

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

BIANCA LETÍCIA ROCHA

**ESTUDO DO EFEITO DOS ANTÍGENOS IMUNOMODULADORES DE
Phythium insidiosum EM MODELO MURINO COM CRIPTOCOCOSE
EXPERIMENTAL.**

Belo Horizonte – MG

2016

BIANCA LETÍCIA ROCHA

**ESTUDO DO EFEITO DOS ANTÍGENOS IMUNOMODULADORES DE
Phythium insidiosum EM MODELO MURINO COM CRIPTOCOCOSE
EXPERIMENTAL.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Virgínia
Rocha Vilela - UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Daniel de Assis
Santos - UFMG

Belo Horizonte - MG

2016

Dedico este trabalho a Deus, à minha família, em especial aos meus amados pais, Hamilton e Odete, e ao meu querido marido, Alexandre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, fé, perseverança, e, por sempre prover milagres e bênçãos na minha vida.

Aos meus amados pais, Hamilton e Odete Rocha, por todo amor, dedicação, ensinamentos, apoio, confiança, incentivo e por sempre acreditar em mim. Além disso, por ter me dado uma família muito abençoada e feliz. Pai e mãe, contem comigo para tudo. Espero assisti-los nas suas necessidades, proporcionando-lhes o repouso na velhice, cercá-los de solicitude, como vocês sempre fizeram por mim e por meus irmãos na nossa infância. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Patrick e Diego, por todo o carinho, companheirismo, amizade, lealdade e apoio. Vocês são uma parte de mim! São os responsáveis pelo meu sorriso fácil e bom humor. Vocês me ensinaram a rir e ver a beleza nas menores e singelas coisas.

Ao meu marido, Alexandre, por saber me ouvir, levar em consideração a minha opinião, por decidir junto, entender o porquê, por me querer sempre perto, por me fazer rir, apoiar, ensinar, ser leal, reconhecer e aceitar meus erros, proteger-me, entender-me e respeitar-me.

A minha querida orientadora, amiga, Prof^a. Dr^a. Raquel Virgínia Rocha Vilela que se dedica com amor à profissão que abraçou. Na realidade, coloca amor em tudo o que faz. E, distribui amor a todos. Por onde caminha, deixa seu rastro de alegria. Professora, obrigada por me fazer acreditar que conseguiria concluir este trabalho e confiar em mim para a realização do mesmo, pelos seus ensinamentos, pela paciência, e, pela constante ajuda. Obrigada por aceitar me orientar. Você é, e sempre será, um exemplo para mim. O seu incentivo fez toda a diferença para a realização deste trabalho. A Senhora é a responsável pela minha escolha pela Microbiologia. O seu amor e entusiasmo pelo ensino, somados à alegria e ao carisma, são altamente contagiosos.

Ao professor, Dr. Leonel Mendoza, pelo exemplo de pesquisador. Obrigada pela enorme paciência e disponibilidade. Obrigada porque mesmo em terras tão distantes, fez-se tão próximo. Obrigada pela imensa colaboração na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador professor, Dr. Daniel de Assis Santos, que me aceitou em seu laboratório, que confiou em mim e no meu trabalho. Por inúmeras vezes, paciente e incansavelmente assentou-se comigo, esclarecendo as minhas dúvidas. Também demonstrou amizade e compreensão nos momentos difíceis. Obrigada por me ajudar na realização deste trabalho e nos próximos que ainda virão.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Análises e Toxicológicas, Prof. Dr. Vicente Toledo, por ter aceitado me avaliar neste trabalho, pela disponibilidade e ajuda, e, às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação, Ângela e Andrea, pela prontidão em me auxiliar ao longo de todo esse processo.

À professora, Dr^a. Maria Aparecida Resende Stoianoff, que, também, gentilmente, recebeu-me no seu laboratório, pelos seus ensinamentos, apoio, e também por aceitar me avaliar neste trabalho.

Aos grandes amigos Lorena, Noelly, Hellem, Alide, Douglas, Rafael por me ajudarem nos meus experimentos, pela amizade, pelo bom humor, carinho, paciência, apoio, positividade... Vocês são maravilhosos!

Aos amigos do Departamento de Microbiologia e do Instituto de Ciências Biológicas, Dani, Ju, Guga, Lud, Marli, Thais, Val, Anderson, Elu, Rodrigo, e Vanessa, pela acolhida e por toda ajuda nos experimentos.

Às minhas amigas e companheiras de Mestrado, Darly, Mariana, Marcela, Tatiana e Michele, pelo companheirismo e prontidão em me ajudar sempre que preciso.

Aos meus colegas de trabalho da Instituição Nova Faculdade, por fazer do meu trabalho um local agradável e divertido.

À Faculdade de Farmácia e ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais por fornecerem condições para a realização desse trabalho.

*Confesso minha insegurança
Minha ansiedade...
Senti seu caminhar de longe...
Com agradecimento em minha alma,
fui suportada, pelo amigo pesquisador.
O quanto aprendi nesta caminhada?
Seria imensurável utilizar qualquer tipo de expressão...
Como nuvens brancas que transformam, e, a cada hora
mostram formas diferentes...
Vivi com a nuvem mais Bianca, emoções indescritíveis.
Seu sorriso acolhedor,
nossas reflexões, e, aprendizados tão intensos,
que às vezes essas nuvens choraram...
A chuva que esvaiu lavou nossas mentes...
E, de repente, lá estava o novo formato da nuvem branca, tão Bianca...
Obrigada pela oportunidade caleidoscópica, das observações realizadas
por nós duas, neste nosso céu azul!*

Raquel Vilela

RESUMO

O objetivo central deste trabalho foi testar as propriedades imunomoduladoras dos antígenos de *Pythium insidiosum*. Avaliar se estas proteínas poderiam diminuir o tempo de tratamento com anfotericina B em um modelo animal de *Cryptococcus gattii*. Vários relatos na literatura descrevem que cães, cavalos, e seres humanos com pitiose, causada por *P. insidiosum*, desenvolvem nos tecidos infectados uma resposta típica Th2, com eosinófilos, mastócitos e células gigantes. Esta reação inflamatória é substituída por uma resposta Th1 em cavalos infectados com os imunógenos de *P. insidiosum* resultando na cura da infecção. Os trabalhos evidenciam que os imunógenos de *P. insidiosum* não só tiveram um impacto positivo sobre os casos de pitiose, mas também sobre doenças que exibem uma franca resposta Th2, tais como: alergias de pele, sarcoidose equina, mastite e outros. “Desafortunadamente, ainda não foram desenvolvidos testes das propriedades imunomoduladoras em um modelo animal com pitiose. Para explorar novos paradigmas, no presente estudo foi proposto o uso de camundongo C57BL/6 inoculados com *C. gattii* como um modelo animal para avaliar se a inoculação intraperitoneal dos imunógenos de *P. insidiosum* poderiam aumentar a taxa de sobrevivência no modelo acima mencionado, tratados com anfotericina B e/ou com o imunomodulador. Os dados obtidos mostraram que os animais inoculados toleraram bem o imunomodulador. Efeitos colaterais relacionados aos imunógenos de *P. insidiosum* não foram observados. Um aumento estatisticamente significativo no número de células fagocíticas foram encontrados nos camundongos inoculados com *C. gatti* e depois com anfotericina B e o imunomodulador. Este resultado é fortemente apoiado pelo incremento nos glóbulos brancos reportados em casos de cura de pitiose em humanos e em animais inferiores. A descoberta também está de acordo com o aumento significativo observado no índice de proliferação intracelular (IPR), espécies reativas de oxigênio (ROS) e os níveis de peroxinitrito (PRN) em camundongos inoculados com o imunomodulador. Os resultados sugerem que o imunomodulador apresenta um impacto positivo no sistema imunitário inato dos camundongos inoculados. Curiosamente, existe um contraste dos dados acima, com a taxa de sobrevivência, a qual não mostra diferença entre os controles e os camundongos inoculados apenas com o

