T. T.; Palese, P. **Universal epitopes of influenza virus hemagglutinins?** Nature structural & molecular biology, v. 16, n. 3, p. 233-234. 2009.
- Watanabe, T.; Watanabe, S.; Kawaoka, Y. **Cellular networks involved in the influenza virus life cycle.** Cell Host Microbe., v. 7, n. 6, p. 427-39. 2010.

- Wauters J, Baar I, Meersseman P, Meersseman W, Dams K, De Paep R, et al. **Invasive pulmonary aspergillosis is a frequent complication of critically ill H1N1 patients: a retrospective study.** *Intensive Care Med.*, v. 38, p. 1761-8. 2012.
- Weischenfeldt, J., Porse, B.. **Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications.** *Cold Spring Harb. Protoc.*, v. 2008, n. pdb.prot5080. 2008.
- WHO, World Health Organization. **The world health report 2004—changing history.** Geneva: The Organization; 2004.
- WHO. **Review of the 2015 influenza season in the southern hemisphere.** *Wkly Epidemiol Rec.*, v. 90, n. 48, p. 45-60. 2015.
- Williamson, P.R., Jarvis, J.N., Panackal, A.A., Fisher, M.C., Molloy, S.F., Loyse, A., Harrison, T.S.. **Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy.** *Nat Rev Neurol*, v. 13, p. 13–24. 2017.
- Wolf, A. I.; Strauman, M. C.; Mozdzanowska, K.; Whittle, J. R.; Williams, K. L.; Sharpe, A. H.; Weiser, J. N.; Caton, A. J.; Hensley, S. E.; Erikson, J. **Coinfection with *Streptococcus pneumoniae* Modulates the B Cell Response to Influenza Virus.** *Journal of Virology*, v. 88, n. 20, p. 11995–12005. 2014.
- Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H. **Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases.** *Biomarker Research*, v. 2, p. 1. 2014.
- York, A.; Fodor, E. **Biogenesis, assembly, and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell.** *RNA Biol.*, v. 10, n. 8, p. 1274-82. 2013.
- Zaragoza, O. et al. **Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival.** *Cellular Microbiology*, v. 10(10), p.2043-2057. 2008.
- Zaragoza, O., Nielsen, K.. **Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact.** *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 16, p. 409–413. 2013.
- Zhang, R.; Chi, X.; Wang, S.; Qi, B.; Yu, X.; Chen, JL.. **The Regulation of Autophagy by Influenza A Virus.** *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-7. 2014.

ANEXOS

ANEXO 1 – Carta de autorização para a utilização do vírus Influenza A.



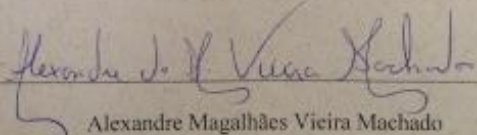
Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa René Rachou
Laboratório de Imunopatologia

Belo Horizonte, 06 de Novembro de 2015.

A quem de direito,

Autorizo a utilização das linhagens de vírus influenza A H1N1 adaptados a camundongos: A/PR8/34 (PR8) e WSN33 no projeto intitulado: "Influenza do vírus influenza A na progressão da criptococose experimental", o qual estão sendo desenvolvidos pelo Prof. Dr. Daniel de Assis Santos, e a aluna de doutorado Lorena Vivien Neves de Oliveira, do programa de pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Atenciosamente,


Alexandre Magalhães Vieira Machado
Pesquisador Associado
Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR)/
Fundação Oswaldo Cruz em Minas Gerais (FIOCRUZ)

**ANEXO 2 – Certificado de aprovação para uso de animais (Protocolo nº 354/2015)
pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMG)**



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 354 / 2015, relativo ao projeto intitulado "INFLUÊNCIA DO VÍRUS INFLUENZA A NA PROGRESSÃO DA CRIPTOCOCOSE EXPERIMENTAL", que tem como responsável Daniel de Assis Santos, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 24/11/2015. Este certificado expira-se em 24/11/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 354 / 2015, related to the Project entitled "INFLUENZA A VIRUS INFLUENCE ON PROGRESSION OF EXPERIMENTAL CRYPTOCOCCOSIS", under the supervision of Daniel de Assis Santos, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 24/11/2015. This certificate expires in 24/11/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 24/11/2015.