imunomodulador. Porém, a combinação da anfotericina B e o imunomodulador em cultura apresentaram o menor número de unidades formadoras de colônias (CFU), com um resultado estatisticamente significativo. Este resultado sugere que a redução em CFU em camundongos inoculados com anfotericina B em combinação com imunomodulador foi possível devido a um sinergismo combinado entre o antifúngico e o imunomodulador. Os achados histopatológicos mostraram elevados números de células leveduriformes nos pulmões infectados com poucas células linfocitárias mononucleares. Em contraste, o cérebro mostrou escassas células leveduriformes com alterações patológicas sugerindo meningoencefalite. Este resultado apoia a ideia de que o modelo Th1 mais o imunomodulador poderiam acionar positivamente a resposta Th1 do modelo C57BL/6. No entanto, a resposta Th1 não foi suficiente para eliminar o agente patogênico, mas suficiente para provocar a reação linfocitária nos tecidos infectados (Th1). Até onde sabemos, não há relatos na literatura sobre o uso de uma combinação de drogas antifúngicas e o imunomodulador de *P. insidiosum*. Este estudo abre várias opções sobre a possível utilização deste imunomodulador em doenças com resposta Th2 típica. Os resultados deste estudo poderiam servir como um preâmbulo positivo para testar o imunomodulador em outros modelos.

Palavras-chave: *Cryptococcus gattii*; Criptococose; *Pythium insidiosum*; Pitiose; imunomodulador; imunoterapia.

ABSTRACT

The central objective of this investigation was to test if the immunomodulatory properties of *Pythium insidiosum* antigens could decrease the time of treatment with amphotericin B in an animal model of *Cryptococcus gattii*. It had been reported that dogs, horses and humans with pythiosis, caused by *P. insidiosum*, developed in the infected tissues a typical Th2 response, with eosinophils, mast cells and giant cells. This inflammatory reaction switched to a Th1 subset in horses injected with *P. insidiosum* immunogens resulting in the cure of the infection. Soon it was evident that *P. insidiosum* immunogens not only had a positive impact on pythiosis cases, but also on diseases that triggered a Th2 such as: skin allergies, equine sarcoid, mastitis and others. However, the testing of its immunomodulatory properties in an animal model of pythiosis had been unsuccessful. Thus, in this study we proposed the use a C57 BL/6 mouse inoculated with *C. gattii* as an animal model to evaluate if the intraperitoneal injection of *P. insidiosum* immunogens can increase the rate of survival in the above model treated with both, amphotericin B and the immunomodulator. The collected data showed that the injected animals tolerated well the immunomodulator. Side effects related to *P. insidiosum* immunogens were not observed. A statically significant increase in the number of phagocytic cells on mice challenged with *C. gattii* and then injected with amphotericin B and the immunomodulatory. This result is strongly supported by the increment in white blood cells recorded in cure cases of pythiosis in humans and lower animals. This finding is also in agreement with the significant increase observed in the intracellular proliferation index (IPR), reactive oxygen species (ROS) and the peroxy nitrite levels in mice injected with the immunomodulator. The results suggest that immunomodulator as a positive impact in the innate immune system of the injected mice. Interestingly, the above data contrast with the survival rate, showing not difference between the controls and the mice injected only with the immunomodulator. Interestingly, the combination of both amphotericin B and the immunomodulator showed in culture the lowest number of colony forming units (CFU), a result that had statistical support. This finding suggests that the decrease in CFU in mice inoculated with amphotericin B in combination with immunomodulator, was possibly due to combine synergism

between the antifungal and the immunomodulator. Histopathological findings showed high number of yeast cells in the infected lungs with isolated mononuclear lymphocytic cells. In contrast, the brain showed few yeast cells with pathological changes suggesting meningoencephalitis. This result supports the idea that the Th1 model plus the immunomodulator could enhance the Th1 response of the C57BL/6 model. However, the Th1 response was not enough to eliminate the pathogen, but sufficient to maintain lymphocytic reaction in the infected tissues (Th1). As far as we know, there are no reports in the literature on the use of a combination of antifungal drugs and *P. insidiosum* immunomodulator. Our study opens several options on the possible use of this immunomodulator to increase survival of animals with Th2 diseases and the future of *Pythium*-immunotherapy in mammalian hosts. We hope the results of this study could serve as a good preamble to test new models.

Keywords: *Cryptococcus gattii*; Cryptococcosis; *Pythium insidiosum*; Pythiosis; immunomodulator; immunotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do <i>C. gattii</i>.	25
Figura 2 – <i>Cryptococcus gattii</i> sob o microscópio.	26
Figura 3 – Sorotipos e genótipos das espécies do gênero <i>Cryptococcus spp.</i>	27
Figura 4 – Distribuição dos tipos moleculares de <i>C. gattii</i> no Brasil.	31
Figura 5 – Criptococose pulmonar, cerebral e cutânea.	33
Figura 6 – Epidemiologia da infecção e patogênese induzida pelo <i>Cryptococcus</i>.	34
Figura 7 – Estratégias usadas por <i>Cryptococcus</i> para atravessar a barreira-hematoencefálica.	36
Figura 8 – Liberação dos fatores de virulência pelas espécies de <i>Cryptococcus</i>.	40
Figura 9 – Papel das células dendríticas em induzir e regular a imunidade adaptativa.	42
Figura 10 – O <i>Pythium insidiosum</i>	47
Figura 11 – Possível mecanismo de ação proposto para os antígenos do <i>Pythium insidiosum</i>.	46
Figura 12 – Ensaio de fagocitose.	67
Figura 13 – Ensaio de ROS e PRN .	68
Figura 14 – Padronização da via de administração.	70
Figura 15 – Curva de sobrevida comparando os antifúngicos anfotericina b e fluconazol.	72
Figura 16 – Curva de sobrevida utilizando o antifúngico anfotericina B.	73
Figura 17 – Contagem de unidades formadoras de colônia no Lavado broncoalveolar.	74
Figura 18 – Contagem de unidades formadoras de colônia no cérebro.	75
Figura 19 – Contagem de unidades formadoras de colônia nos tecidos pulmonares.	76
Figura 20 – Contagem de células a partir do lavado broncoalveolar.	76
Figura 21 – Anatomopatológico de pulmão dos camundongos C57BL/6.	78
Figura 22 – Anatomopatológico de cérebro dos camundongos C57BL/6.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos fármacos selecionados para os experimentos	54
Tabela 2 - Padronização da via terapêutica mais adequada para o imunomodulador.	60
Tabela 3 - Avaliação da combinação do imunomodulador e os antifúngicos inoculados em camundongos C57/BL/6	61
Tabela 4 - Procedimento para avaliação da combinação do imunomodulador ao antifúngico.	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FC	5 fluocitosina
ANF B	Anfotericina B
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BALF	Lavado Broncoalveolar
BHE	Barreira hematoencefálica
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm	Centímetro
CMI	Resposta imune celular
CG	<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>
CNN	<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
FLUCO	Fluconazol
GalXM	Galactoxilomanana
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucinas
IPR	Índice de proliferação intracelular
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
LB	Linfócito B
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NK	Células <i>natural killer</i>
PA	Padrão analítico
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PAS	Periodic Acid Schiffit