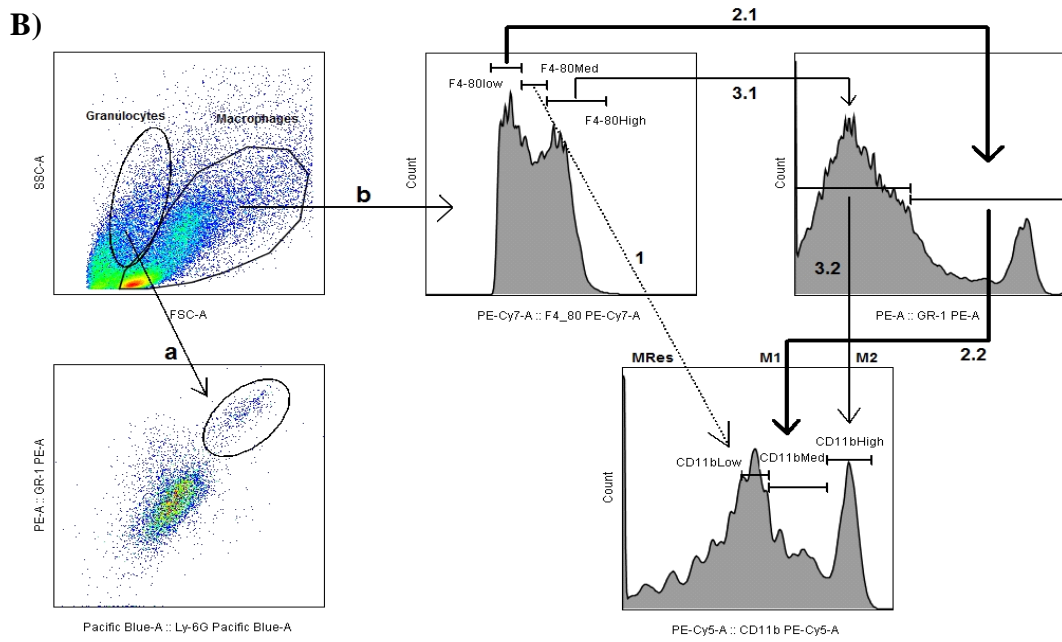
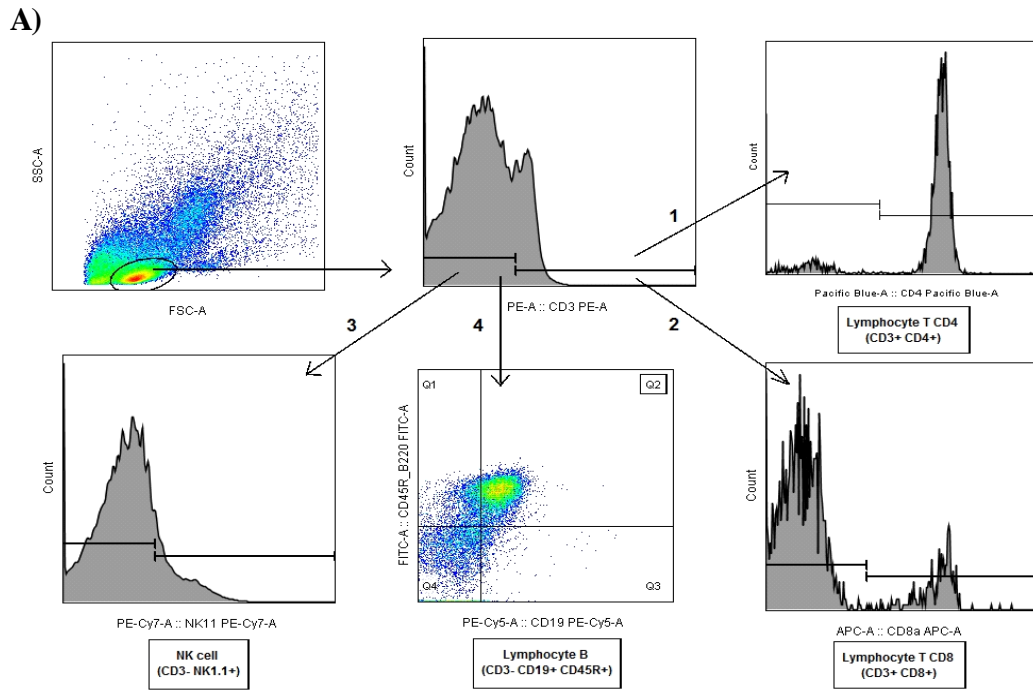
Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

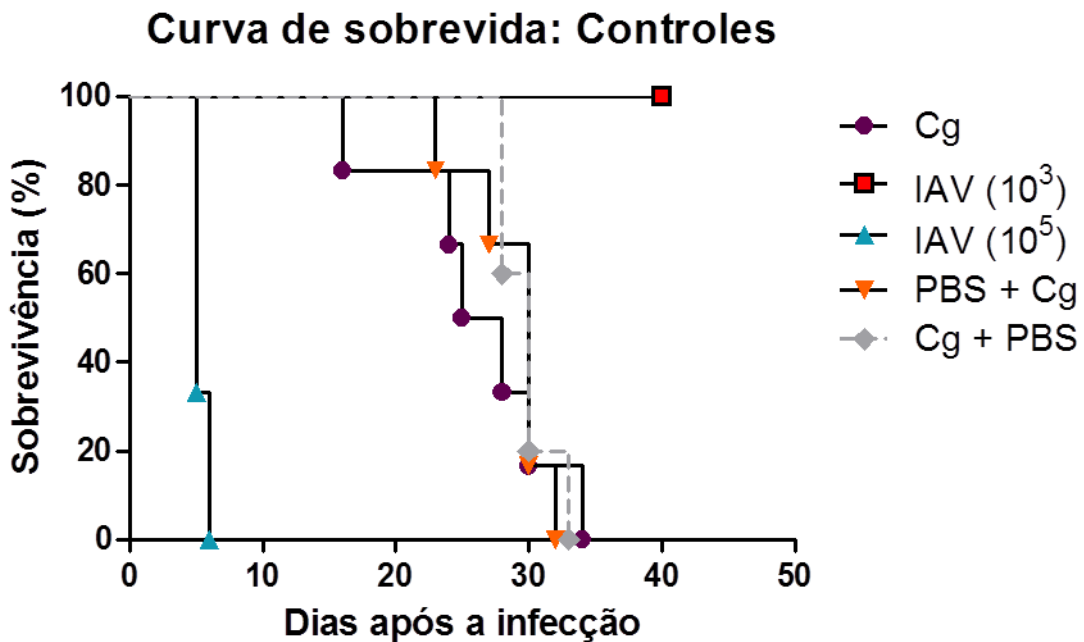
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

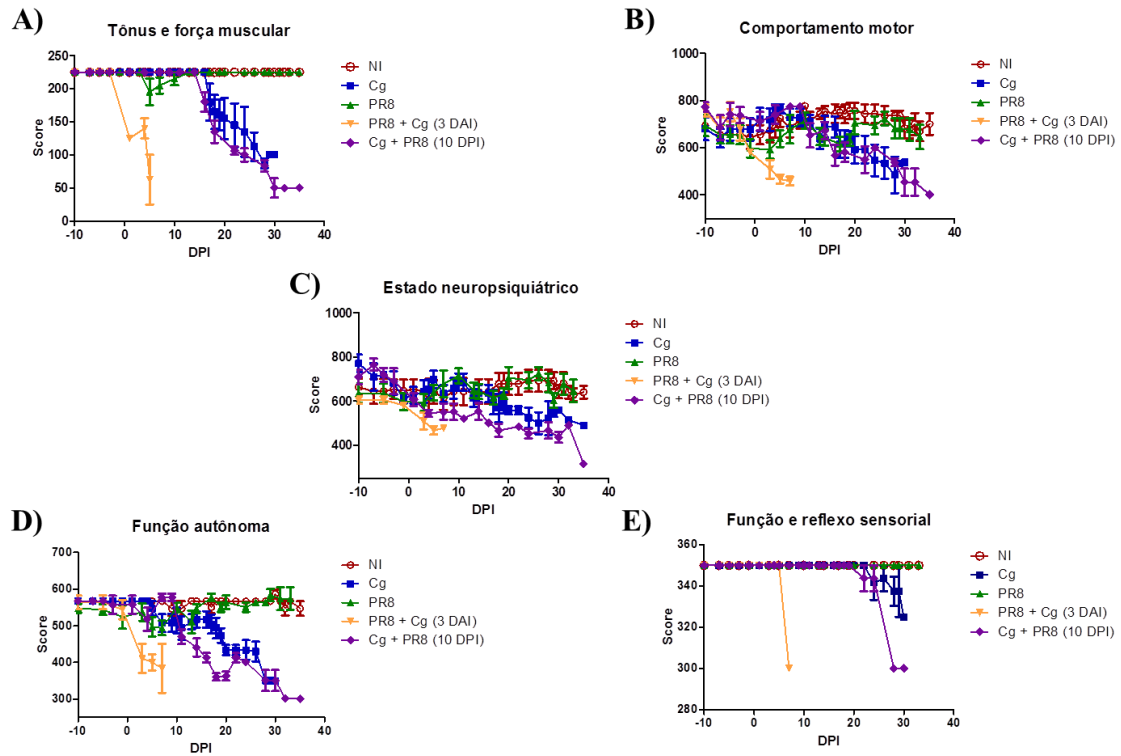
ANEXO 3 – Strategy scheme used for evaluation of cell populations by flow cytometry analysis in lungs of mice infected with IAV for 3 days, or not infected. (A) Cells selected in the SSC x FSC gate (first dot plot) were analyzed for CD3 expression for evaluation of lymphocyte populations. CD3⁺ cells were further analyzed for CD4 (1) and CD8 (2) expression. Thus, was defined as lymphocyte TCD4 the population CD3⁺CD4⁺ (1), and the population CD3⁺CD8⁺ was considered as lymphocyte TCD8 (2). Otherwise, CD3⁻ population was then evaluated for NK1.1 expression to identify NK cells (3), defined as CD3⁻NK1.1⁺. Likewise, CD3⁻ population was also evaluated for CD19 and CD45 expression (4), where lymphocyte B population is CD3⁻CD19⁺CD45⁺ (Q2 of dot plot). (B) Cells selected in the SSC x FSC granulocytes gate (first dot plot) were evaluated for neutrophils population. Neutrophils population were defined according to Ly-6G and Gr1 expression (a) and was considered as Ly-6G⁺Gr1⁺ (gate of second dot plot). Macrophage populations were defined according to F4/80, Gr1 and CD11b expression. Cells selected in the SSC x FSC macrophages gate (first dot plot) were analyzed for F4/80 expression (b). F4/80⁺ cells were further analyzed for intensity of F4/80 expression (first histogram); F4/80Med population was then evaluated for CD11b expression (1), then F4/80Med CD11bLow cells were considered **Mres**. F4/80⁺ was also further analyzed for Gr1 expression (second histogram); F4/80Low Gr1⁺ population (2.1) was then evaluated for intensity of CD11b expression (third histogram) (2.2); **M1** population is then F4/80Low, Gr1⁺, CD11bMed. Moreover, F4/80High Gr1⁻ population (3.1) was further evaluated for intensity of CD11b expression (3.2); **M2** population is F4/80High, Gr1⁻, CD11bHigh.



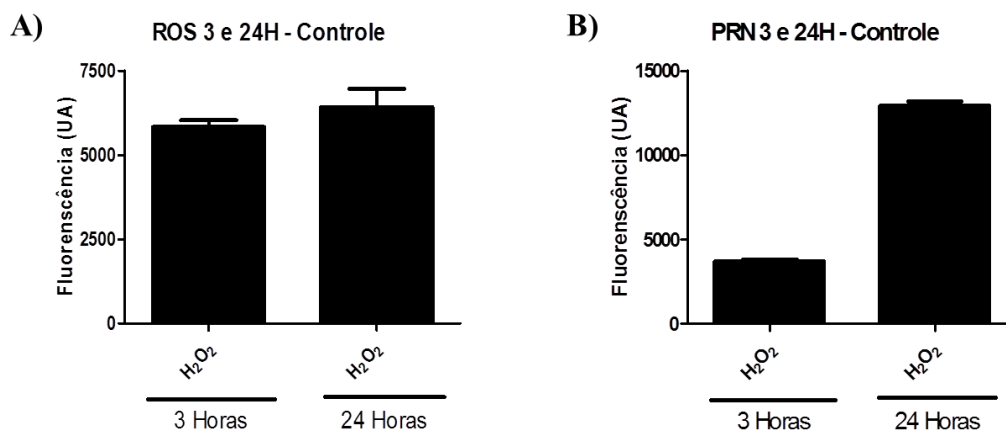
ANEXO 4 – Curva de sobrevida controle para a coinfeção. Foi utilizada dose letal (10^5 UFP IAV/ animal) para confirmar a infecção e atividade viral, mostrando que os animais foram infectados e morrem rapidamente nos 5º e 6º dias após a infecção. E, instilação de PBS ao invés do vírus influenza A. Pode ser visto que o PBS 1X não alterou a infecção por *C. gattii*, pois os animais apresentaram sobrevida semelhante ao grupo infectado somente com o fungo, sem diferença estatística. Cg: grupo infectado somente por *C. gattii*; IAV (10^3): grupo infectado somente pelo vírus Influenza A PR8 com 10^3 UFP/animal; IAV (10^5): grupo infectado somente pelo vírus Influenza A PR8 com 10^5 UFP/animal; PBS + Cg: grupo infectado com PBS 1X (via intranasal), ao invés do vírus, três dias antes da infecção por *C. gattii*; Cg + PBS: grupo infectado com PBS 1X (via intranasal), ao invés do vírus, dez dias após a infecção por *C. gattii*.



ANEXO 5 – Avaliação do perfil comportamental dos animais coinfectados com *C. gattii* e vírus influenza A PR8 através do Protocolo SHIRPA. A) Tônus e força muscular; B) Comportamento motor; C) Estado neuropsiquiátrico; D) Função autônoma; E) Função e Reflexo Sensorial. NI: animais não infectados; Cg: grupo infectado somente por *C. gattii*; PR8: grupo infectado somente pelo vírus Influenza A PR8; PR8 + Cg: grupo infectado por Influenza A PR8 três dias antes da infecção por *C. gattii*; Cg+PR8: grupo infectado com Influenza A PR8 10 dias depois que *C. gattii*.