PBS	Tampão fosfato salino
PRN	Peroxinitrito
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SC	Via subcutânea
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema nervoso central
SOD1	Enzimas superóxido dismutase 1
SOD2	Enzimas superóxido dismutase 2
Th0	Linfócitos T auxiliares
Th1	Resposta imunológica tipo Th1
Th2	Resposta imunológica tipo Th1
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Espécies patogênicas do gênero Cryptococcus	24
2.2 Cryptococose	29
2.3 Imunologia da criptococose e fatores de virulência	37
2.4 Tratamento da criptococose e suas implicações	43
2.5 Uso de antígenos somáticos de pythium insidiosum como agentes imunomoduladores no tratamento da pitiose e doenças com uma reação inflamatória tipo th2	45
3. OBJETIVOS	51
3.1 Geral	52
3.2 Específicos	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 Animais experimentais	55
4.2 Linhagens de Cryptococcus gattii e condições de cultivo	55
4.3 Fármacos utilizados	55
4.4 Preparo do Inóculo Fúngico	56
4.5 Infecção Intratraqueal	56
4.6 Ensaio de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e espécies reativas de Oxigênio (ROS)	56
4.7 Inoculação do imunodulador de P. insidiosum em camundongos para avaliar toxicidade.	59
4.8 Curva de sobrevida para a padronização da via terapêutica mais efetiva	59
4.9 Avaliação da combinação do imunomodulador com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol	60
4.10 Tratamento do modelo animal para realização dos seguintes testes: contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), contagem total e	

diferencial de células a partir do Lavado broncoalveolar (LBA), fagocitose "in vivo" em LBA e a realização da análise histológica.	61
<u>4.10.1 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)</u>	62
<u>4.10.2 Contagem total e diferencial de células a partir do Lavado broncoalveolar (LBA)</u>	63
<u>4.10.3 Ensaio de fagocitose "in vivo" a partir do lavado broncoalveolar (LBA)</u>	63
<u>4.10.4 Análise histológica</u>	63
4.11 Análise estatística dos dados	65
5 RESULTADOS	66
5.1 Testes de fagocitose, espécies reativas de oxigênio (ROS) e proliferação celular (IPR)	67
5.2 Toxicidade do imunomodulador	69
5.3 Curva de sobrevida de camundongos infectados com <i>C. gattii</i>, submetidos a diferentes vias de tratamentos	70
5.4 Avaliação da curva de sobrevida dos camundongos tratados com a combinação imunomodulador + anfotericina B e imunomodulador + fluconazol	71
5.5 Avaliação da ação sinérgica do imunomodulador com a anfotericina B	74
<u>5.5.1 Contagem de células a partir do Lavado broncoalveolar (LBA)</u>	77
5.6 Análise histopatológica	78
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÃO	94
8 PERSPECTIVAS	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

A criptococose é uma doença fúngica sistêmica potencialmente fatal, causada por leveduras basidiomicéticas ambientais, encapsuladas e afeta homens e animais (Negroni, 2012). Apresenta duas principais espécies patogênicas para o homem e animais inferiores, o *Cryptococcus neoformans var. neoformans* (CNN) e o *Cryptococcus gattii* (CG) (Li e Mody, 2010). O CNN está distribuído mundialmente na natureza, sendo isoladas de fezes secas de pombos, aves, matéria orgânica em decomposição (madeira principalmente) e solo, e é reconhecida por causar doença predominantemente em imunossuprimidos (Lin e Heitman, 2006; Negroni, 2012). Em contraste, o CG encontra-se associado às árvores e tradicionalmente causa doença em hospedeiros imunocompetentes (Chaturvedi e Chaturvedi, 2011; Lester *et al.*, 2011). A infecção se instala por via de inalação dos esporos ou leveduras dessecadas presentes no ambiente (Sabiiti e May, 2012). Ambas as espécies causam meningoencefalite, podendo ser acompanhada ou não, de lesão pulmonar evidente, e, em caso de criptococemia, as leveduras podem disseminar-se para vários órgãos (Severo *et al.*, 2009). Anualmente, cerca de 1 milhão de pessoas são afetadas por espécies de *Cryptococcus* no mundo (Prates *et al.*, 2013), sendo que, 60% dos pacientes com a doença morrem nos três primeiros meses após o diagnóstico (Sabiiti e May, 2012). Aproximadamente 600.000 mortes por ano são atribuídas a casos de criptococose (Pappas, 2013; Hagen *et al.*, 2015).

Recentemente, a doença tem ganhado destaque mundial em virtude de sua crescente incidência. Acredita-se que este fato se deve ao aumento no número de indivíduos submetidos a transplantes de órgãos, ao uso de medicamentos imunossupressores necessários para evitar possível rejeição ao transplante, e também em virtude do aumento de idosos que apresentam, na sua maioria, tendência a desenvolver problemas imunológicos (Mcmullan, Sorrell e Chen, 2013). Além disso, observa-se um aumento no número de portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e, nestes casos, a criptococose acontece principalmente no sistema nervoso central (SNC) (Mitchell e Perfect, 1995; Negroni, 2012; McMullan, Sorrell e Chen, 2013).

Também, nas duas últimas décadas, observa-se um aumento no número de indivíduos que apresentam doenças que evoluem para distúrbios imunológicos (diabetes, câncer, SIDA e muitas outras). Segundo Trilles *et al.* (2008), o CG causava doença principalmente em regiões tropicais e subtropicais e no Brasil, com predomínio nas regiões Norte e Nordeste. No entanto observa-se que o micro-organismo está em expansão geográfica com surtos no Canadá, Austrália e nos Estados Unidos da América (EUA) (Cannon *et al.*, 2009; Li e Mody, 2010; Voelz e May, 2010; Chaturvedi e Chaturvedi, 2011; Ngamskulrunroj *et al.*, 2012; Mortenson *et al.*, 2013).

Segundo Hagen *et al.* (2013) os surtos mais notórios são os da Columbia Britânica, Vancouver (Canadá), Ilhas do Pacífico e crianças no norte do Brasil (Correa Mdo *et al.*, 1999). Apesar de não existirem dados concretos, acredita-se que variações climáticas como o aquecimento global e ciclones facilitaram a dispersão deste agente (Hagen *et al.*, 2013).

Quando se compara as alterações histopatológicas causadas por CG com aquelas observadas em CNN, encontra-se que as lesões desenvolvidas por CG são geralmente de decurso granulomatoso (criptococomas), tanto no pulmão quanto no cérebro. Apresenta também maior incidência de lesões cerebrais e hidrocefalia, com sintomas mais prolongados e com associação de sequela neurológica. Além disso, sua morbidade é aumentada devido à baixa resposta à terapia antifúngica. Outro fator descrito no hospedeiro, trata do fato que a infecção por CG apresenta um pior prognóstico quando comparado ao CNN, possivelmente porque esta espécie acomete indivíduos imunocompetentes. Por este motivo, a hipótese para o diagnóstico clínico é tardia (Datta, Bartlett e Marr, 2009; Chen, Meyer e Sorrell, 2014).