ANEXO 6 – Quantificação do peroxinitrito (H_2O_2), considerado controle para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (A) e de peroxinitrito (PRN) (B), após 3 e 24 horas de incubação sobre influência dos diferentes tratamentos.



**ANEXO 7 – Certificado de aprovação para uso de animais (Protocolo nº 368/2013)
pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMG)**



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 368 / 2013, relativo ao projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM MODELO MURINO DE CRIPTOCOCOSE", que tem como responsável Daniel de Assis Santos, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 14/04/2014. Este certificado espira-se em 14/04/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 368 / 2013, related to the Project entitled "EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF PHOTODYNAMIC THERAPY IN A MURINE MODEL OF CRYPTOCOCCOSIS", under the supervision of Daniel de Assis Santos, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 14/04/2014. This certificates expires in 14/04/2019.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 14/04/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 8 – Atividades desenvolvidas durante o Doutorado (10/2013 a 10/2017)

Produção científica e Participação em eventos

➤ **Realização do estágio de Doutorado Sanduíche no exterior no período de 06 de Junho de 2017 a 10 de Outubro de 2017.** Local de execução: Westmead Clinical School, Sydney Medical School - Centre for Infectious Diseases and Microbiology (CIDM), Westmead Millennium Institute for Medical Research – The University of Sydney – Sydney, Austrália. O Doutorado Sanduíche ocorreu sob a orientação da Prof^ª. Tania C. Sorrell, M.D., Ph.D.; Prof^ª. Julianne T. Djordjevic, M.D., Ph.D. e Dra. Keren Francis, M.D., Ph.D.. No qual foi desenvolvida pesquisa com modelos celulares *in vitro* e com o modelo de barreira hematoencefálica (BBB) para avaliar a transmigração de *C. gattii* para o sistema nervoso central na presença ou não do vírus influenza A, com o objetivo de avaliar a patogênese *in vitro* da coinfeção entre o vírus influenza A e o patógeno fúngico *C. gattii*.

➤ **Artigos completos publicados em periódicos (previamente mencionados na íntegra)**

1. **OLIVEIRA, L.V.N.**; COSTA, M. C.; MAGALHAES, T. F. F.; SANTOS, P. C.; BASTOS, R. W.; CARNEIRO, H.C.S.; RIBEIRO, N.Q.; FERREIRA, G. F.; RIBEIRO, L. S.; GONÇALVES, A.P.; FAGUNDES, C.T.; PASCOAL-XAVIER, M.A.; DJORDJEVIC, J.T.; SORRELL, T.C.; SOUZA, D.G.; MACHADO, A.M.V.; SANTOS, D. A.. Influenza A virus as a predisposing factor for cryptococcosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, In Press, 2017. doi: 10.3389/fcimb.2017.00419.**

2. **OLIVEIRA, L. V. N.**; BASTOS, R. W.; RIBEIRO, N. Q.; COSTA, M. C.; ACURCIO, L. B.; ROCHA, K. M.; SANTOS, J. R. A.; CRUZ, R. C.; SOARES, B. M.; SANTOS, D. A.. In vivo probiotic and antimicrobial photodynamic therapy as alternative therapies against cryptococcosis are ineffective. **Veterinary Microbiology, In Press, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.015>.**

➤ **Artigos completos publicados em periódicos em colaboração**

3. COSTA, M. C.; MATA, L. M.; RIBEIRO, N. Q.; SANTOS, A. P. N.; **OLIVEIRA, L. V. N.**; VILELA, R. V. R.; CARDOSO, V. N.; FERNANDES, S. O. A.; SANTOS, D. A.. A new method for studying cryptococcosis in a murine model using ^{99m}Tc-Cryptococcus gattii. *Medical Mycology*, myx060, 2017. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx060>. Published online: 09 September 2017.



Medical Mycology, 2017, 0, 1–6
doi: 10.1093/mmy/myx060
Advance Access Publication Date: 0 2017
Original Article



Original Article

A new method for studying cryptococcosis in a murine model using ^{99m}Tc-*Cryptococcus gattii*

Mariete Carvalho Costa¹, Lays Murta Mata²,
Noelly de Queiroz Ribeiro¹, Anderson Philip Nonato Santos¹,
Lorena Vivien Neves Oliveira¹, Raquel Virginia Rocha Vilela³,
Valbert Nascimento Cardoso², Simone Odilia Antunes Fernandes^{2,†}
and Daniel Assis Santos^{1,*,†}

¹Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, ICB – UFMG, ²Laboratório de Radioisótopos, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia-UFMG and ³Laboratório de Microbiologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia – UFMG

*To whom correspondence should be addressed. Daniel de Assis Santos, PhD, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 31270–901. Tel: +55 31 34092758; Fax: +55 31 3409 2733; E-mail: das@ufmg.br or dasufmg@gmail.com

†These authors contributed equally to this work.

Received 17 March 2017; Revised 5 May 2017; Accepted 13 July 2017; Editorial Decision 10 May 2017

Abstract

Cryptococcus gattii is one of the etiologic agents of cryptococcosis, a systemic mycosis that occurs in healthy and immunosuppressed humans and animals worldwide. Primary pulmonary infection caused by *C. gattii* is usually followed by fungal dissemination to the central nervous system, resulting in high mortality rates. In this context, animal models of cryptococcosis are useful in the study of fungal pathogenesis and host response against the pathogen, and for testing novel therapeutic options. The most frequently applied method to study fungal dissemination from the lungs to other organs is by culturing tissues, which is not accurate for the detection and quantification of fungal load at early stages of the infection. To overcome this problem, the purpose of this study was to develop a new method for the quantification of *Cryptococcus* dissemination. One *C. gattii* strain was efficiently radiolabeled with technetium-99m (^{99m}Tc), without affecting viability of the cells. Further, the ^{99m}Tc-*C. gattii* (111 MBq) strain was used to infect mice by intratracheal and intravenous route for biodistribution studies. ^{99m}Tc-*C. gattii* was successfully used in detection of the yeast in the brain of mice 6 hours postinoculation, while the detection using colony forming units was possible only 24 hours postinfection. Our results provided an alternative method that could be applied in further investigations regarding the efficacy of antifungals, fungal virulence, and host-pathogen interactions.

Key words: *Cryptococcus gattii*, technetium-99m, radiolabeling, fungal dissemination, animal model.

➤ **Artigos completos publicados em periódicos em colaboração**

4. BONIEK, D.; **OLIVEIRA, L. V. N.**; RIBEIRO, N. Q.; PAIVA, C. A. O.; LANA, U. G. P.; SANTOS, A. F. B.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.. Effect of Environmental Factors on Rock-inhabiting Fungal Communities from Brazilian Soapstone Samples. Journal of Environmental Science and Engineering B., v.6, p.55 - 71, 2017.

Journal of Environmental Science and Engineering B 6 (2017) 55-71
doi:10.17265/2162-5263/2017.02.001



Effect of Environmental Factors on Rock-inhabiting Fungal Communities from Brazilian Soapstone Samples

Douglas Boniek¹, **Lorena Vivien Neves de Oliveira¹**, Noelly de Queiroz Ribeiro¹, Christiane Abreu Oliveira Paiva², Ubiraci Gomes de Paula Lana², Antônio Fernando Batista dos Santos³ and Maria Aparecida de Resende Stoianoff^{1,4}

1. *Post-Graduate Program in Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte 31270-901, Brazil*

2. *Embrapa Milho Sorgo, Brazilian Agricultural Research Corporation, Sete Lagoas 35701-970, Brazil*

3. *Faculty of Engineering and Architecture, Foundation of Education and Culture of Minas Gerais, Belo Horizonte 30310-190, Brazil*

4. *Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte 31270-901, Brazil*

Abstract: The present study aims to evaluate the environmental effect on fungal community composition associated with biodeterioration occurring in stones (soapstone) at two distinct locations in Minas Gerais State, Brazil: Congonhas city and Sanctuary of Caraça. Four collections of fungal communities over one year were obtained from both research sites from the soapstone block surfaces exposed for over two decades. The molecular diversity profile of the fungal community at the two localities was obtained by DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), and the genomes of the most representative population were sequenced. DGGE showed the formation of two clusters with filamentous fungal communities. Sequencing of the most representative bands revealed the presence of fungi associated with the biodeterioration of soapstone. In addition, many of the identified species were associated with photobionts that could generate lichens, indicating that environmental characteristics affect the occurrence of filamentous fungi, which leads to biodeterioration of stones. Authors' study focused on an environmental variation of an extreme habitat for fungi associated with soapstone in the state of Minas Gerais, Brazil and identified the presence of interesting rock-inhabiting fungal communities including species related to lichens, which can accelerate the deterioration of stones by the production of organic acids.

Key words: Fungal community, biodeterioration, soapstone, cultural heritage, Minas Gerais state.

➤ **Artigos completos publicados em periódicos em colaboração**

5. RIBEIRO, N.Q.; COSTA, M.C.; MAGALHÃES, T.F.F.; CARNEIRO, H.C.S.; **OLIVEIRA, L.V.N.**; FONTES, A.C.L.; SANTOS, J.R.A.; FERREIRA, G.F.; ARAUJO, G.R.S.; ALVES, V.; FRASES, S.; PAIXÃO, T.A.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; SANTOS, D. A.. Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.49, p.695 - 702, 2017.

International Journal of Antimicrobial Agents 49 (2017) 695–702



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag



Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent



Noelly de Queiroz Ribeiro ^a, Mariete Carvalho Costa ^a, Thaís Furtado Ferreira Magalhães ^a, Hellem Cristina Silva Carneiro ^a, **Lorena Vivien Oliveira** ^a, Alide Caroline Lima Fontes ^a, Julliana Ribeiro Alves Santos ^{a,b}, Gabriela Freitas Ferreira ^{a,c}, Glauber Ribeiro de Sousa Araujo ^d, Vinícius Alves ^d, Susana Frases ^d, Tatiane Alves Paixão ^e, Maria Aparecida de Resende Stoianoff ^a, Daniel Assis Santos ^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

^b Laboratório de Micologia, Universidade Ceuma, São Luís, Maranhão, Brazil

^c Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares, Governador Valadares, Brazil

^d Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^e Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 September 2016
Accepted 22 January 2017

Keywords:
Cryptococcus gattii
Drug repositioning
Atorvastatin

ABSTRACT

Cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii* leads to pneumonia and meningoencephalitis, and has a high mortality rate worldwide due to the inadequacy of available therapy and increasing drug resistance. There is a need to develop effective treatments, and drug repositioning is an interesting alternative to achieve new strategies to treat cryptococcosis. Atorvastatin (ATO), a statin currently used to treat hypercholesterolaemia, was tested in this study as an adjuvant to control infections caused by *C. gattii*. Several aspects of the effect of ATO on the host and the yeast were evaluated, with particular focus on the association of ATO with fluconazole (FLC), which (i) reduced ergosterol content in the cell membrane and altered properties of the polysaccharide capsule of *C. gattii*; (ii) increased the production of reactive oxygen species by macrophages; and (iii) reduced yeast phagocytosis and the intracellular proliferation rate. In an animal model, infected mice treated with ATO + FLC showed increased survival, improved clinical condition, and reduced fungal burden in the lungs and brain. This study is the first to perform in vivo tests with ATO + FLC for the treatment of cryptococcosis. The results suggest that ATO may be an important adjuvant for the treatment of cryptococcosis.

© 2017 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

➤ **Artigos completos publicados em periódicos em colaboração**

6. FONTES, A.C.L.; BRETAS OLIVEIRA, D.; SANTOS, J.R.A.; CARNEIRO, H.C.S.; RIBEIRO, N.Q.; **OLIVEIRA, L.V.N.**; BARCELLOS, V.A.; PAIXÃO, T.A.; ABRAHÃO, J.S.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; VAINSTEIN, M.H.; SANTOS, D.A.. A subdose of fluconazole alters the virulence of during murine cryptococcosis and modulates type I interferon expression. *Medical Mycology*, v.54, p.myw056, 2016.