No Brasil, existem extensas áreas plantadas de árvores de Eucaliptos, estimam-se cerca de 3,5 milhões de hectares. Com destaque para o estado de Minas Gerais (cujo território abrange uma área de 588.384,30 km²), sendo o quarto estado mais extenso do Brasil. Aproximadamente, 2% do seu território são ocupados com Eucaliptos, destinados à produção de lenha, carvão vegetal,

madeira para celulose e madeira serrada (Macdougall *et al.*, 2011). Em decorrência deste fato, uma grande parte da população de Minas Gerais (MG) apresenta a possibilidade de entrar em contato com CG, pois estão mais expostos ao micro-organismo por meio de atividades laborais. Portanto, trabalhadores do campo e extratores de madeira estariam mais susceptíveis à infecção por CG por meio da inalação dos propágulos fúngicos presentes neste ambiente. Sua ubiquidade no ambiente é interessante, uma vez que as leveduras nestes locais podem entrar em contato com agroquímicos que poderiam alterar o seu perfil de resistência às drogas antifúngicas utilizadas na clínica rotineiramente (Comunicação pessoal de Carneiro, 2016).

Atualmente a opção terapêutica disponível para o tratamento da criptococose sistêmica consiste na utilização de Anfotericina B e/ou a combinação desta com a 5-Flucitocina, Fluconazol ou Itraconazol (Santos *et al.*, 2014; Espinel-Ingroff e Kidd, 2015). É notável que as opções terapêuticas são reduzidas, e também apresentam vários inconvenientes, entre os quais destacam-se: os efeitos adversos da Anfotericina B (o principal antifúngico utilizado para o tratamento da criptococose sistêmica) como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Zhai e Lin, 2011; Santos *et al.*, 2012). Outro fator negativo é que, em continentes em desenvolvimento, como a África, onde coincidentemente apresenta a maior incidência mundial da doença, este medicamento não está disponível em virtude do seu alto custo (Chen, Meyer e Sorrell, 2014). Outro fato importante, é que o tratamento pode estender-se de meses a anos. Conseqüentemente, antifúngicos como o Fluconazol (amplamente utilizado para manutenção de tratamento nas recidivas) e a 5-Flucitocina (quando utilizada individualmente) apresentam uma tendência à seleção de cepas resistentes (Cannon *et al.*, 2009; Shapiro, Robbins e Cowen, 2011; Chen *et al.*, 2013). O Itraconazol, por sua vez, não é solúvel e, portanto, não penetra a barreira hematoencefálica (Chen *et al.*, 2013).

Diante destes fatores, novas abordagens terapêuticas são necessárias para o tratamento de pacientes com criptococose sistêmica. Nos últimos anos, estudos que envolvem imunoterapia têm demonstrado resultados interessantes

no tratamento de infecções por: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Phytium insidiosum* dentre outros (Dixon *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2011; Travassos e Taborda, 2012; Ravikumar, Win e Chai, 2015)

Um imunógeno obtido a partir das proteínas imunomoduladoras de *Phytium insidiosum* (PYT), aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), já está sendo empregado para o tratamento da Pitiose, com resultados satisfatórios. Estudos mostram que 60% dos casos sistêmicos de pitiose em humanos na Tailândia e caninos dos USA evoluíram para a cura (Hensel *et al.*, 2003; Thitithanyanont *et al.*, 1998). Em cavalos, a imunoterapia tem apresentado 80% de efetividade (Mendoza e Newton 2005). Baseando-se na cura observada com os antígenos de PYT, acima descrita, formulou-se a hipótese, de que estes imunógenos poderiam ser utilizados para estimular uma resposta inflamatória Th1 (Gaastra *et al.*, 2010; Mendoza e Netwton 2005) tão necessária para a cura das doenças fúngicas (Blanco e Garcia, 2008; Dixon *et al.*, 1998).

É sabido que a pitiose subcutânea e sistêmica desenvolve uma resposta inflamatória do tipo Th2, com a produção de interleucinas (IL) IL5, IL10 e IL4, com franca expressão eosinofílica e mastocítica (Mendoza e Newton 2005; Thitithanyanont *et al.*, 1998). Após a aplicação dos antígenos imunomoduladores do PYT em humanos e animais afetados pela doença, evidenciou-se que citocinas do tipo IL2 e IFN gama foram estimuladas, e que estas induziram uma forte resposta inflamatória do tipo Th1. Esta interleucina (IFN) é tão fortemente estimulada que o aparelho imune regula negativamente, montando uma resposta Th1, tornando o ambiente, no tecido do hospedeiro, inóspito para a sobrevivência do micro-organismo. O relato acima sumariza o fundamento da imunoterapia com a utilização dos imunógenos reguladores de *P. insidiosum* (Bach *et al.*, 2010; Mendoza e Netwton 2005; Santurio *et al.*, 2003).

De acordo com essas premissas pergunta-se: qual seria o efeito observado com a utilização das proteínas imunomoduladoras, obtidas a partir de *P. insidiosum*, administradas isoladamente ou combinadas com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol em modelo murino com criptococose experimental? Neste contexto, o presente estudo tem como principal objetivo avaliar a eficácia do imunomodulador obtido do micro-organismo *P. insidiosum* em modelos murinos de criptococose por *C. gattii*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

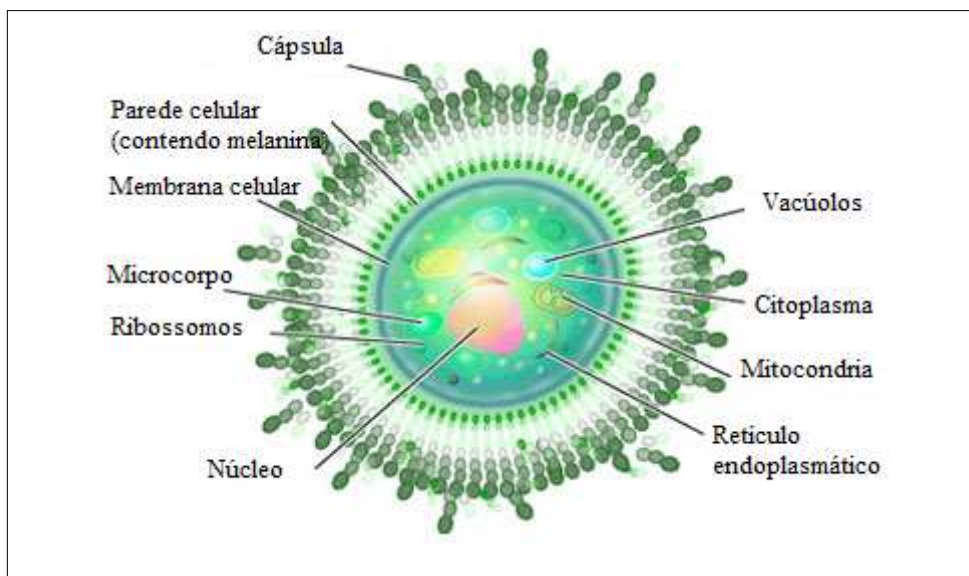
2.1 Espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*

Cryptococcus é um gênero polifilético que contém pelo menos 37 espécies diferentes localizado no reino Fungi, filo Basidiomycota, classe *Tremellomycetes*, e ordem *Tremellales* (Fell *et al.*, 2000; Findley *et al.*, 2012; Chen, Meyer e Sorrell, 2014).

Cryptococcus spp é encontrado normalmente na natureza, consiste em uma levedura arredondada que em geral não tem cápsula, seu diâmetro atinge apenas 1 a 3 μm o que facilita a sua penetração através dos alvéolos pulmonares. Ao passo que leveduras encapsuladas podem variar de 10 a 60 μm (consideradas de grande tamanho) o que poderia dificultar a sua penetração nos pulmões (Lin e Heitman, 2006; Kronstad *et al.*, 2011; Lester *et al.*, 2011).