Medical Mycology Advance Access published August 2, 2016



Medical Mycology, 2016, 0, 1–10
doi: 10.1093/mmy/myw056
Advance Access Publication Date: 0 2016
Original Article



Original Article

A subdose of fluconazole alters the virulence of *Cryptococcus gattii* during murine cryptococcosis and modulates type I interferon expression

Alide Caroline Lima Fontes¹, Danilo Bretas Oliveira^{2,3}, Juliana Ribeiro Alves Santos^{1,4}, Hellem Cristina Silva Cameiro¹, Noelly de Queiroz Ribeiro¹, Lorena Vivien Neves de Oliveira¹, Vanessa Abreu Barcellos⁵, Tatiane Alves Paixão⁶, Jonatas Santos Abrahão², Maria Aparecida Resende-Stoianoff¹, Marilene Henning Vainstein⁵ and Daniel Assis Santos^{1,*}

¹Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil, ²Laboratório de Virus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil, ³Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brazil, ⁴Laboratório de Micologia, Universidade Ceuma (UNICEUMA), São Luís, Maranhão, Brazil, ⁵Laboratório de Biologia de fungos de importância médica e biotecnológica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil and ⁶Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Daniel Assis Santos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 31270-901. Tel: +55 31 3409 2758; Fax: +55 31 3409 2733; E-mail: dass@ufmg.br


Received 1 March 2016; Revised 26 April 2016; Accepted 15 May 2016

Abstract

Cryptococcosis is an invasive infection caused by yeast-like fungus of the genera *Cryptococcus* spp. The antifungal therapy for this disease provides some toxicity and the incidence of infections caused by resistant strains increased. Thus, we aimed to assess the consequences of fluconazole subdoses during the treatment of cryptococcosis in the murine inflammatory response and in the virulence factors of *Cryptococcus gattii*. Mice infected with *Cryptococcus gattii* were treated with subdoses of fluconazole. We determined the behavior of mice and type 1 interferon expression during the treatment; we also studied the virulence factors and susceptibility to fluconazole for the colonies recovered from the animals. A subdose of fluconazole prolonged the survival of mice, but the morbidity of cryptococcosis was higher in treated animals. These data were linked to the increase in: (i) fluconazole minimum inhibitory concentration, (ii) capsule size and (iii) melanization of *C. gattii*, which probably led to the increased expression of

➤ **Artigos submetidos para publicação (sob-revisão)**

1. BASTOS, R. W.; CARNEIRO, H.C.S.; **OLIVEIRA, L. V. N.**; ROCHA, K. M.; FREITAS, G.S.C.; COSTA, M. C.; MAGALHAES, T. F. F.; CARVALHO, V.S.; ROCHA, C.; FERREIRA, G. F.; PAIXÃO, T.A.; JANBON, G.; SANTOS, D. A.. Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morpho-physiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Submitted to Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC). (Under review since 07 June 2017).**



PUBLICATIONS EVENTS SCIENCE SKILLS CAREERS MEMBERSHIP PUBLIC POLICY

Antimicrobial Agents
and Chemotherapy®

Manuscript Submission
and Peer Review System

Home Help for Authors Help for Reviewers Contact Us Logout

Manuscript #	AAC01179-17
Current Revision #	0
Submission Date	2017-06-07 08:18:50
Current Stage	Waiting for Revision
Title	Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morpho-physiology and virulence of <i>Cryptococcus gattii</i> and <i>C. neoformans</i>
Running Title	Environmental triazole induces cross resistance
Manuscript Type	Full-Length Text
Journal Section	Susceptibility
Corresponding Author	Dr. Daniel Assis Santos (Universidade Federal de Minas Gerais)
Contributing Authors	Rafael Bastos , Hellem Carneiro , Lorena Oliveira , Ms. Karen Rocha , Gustavo Freitas , marliete costa , Miss Thais F.F. Magalhães , Vanessa Carvalho , Ms. Claudia Rocha , Gabriella Ferreira , Dr. Tatiane Paixão , Dr. Guilhem Janbon , Dr. Daniel Assis Santos (corr-auth)
Abstract	<p><i>Cryptococcus gattii</i> and <i>C. neoformans</i> are environmental fungi that cause cryptococcosis. This infection is treated with antifungal drugs, such as amphotericin B (AMB) and fluconazole (FLC). However, it is increasing the therapeutic failure due to resistant strains. As these species are constantly isolated from vegetal materials and the usage of agrochemical is growing, we thought that pesticides could affect the susceptibility to clinical drugs of these fungi. Therefore, we evaluated the influence of the triazole pesticide tebuconazole (TBZ) on the susceptibility to clinical drugs, morpho-physiology and virulence of <i>C. gattii</i> and <i>C. neoformans</i> strains. The results showed that TBZ-exposure caused in vitro cross-resistance (CR) between TBZ and clinical azoles (fluconazole, itraconazole, ravuconazole), but not with AMB. In some strains, CR was observed even after the exposure to have ceased, suggesting that specific mutations have occurred. Further, the TBZ-exposure increased cell diameter and the negative charge of the cell surface and decreased the surface/volume ratio. Interestingly, <i>C. neoformans</i> H99 formed pseudohyphae in TBZ media at 30 °C. Although the virulence strains of both species previously exposed to TBZ decreased in mice, the TBZ-exposure colonies recovered from the lungs were more resistant to azole drugs than non TBZ-exposed cells. This in vivo CR was confirmed when fluconazole was not able to reduce the fungal burden in the lungs of mice. Our study supports the idea that agrochemical usage can have major effect in human and animal pathogens that live in the environment by affecting their resistance to clinical drugs.</p>
Editor	Sevtap Arıkan-Akdağı
Suggested Reviewers to Include	Hellen Fuchs (Brown University), Julliane Djordjevic (University of Sydney), Márcia Melhem (Instituto Adolfo Lutz)
Suggested Reviewers to Exclude	N/A
Keywords	agrochemical, antifungal cross resistance, fluconazole, tebuconazole, pseudohyphae
Research Areas	Mycology
Conflict of Interest	No conflict of interest.
Preprint Server	No
Funding Sources	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG ⚠️ : Daniel Assis Santos APQ-00727-18 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ✅ : Daniel Assis Santos 403006/2016-3 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES ⚠️ : Rafael Bastos 88881.131683/2016-01 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ✅ : Daniel Assis Santos 305154/2014-1
Decision	Modify - Rereview Required / 2017-08-02
Data Citation	Are the data sets and/or code used in the experiments and studies described in this submission identified and cited in the manuscript and reference list in accord with ASM's Data Citation Policy ? Yes

➤ **Apresentação de trabalho em eventos**

1. **OLIVEIRA, L. V. N.**; COSTA, M. C.; Magalhães, T. F. F.; RIBEIRO, N. Q.; Carneiro, H. C. S.; BASTOS, R.W.; SANTOS, P. C.; Souza, D. G.; Machado, A. M. V.; SANTOS, D. A. ***Cryptococcus gattii* and Influenza A: TOGETHER BECOME WORSE, 2017.** (Congresso Internacional, Apresentação oral de Trabalho). Evento: 10th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. ICCC 2017, Foz do Iguacu, PR, Brasil.