Essas leveduras possuem características morfológicas de célula eucariota, com núcleo simples circundado por uma dupla membrana com poros e com nucléolo no seu interior. O citoplasma contém organelas, incluindo: mitocôndrias, vacúolos, retículo endoplasmático liso e rugoso, ribossomos, grânulos de reserva contendo lipídios e glicogênio (Perfect e Casadevall, 2002; Li e Mody, 2010). Apresenta uma cápsula de polissacarídeo que é constituída por uma rede de microfibrilas. A produção de cápsula é uma característica que diferencia *Cryptococcus spp* das demais leveduras de importância médica. A cápsula está intimamente associada à parede celular, estrutura também essencialmente composta de polissacarídeos (Chaturvedi e Chaturvedi, 2011; Prates *et al.*, 2013). A parede celular proporciona rigidez, protege esta do estresse ambiental e lise osmótica (Srikanta, Santiago-Tirado e Doering, 2014). Os constituintes da célula de *C. neoformans* estão representados na (**Figura 1**).

Figura 1 – Estrutura do *C. gatti*.



Representação esquemática da célula de *Cryptococcus spp.*

Fonte: (Li e Mody, 2010).

Nos tecidos afetados, é normalmente encontrado como uma levedura esférica com parede celular rígida, apresentando um ou mais brotos, e/ou blastoconídios (**Figura 2a**) (Negroni, 2012). Em geral, encontra-se rodeada por uma cápsula translúcida polissacarídica que transpõe o diâmetro da célula leveduriforme (**Figura 2b**). A presença da cápsula no gênero *Cryptococcus* é uma característica única no reino dos fungos (Voelz e May, 2010). A cápsula é constituída por Glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas, sendo que o GXM é o principal constituinte. As diferenças estruturais do polímero formado a partir destes constituintes são a base antigênica para a classificação sistemática dos sorotipos descritos posteriormente (Voelz e May, 2010).

Figura 2 – *Cryptococcus gattii* sob o microscópio.



(a) Células leveduriformes arredondadas apresentando um ou mais brotos ou blastoconídios.
(b) Células leveduriformes demonstrando a presença típica de cápsulas em tecidos do hospedeiro.

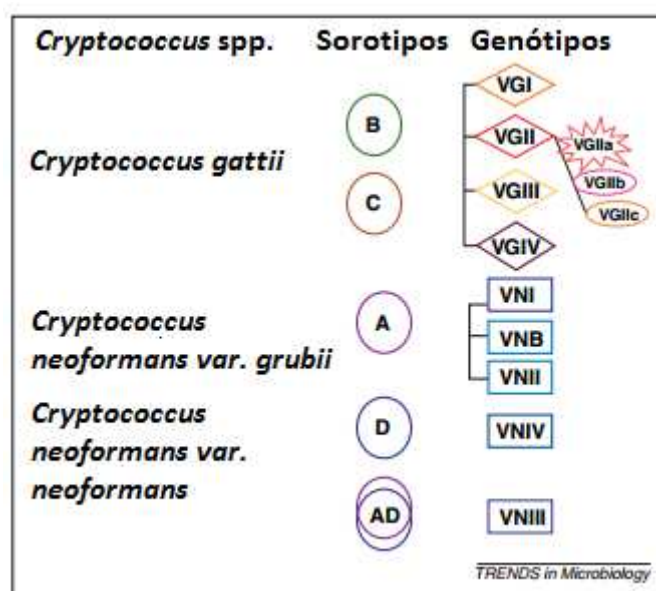
Fonte: Chaturvedi, 2011.

O micro-organismo cresce facilmente em meios de cultura de rotina como Ágar Sabouraud dextrose. Após 3 a 4 dias de incubação, tanto a 28°C e 37°C, há o crescimento de colônias lisas com uma aparência mucóide, que, inicialmente são de cor branca e, posteriormente, observa-se coloração marrom claro. O exame microscópico revela a presença de elementos leveduriformes encapsulados, alguns com brotamento pequenos e/ou bem desenvolvidos. Cultura em ágar sangue e ágar chocolate, incubados a 37°C com 10% de dióxido de carbono (CO₂) favorece o desenvolvimento da cápsula (Negroni, 2012). Ambas as espécies não fermentam. Assimilam inositol e creatinina, produzem melanina e crescem a 37°C em Ágar Sabouraud dextrose e são inibidos quando cultivados em Agar Mycosel[®] (Mitchell e Perfect, 1995; Lester *et al.*, 2011). No entanto as duas espécies podem ser diferenciadas pela assimilação de malato ou glicina; resistência a canavanina; inibição da enzima

desaminase de creatina e outras reações bioquímicas características para o *C. gattii*. O CNN, por sua vez, hidrolisa a uréia (Mitchell e Perfect, 1995).

Segundo VOELZ E MAY (2010), estas duas espécies foram classificadas inicialmente como variedades da mesma espécie. Baseados em reações capsulares sorológicas, quatro sorotipos denominados A, B, C e D além do híbrido AD foram propostos. Porém com avanços nos estudos moleculares e análise genômica o *C. gattii* (anteriormente denominado *C. neoformans* sorotipo B e C) foi recentemente classificado como uma espécie independente (Chayakulkeeree e Perfect, 2006). As espécies de interesse clínico são: *C. gattii* e *C. neoformans*. As duas espécies são divididas em oito tipos moleculares designados como *C. neoformans* VNI, VNII, VNIII e VNIV e *C. gattii* VGI, VGII, VGIII e VGIV nos quais, VGI e VGII são os tipos moleculares mais prevalentes, enquanto, VGIII e VGIV são mais raros (**Figura 3**) (Chayakulkeeree e Perfect, 2006; Li e Mody, 2010; Byrnes *et al.*, 2011; Chaturvedi e Chaturvedi, 2011; Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012).

Figura 3 – Sorotipos e genótipos das espécies do gênero *Cryptococcus spp.*



Esquema mostrando diferentes sorotipos e genótipos das principais espécies do gênero *Cryptococcus spp.*: *C. gattii* e *C. neoformans*.

Fonte: Chaturvedi e Chaturvedi, 2011.

Em relação ao habitat natural do *Cryptococcus spp.* alguns estudos relatam que há variação e que esta depende da espécie envolvida. De uma maneira geral, as infecções por *C. neoformans* ocorrem no mundo inteiro e é uma importante causa de morbidade e mortalidade em hospedeiros imunocomprometidos, especialmente nos pacientes com enfermidades de fundo como a Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Este fungo é encontrado habitualmente nas fezes de pássaros (morcego, galinha, pombos, canários e periquitos) onde encontra compostos nitrogenados como ureia e creatinina (Lin e Heitman, 2006; Voelz e May, 2010; Leite *et al.*, 2012). Estes substratos permitem crescimento abundante e favorecem a formação de microfocos notadamente em centros urbanos, onde a exposição humana a esta espécie torna-se um evento do cotidiano (Ministério da Saúde, 2012). Normalmente, encontra-se elevada concentração de *C. neoformans* na poeira doméstica, o que promove a exposição de um maior risco à saúde humana e animal. Ademais, esta espécie de levedura também já foi isolada, no Brasil, em madeira em decomposição (Lazera, Wanke e Nishikawa, 1993; Lazera *et al.*, 1996).

O *C. gattii*, por sua vez, infecta pacientes hígidos (Lazera *et al.*, 1996) e é encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais, como na Austrália, África, Ásia, sul da Califórnia e na América do Sul, mas também já foi isolado em regiões temperadas. Seu habitat está relacionado a árvores do gênero *Eucalyptus*, onde essa espécie é encontrada na casca, em frutos e no solo, próximo às árvores. No Brasil, amostras de *C. gattii* foram isoladas, principalmente, a partir de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. gomphocephala* (Leite *et al.*, 2012; Chen, Meyer e Sorrell, 2014). Recentemente, (Brito-Santos *et al.*, 2015) encontraram *C. gattii* na poeira coletada de casas na região do Amazonas. Estes autores sugeriram que o fungo poderia ter alcançado a parte interna das habitações por meio dos materiais utilizados para a construção das casas. Esses dados são preocupantes, uma vez que *C. gattii* é causador da criptococose em indivíduos aparentemente hígidos.

2.2 Cryptococose

A criptococose também conhecida como Torulose, Blastomicose europeia, Doença de Busse-Buschke, é uma infecção fúngica sistêmica, provocada pela levedura encapsulada do gênero *Cryptococcus*. A fonte de infecção é exógena, e a entrada principal no organismo é através dos pulmões (Negroni, 2012).

O primeiro caso da infecção em humanos (criptococose) foi descrito em 1894 por Dr. Otto Busse, médico patologista alemão, que trabalhava no Instituto de Patologia da Universidade de Greifswald, na Alemanha. Ele observou pequenos “corpúsculos” arredondados e ovais em um espécime clínico obtido a partir de um osteosarcoma de Tíbia em uma mulher de 31 anos de idade, sendo identificado como *Saccharomyces neoformans*. Buschke foi o médico/pesquisador que assumiu o caso do paciente descrito por Dr. Busse. Também em 1984, Sanfelice, um cientista italiano que trabalhava no Instituto de Higiene da Universidade de Cagliari conseguiu isolar o fungo de uma fonte ambiental a partir de um suco de pêsego, e, recebeu o nome de *Saccharomyces neoformans*. Sanfelice reconheceu a similaridade reproduzindo a doença em cobaias (Li e Mody, 2010). Vuillemin em 1901 reclassifica taxonomicamente o fungo descrito por Busse e Sanfelice para o gênero *Cryptococcus*: *C. hominis* e *C. neoformans* (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

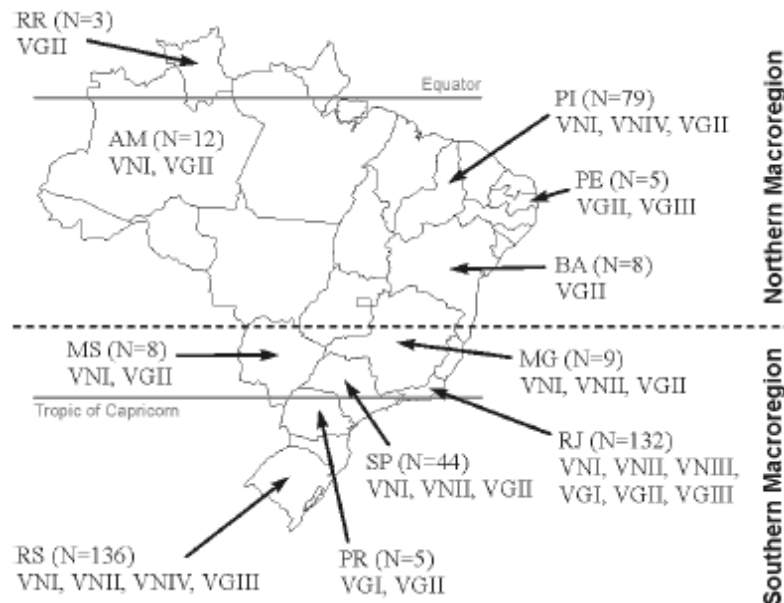
C. gattii foi somente descrito pela primeira vez em 1970 quando os pesquisadores Gattii e Eeckels, isolaram uma cepa de *C. neoformans* de um paciente com 7 anos de idade oriundo do Zaire (Republica do Congo) diagnosticado com leucemia e que também sofria de meningoencefalite (Ma e May, 2009). No ano de 1978, (Kwon-Chung *et al.*, 2014) determinaram que CNN e CG diferiam de forma considerável quanto as suas características morfológicas, bioquímicas e sorológicas (Lin e Heitman, 2006; Springer *et al.*, 2014)

No Brasil, segundo o Ministério da saúde (2012), a criptococose é a micose sistêmica que mais causou internações entre os anos de 2000-2007. Por ser

considerada, principalmente, uma infecção oportunista, essa micose acompanha os casos de aumento da população de risco, como pacientes com SIDA, em terapias contra leucemias e linfomas e que fazem uso contínuo de corticoides.

Um estudo epidemiológico realizado no Brasil por Trilles *et al* (2008), mostrou que a infecção na região Norte é endêmica para CG. As regiões sul e sudeste, por sua vez, mostram infecções esporádicas por este agente. Nestas regiões, a infecção por CNN foi a mais comum. Este estudo envolveu um total de 443 amostras sendo CNN (n = 320) e CG (n = 123) obtidas a partir de diferentes regiões brasileiras, representando 11 estados brasileiros (**Figura 4**). Foram utilizadas ferramentas moleculares para a caracterização do agente etiológico. Em geral, os tipos moleculares mais comuns foram VNI (64%) e VGII (21%), seguido por VNII (5%), VGIII (4%), e VIG VNIV (3% de cada), e VNIII (<1%). O tipo molecular VGIV não foi identificado entre os isolados brasileiros estudados. A meningoencefalite é a oitava causa mais comum de meningite nestas regiões e é responsável pela morbidade e letalidade de 37 a 49 % dos pacientes com este quadro (Ministério da Saúde, 2012) uma vez que o tratamento bem sucedido da meningoencefalite é difícil (Negrone, 2012; Franco-Paredes *et al.*, 2015). A **Figura 4** mostra a distribuição dos tipos moleculares de *C. gattii* no Brasil de acordo com os estados incluídos na análise.

Figura 4 – Distribuição dos tipos moleculares de *C. gattii* no Brasil.



Distribuição geográfica dos tipos moleculares de *Cryptococcus gattii* e o número de isolados no Brasil.

Fonte: Trilles *et al.*, 2008.

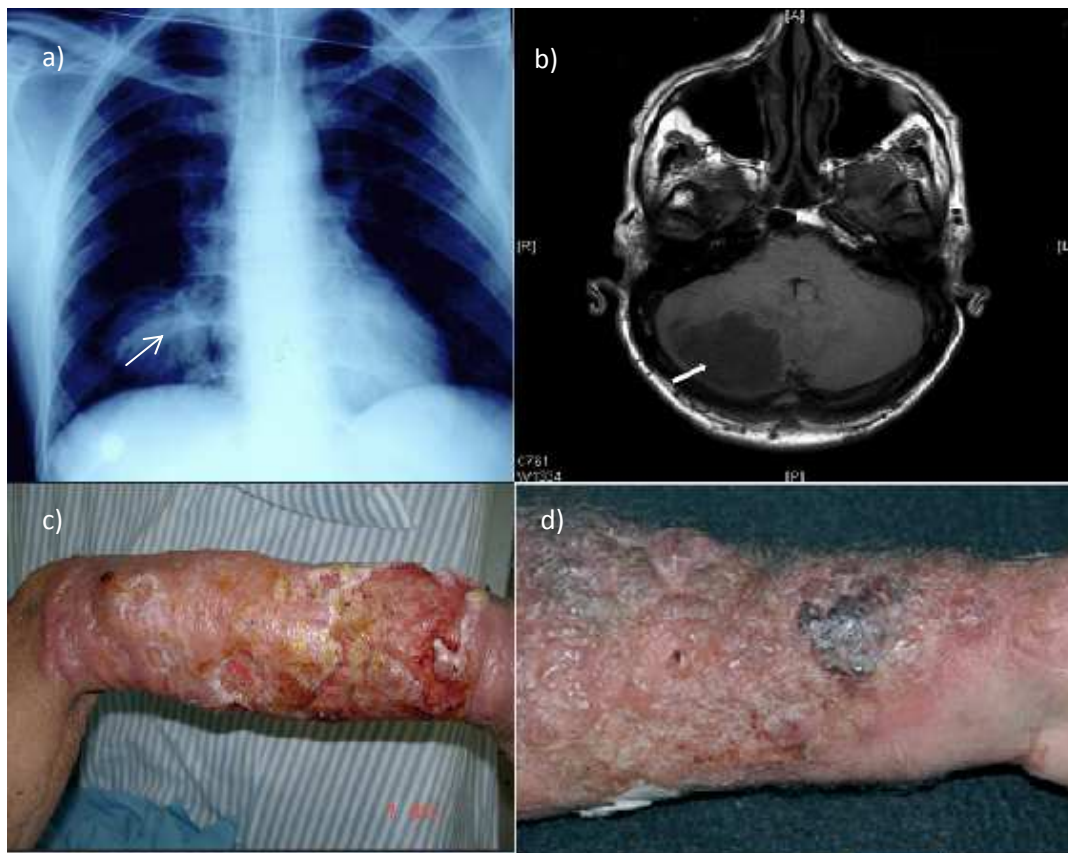
A criptococose ocorre com maior frequência em adultos, especialmente em indivíduos do sexo masculino (McClelland *et al.*, 2013), a maior prevalência nesse sexo parece estar relacionada à maior exposição dos homens ao reservatório ambiental do fungo, influências hormonais e/ou predisposição genética (Chen *et al.*, 2000). Recentemente McClelland *et al.* (2013), sugeriram que a interação entre *C. neoformans* e a testosterona poderia estar relacionada com a alta incidência em homens.

Acredita-se que a criptococose causada pelo CG seja mais complicada, uma vez que este fungo é clinicamente mais virulento do que CNN e apresenta uma tendência a causar múltiplas lesões nos pulmões e cérebro de pacientes afetados (Macdougall *et al.*, 2011). Segundo (Lacativa *et al.*, 2004) de forma semelhante a outros fungos patogênicos primários, o CG causa lesões disseminadas na pele e pulmões que podem ser potencialmente diagnosticadas como neoplasias. Além disso, as infecções cerebrais (meningoencefalite), causada por CG tendem a responder de forma mais lenta ao tratamento padronizado, e uma vez diagnosticadas estas infecções, exige-

se um acompanhamento maior se comparado com infecções acometidas por CNN (Perfect *et al.*, 2010). Outros dados preliminares sugerem que a gravidade da infecção por CG se dá em virtude da indução defeituosa das respostas imunes do hospedeiro, resultando em baixos níveis de citocinas Th1 como IL 2, INF que são cruciais para controlar a propagação do fungo no corpo (Voelz e May, 2010).

A infecção é adquirida pela inalação de basidiósporos e células dessecadas da levedura (Lin e Heitman, 2006; Severo *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2010). Por serem muito pequenas (1 a 3 μm), o fungo se deposita facilmente nos alvéolos pulmonares, gerando inicialmente uma infecção pulmonar localizada (**Figura 5a**), desencadeando mais tarde um quadro clínico de pneumonia (Kronstad *et al.*, 2011; Prates *et al.*, 2013). Na ausência de uma resposta imune eficaz, o fungo pode disseminar-se para outros órgãos (Datta, Bartlett e Marr, 2009) (**Figura 6**). Na **figura 5**, é possível observar as manifestações clínicas da criptococose no pulmão, cérebro e na pele e na, **figura 6**, observa-se a patogênese da criptococose.

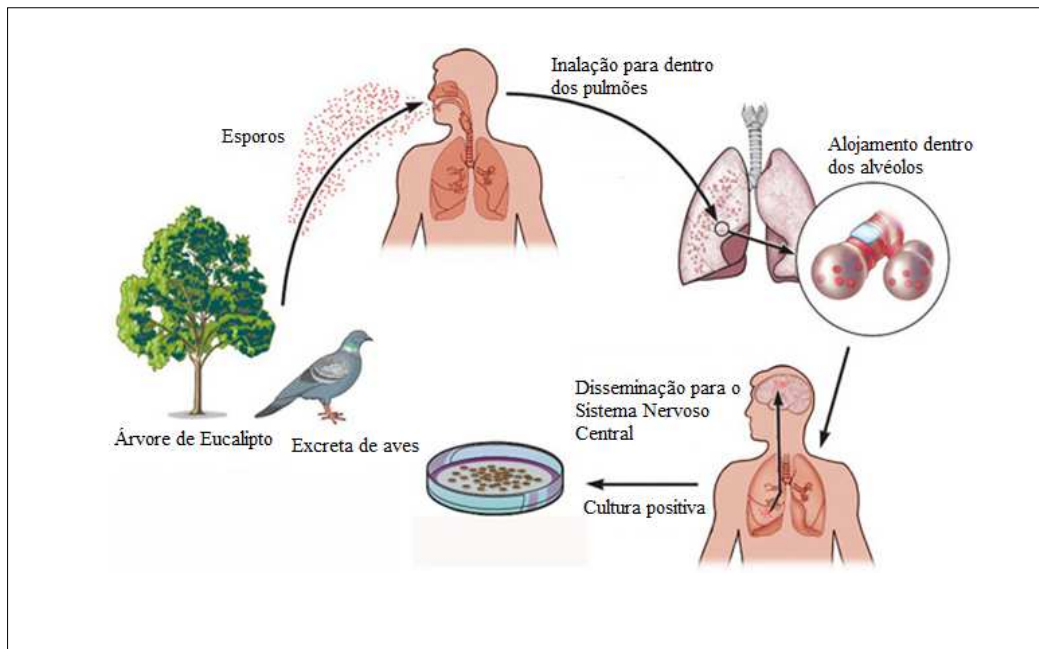
Figura 5 – Criptococose pulmonar, cerebral e cutânea.



(a) Criptococose pulmonar; (b) criptococose cerebral; (c) e (d) criptococose cutânea.

Fonte: Chen, Meyer, Sorrel., 2014; Belissimo-Rodrigues *et al.*, 2010, Marques *et al.*, 2012.

Figura 6 – Epidemiologia da infecção e patogênese induzida pelo *Cryptococcus*.



A figura mostra a epidemiologia da infecção, a patogênese induzida por *C. gattii* e *C. neoformans* em humanos, e seu posterior isolamento no laboratório.