➤ **Apresentação de trabalho em eventos**

2. **OLIVEIRA, L. V. N.**; MAGALHAES, T. F. F.; COSTA, M. C.; RIBEIRO, N. Q.; Carneiro, H. C. S.; Souza, D. G.; Machado, A. M. V.; SANTOS, D. A. *Cryptococcus gattii* versus Influenza A: uma abordagem de coinfeção, 2016. (Simpósio, Apresentação oral em eventos). Evento: III Simpósio de Microbiologia da UFMG - Doenças Microbianas Emergentes. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.



➤ **Premiações**

2017. Young investigation award to honour the outstanding study “*Cryptococcus gattii* and Influenza A: Together Become Worse”, ICCC 2017, Foz do Iguaçu, Brasil. In: 10th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis.



➤ **Premiações**

2016. Melhor Pôster ao trabalho “The agrochemical benomyl increases the virulence of *Cryptococcus gattii* and induces cross-resistance to fluconazole”, Universidade Federal de Minas Gerais, In: III Simpósio de Microbiologia da UFMG.



Certificamos que Carneiro, H.C.S., Ribeiro, N.Q., Rafael Wesley Bastos, R.W., Fontes, A.C.L., Magalhães, T.F.F., Oliveira, L.V., Carvalho, V.S., Abrahão, J.S., Resende-Stoianoff, M.A., Santos, D.A. participou do “III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de setembro de 2016, e teve o seu trabalho, “THE AGROCHEMICAL BENOMYL INCREASES THE VIRULENCE OF CRYPTOCOCCUS GATTII AND INDUCES CROSS-RESISTANCE TO FLUCONAZOLE”, DESTACADO COMO MELHOR PÔSTER.


Prof. Dra. Danielle da Glória de Souza
Coordenadora III Simpósio de Microbiologia da UFMG


Prof. Dr. Paulo César Peregrino Ferreira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia



➤ **Premiações**

2015. Mérito Científico ao trabalho "Alteration of *Cryptococcus gattii* Virulence Factors during Infection Intratracheal in Murine Model", Sociedade Brasileira de Microbiologia, In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM).



➤ **Premiações**

2015. Melhor Pôster ao trabalho “Atorvastatina, um fármaco promissor no tratamento da criptococose causada por *Cryptococcus gattii*”, Universidade Federal de Minas Gerais, In: II Simpósio de Microbiologia da UFMG.

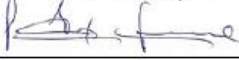


Certificamos que Ribeiro, N. Q.; Magalhães, T. F. F.; Fontes, A. C. L.; **Oliveira, L. V. N.**; Freitas, G. S. C.; Santos, D. A. participou do “II Simpósio de Microbiologia da UFMG – Microbiologia Translacional: Do ambiente natural às aplicações biotecnológicas”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de outubro de 2015, e teve o seu trabalho, “ATORVASTATINA, UM FÁRMACO PROMISSOR NO TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE CAUSADA POR *Cryptococcus gattii*”, DESTACADO COMO MELHOR PÔSTER.

Belo Horizonte, 06 de outubro de 2015.



Prof. Dra. Danielle da Glória de Souza
Coordenadora II Simpósio de Microbiologia da UFMG



Prof. Dr. Paulo César Peregrino Ferreira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia



➤ **Resumos publicados em anais de eventos**

1. **OLIVEIRA, L. V. N.**; COSTA, M. C.; MAGALHÃES, T. F. F.; RIBEIRO, N. Q.; CARNEIRO, H. C. S.; BASTOS, R. W.; SANTOS, P. C.; SOUZA, D. G.; MACHADO, A. M. V.; SANTOS, D. A.. *Cryptococcus gattii* and Influenza A: Together Become Worse. In: 10th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis (ICCC), 2017, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Immunology and Host-Pathogen Interaction, 2017.
2. **OLIVEIRA, L. V. N.**; MAGALHAES, T. F. F.; COSTA, M.C.; RIBEIRO, N.Q.; CARNEIRO, H.C.S.; SOUZA, D.G.; MACHADO, A.M.V.; SANTOS, D.A.. *Cryptococcus gattii* versus Influenza A: uma abordagem de coinfeção. In: III Simpósio de Microbiologia da UFMG: Doenças Microbianas Emergentes, 2016, Belo Horizonte - MG. Micologia, 2016.
3. **OLIVEIRA, L. V. N.**; GOUVEIA, L.F.; SANTOS, JRA; SANTOS, D.A.. Effect of fluconazole resistance on the metabolism of *Cryptococcus gattii*. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis, SC. MICROBIOLOGIA MÉDICA, 2015.
4. **OLIVEIRA, L.V.N.**; COSTA, M.C.; RIBEIRO, N.Q.; SANTOS, J.R.A.; FONTES, A.C. L.; FREITAS, G.J.C.; SOARES, B.M.; SANTOS, D.A.. Terapia fotodinâmica para o tratamento da criptococose. In: I Simpósio de Microbiologia da UFMG: A Microbiologia e a Sociedade, 2014, Belo Horizonte, MG. Micologia, 2014.
5. CARNEIRO, H. C. S.; RIBEIRO, N. Q.; BASTOS, R. W.; FONTES, A. C. L.; MAGALHÃES, T. F. F.; **OLIVEIRA, L. V. N.**; CARVALHO, V. S.; COSTA, M. C.; ABRAHÃO, JONATAS SANTOS; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; SANTOS, D. A.. Agrochemical increases the virulence of *Cryptococcus gattii* and reduces the susceptibility to clinical antifungals. In: 10th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, 2017, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Resistance, New Antifungals and Treatment, 2017.
6. BASTOS, R. W.; GOUVEIA, L. F.; Carneiro, H. C. S.; **OLIVEIRA, L. V. N.**; COSTA, M. C.; Magalhães, T. F. F.; CARVALHO, V. S.; FREITAS, G. J. C.; REIS, L.; Ferreira, G. F.; SANTOS, D. A. From the environment to the host: pesticides induce antifungal resistance and change morpho-physiology and virulence in *Cryptococcus* spp.. In: 10th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, 2017, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Resistance, New antifungals and Treatment, 2017.
7. COSTA, M. C.; MATA, L. M.; SANTOS, A. P. N.; RIBEIRO, N. Q.; **OLIVEIRA, L. V. N.**; REIS, L.; VILELA, R. V. R.; CARDOSO, V. N.; FERNANDES, S. O. A.; SANTOS, D. A. Studying Cryptococcosis in Murine Model by using 99mTc Labelled *Cryptococcus gattii*. In: 10th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, 2017, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Micologia, 2017.
8. CARNEIRO, H.C.S.; RIBEIRO, N.Q.; BASTOS, R.W.; FONTES, A.C.L.; MAGALHAES, T. F. F.; **OLIVEIRA, L. V. N.**; CARVALHO, V.S.; ABRAHÃO, J.S.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; SANTOS, D.A.. The Agrochemical Benomyl Increases The Virulence Of *Cryptococcus gattii* And Induces Cross-Resistance To Fluconazole. In: III Simpósio de Microbiologia da UFMG: Doenças Microbianas Emergentes, 2016, Belo Horizonte - MG. Micologia, 2016.