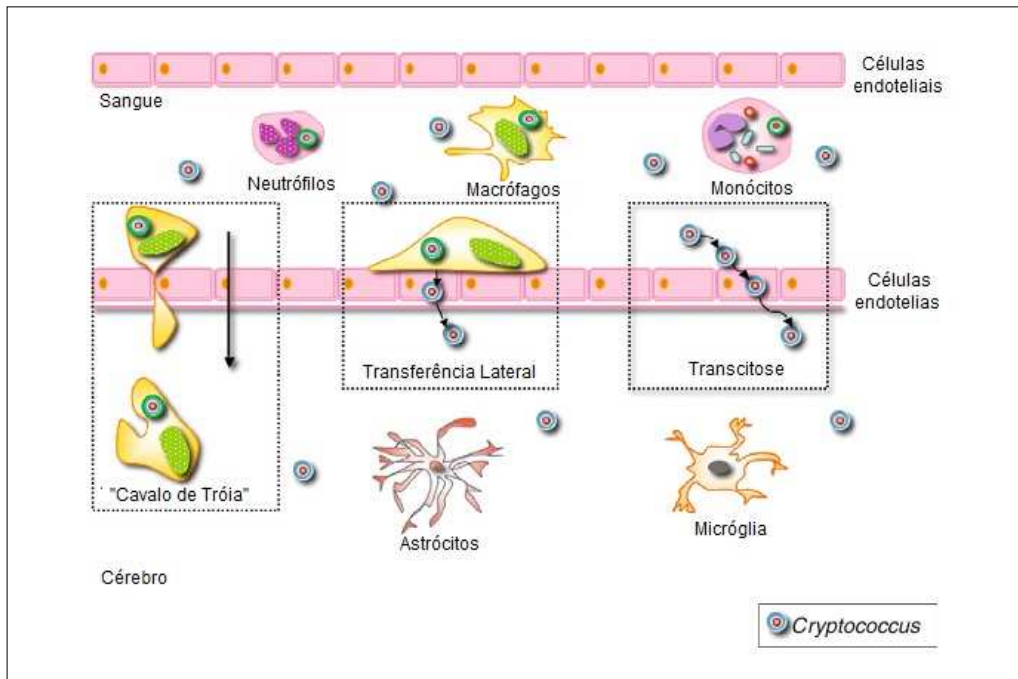
Fonte: LIN E HEITMAN, 2006.

As espécies patogênicas de *Cryptococcus* para mamíferos encontram-se no sistema nervoso central (SNC) um local favorável para a sua multiplicação, porém a disseminação ou o envolvimento do SNC vai depender da carga parasitaria inalada, virulência da linhagem e do estado imune do hospedeiro (Lester *et al.*, 2011; Tenor *et al.*, 2015). Acredita-se que a preferência pelo SNC está relacionada principalmente à alta concentração de substratos no líquido cefalorraquidiano assimiláveis pelo fungo, como tiamina, ácido glutâmico, carboidratos e minerais (Severo, De Mattos Oliveira e Londero, 1999), além da presença abundante de catecolaminas (substâncias que podem ser utilizadas pelo fungo para síntese de melanina) (Rodrigues, Alviano e Travassos, 1999; Lin e Heitman, 2006). Outra hipótese que justifica essa preferência pelo SNC é o fato de ele servir como “refúgio” para o fungo contra a resposta imune do hospedeiro que em alguns casos se encontra reprimida neste tipo de pacientes (Lin e Heitman, 2006).

A disseminação para o SNC pode desenvolver manifestações clínicas como: encefalite, meningite e meningoencefalite (**Figura 5b**) (Datta, Bartlett e Marr, 2009). No sistema nervoso central, a infecção por *Cryptococcus* spp. pode apresentar alterações neurológicas que incluem: confusão mental, encefaléia, perda de memória e irritação meningeana, levando ao aumento da hipertensão intracraniana evoluindo para o óbito (Chayakulkeeree e Perfect, 2006; Panackal *et al.*, 2015). Os dois principais órgãos acometidos pela criptococose são os pulmões e o cérebro. Outros órgãos como o fígado, pele (**Figura 5c e 5d**), próstata, trato urinário, olhos, miocárdio e ossos podem também ser atingidos (Severo *et al.*, 2009).

Acredita-se que as espécies de *Cryptococcus* podem migrar para o SNC por diferentes vias de disseminação hematogênica (Kronstad *et al.*, 2011). Há evidência de que as células fúngicas ultrapassam a barreira hematoencefálica (BHE) por uma estratégia denominada “Cavalo de Tróia”. De acordo com estes estudos, a levedura parece permanecer internalizada nos macrófagos evitando assim a sua exposição ao sistema imune do hospedeiro e juntamente com este transpor a BHC (Chen, Meyer e Sorrell, 2014). Outro mecanismo conhecido como “transferência lateral” consiste na capacidade do *Cryptococcus* infectar diretamente um macrófago e este fixar-se ao endotélio permitindo que o fungo atravesse as células endoteliais transportando-se através da BHC (Ma e May, 2009; Kronstad *et al.*, 2011). Por outro lado, *C. gattii* pode atravessar a barreira hematoencefálica por meio da passagem direta entre as células endoteliais dos vasos sanguíneos sem a participação dos macrófagos, processo conhecido como transcitose (**Figura 7**). **A Figura 7** apresenta as diferentes estratégias utilizadas pelo *Cryptococcus* sp para atravessar a barreira hematoencefálica (BHE).

Figura 7 – Estratégias usadas por *Cryptococcus* para atravessar a barreira-hematoencefálica.



(a) Cavalo de Tróia; (b) Transferência Lateral; (c) Transcitose.

Fonte: KRONSTAD *et al.*, 2011.

O diagnóstico clínico da criptococose baseia-se nos sinais clínico-patológicos. Para a identificação do patógeno no laboratório, diferentes métodos podem ser empregados. Pode ser realizado o cultivo, isolamento em meio de cultura, realização de provas bioquímicas, exames direto, radiológicos, histopatológicos, e a pesquisa de antígenos circulantes (Yang *et al.*, 2006; Severo *et al.*, 2009). Exames radiográficos são inespecíficos por serem comuns a outros processos infecciosos e não infecciosos pulmonares e podem detectar a presença de infiltrados, nódulos e derrame pleural (Severo *et al.*, 2009; Haddad *et al.*, 2015). O exame micológico direto é realizado utilizando a tinta nanquim e KOH, “casos” positivos para criptococose, observa-se a presença de leveduras encapsuladas, (Chayakulkeeree e Perfect, 2006). O diagnóstico laboratorial para identificação do *Cryptococcus* sp deve ser associado aos demais resultados, exames clínicos e patológicos (Huston e Mody, 2009). Exames sorológicos são amplamente empregados em hospitais de doenças infectocontagiosas para otimizar a propedêutica no diagnóstico da

criptococose. O látex para identificação de antígeno capsular de *Cryptococcus* pode ser utilizado nos diversos líquidos corporais. Exames de Elisa são menos empregados na rotina laboratorial por serem mais onerosos (Kwon-Chung et al., 2014). Outras tecnologias automatizadas são hoje exploradas para o rápido diagnóstico dentre elas: Vitek®, Macro Scan® e mais recentemente Maldi tof (espectrofotometria de massa). Estes métodos diagnósticos são pouco difundidos em laboratórios, fora dos grandes centros urbanos, em virtude do seu alto custo (Romani, 2011).

2.3 Imunologia da criptococose e fatores de virulência

As infecções por CG desencadeiam no hospedeiro uma resposta imunológica tipo Th2 para combater o patógeno. Em geral, a carga fúngica, a virulência do patógeno e a intensidade da resposta inflamatória são consideradas fatores de grande importância para o estabelecimento da doença. Na doença em humanos, a resposta inflamatória pode variar de mínima a intensa crônica com a formação de abscessos ou tubérculos, granuloma, fibrose ou calcificação e em alguns casos com necrose caseosa. Lesões recentes tendem a apresentar aspecto gelatinoso, em virtude de um acúmulo de micro-organismos com pequena resposta inflamatória. Já, lesões antigas possuem aspecto granulomatoso, com presença de células gigantes, macrófagos e linfócitos (Wang et al., 2013; Gibson e Johnston, 2015).

Os padrões histológicos comumente encontrados na criptococose em pacientes imunocompetentes consistem na presença de granulomas típicos, habitualmente encontrados no interior do foco infeccioso e reconhecidos como um agregado compacto de macrófagos; de células com característica