9. COSTA, M. C.; MATA, L. M.; SANTOS, A. P. N.; **OLIVEIRA, L. V. N.**; REIS, L.; VILELA, R. V. R.; CARDOSO, V. N.; FERNANDES, S. O. A.; SANTOS, D. A. A new method for studying cryptococcosis in murine model by using ^{99m}Techneium labelled *Cryptococcus gattii*. In: III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes, 2016, Belo Horizonte - MG. Micologia, 2016.
10. SANTOS, A. P. N.; RIBEIRO, N. Q.; COSTA, M. C.; **OLIVEIRA, L. V. N.**; FONTES, A. C. L.; REIS, L.; SANTOS, D. A. Reposicionamento de fármacos: uma interessante opção no tratamento da criptococose causada por *Cryptococcus gattii*. In: III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes, 2016, Belo Horizonte - MG. Micologia, 2016.
11. FONTES, A.C.L.; **OLIVEIRA, L.V.N.**; BARCELLOS, V.A.; VAINSTEIN, M.H.; SANTOS, D.A.. Alteration of *Cryptococcus gattii* virulence factors during infection intratracheal in murine model. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis, SC. Micologia, 2015.
12. COSTA, M.C.; FERNANDES, H.B.; SILVEIRA, R.R.; FREITAS, G.J.C.; **OLIVEIRA, L.V.N.**; SILVA, A.M.; SANTOS, D.A.. Gender influence on the macrophages interaction with *Cryptococcus gattii*. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis, SC. Micologia, 2015.
13. RIBEIRO, N.Q.; MAGALHAES, T. F. F.; FONTES, A. C. L.; **OLIVEIRA, L. V. N.**; FREITAS, G.S.C.; SANTOS, D.A.. Atorvastatina, um Fármaco Promissor no Tratamento da Criptococose causada por *Cryptococcus gattii*. In: II Simpósio de Microbiologia da UFMG: Microbiologia Translacional: Do ambiente natural às aplicações biotecnológicas, 2015, Belo Horizonte, MG. Micologia, 2015.
14. GOUVEIA, L.F.; **OLIVEIRA, L.V.N.**; SANTOS, JRA; SANTOS, D.A.. Avaliação do metabolismo de *Cryptococcus gattii* resistente ao fluconazol. In: II Simpósio de Microbiologia da UFMG: Microbiologia Translacional: Do ambiente natural às aplicações biotecnológicas, 2015, Belo Horizonte, MG. Micologia, 2015.
15. FONTES, A.C.L.; **OLIVEIRA, L.V.N.**; BARCELLOS, V.A.; VAINSTEIN, M.H.; SANTOS, D.A.. Alteração dos fatores de virulência de *Cryptococcus gattii* durante infecção intratraqueal em modelo murino. In: II Simpósio de Microbiologia da UFMG: Microbiologia Translacional: Do ambiente natural às aplicações biotecnológicas, 2015, Belo Horizonte, MG. Micologia, 2015.
16. COSTA, M.C.; SANTOS, JRA; SILVEIRA, R.R.; RAMOS, L.H.; FREITAS, G.J.C.; **OLIVEIRA, L.V.N.**; BASTOS, R.W.; SANTOS, D.A.. Influência do gênero na progressão da infecção por *Cryptococcus gattii*. In: I Simpósio de Microbiologia da UFMG: A Microbiologia e a Sociedade, 2014, Belo Horizonte, MG. Micologia, 2014.

➤ **Organização de eventos**

1. **OLIVEIRA, L. V. N.** II Simpósio de Microbiologia da UFMG – Microbiologia Translacional: Do ambiente natural às aplicações biotecnológicas, 2015.
2. **OLIVEIRA, L. V. N.** I Simpósio de Microbiologia da UFMG - A Microbiologia e a Sociedade, 2014.

➤ **Atividades acadêmicas**

Participação em banca de trabalhos de conclusão de curso de especialização

1. **OLIVEIRA, L.V.N.**; Santos, JRA. Participação em banca de André Luiz Carneiro Gomes. “Micoses superficiais: resistência fúngica e agentes terapêuticos”, 2014. Monografia de conclusão de curso de especialização, Programa de Pós-Graduação, Especialização em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientações e supervisões concluídas

1. Raquel Bruneli de Resende. “Onicomicoses e a Terapia Fotodinâmica”, 2015. ***Co-orientação:*** **Lorena Vívien Neves de Oliveira.** Monografia de conclusão de curso de especialização, Programa de Pós-Graduação, Especialização em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais.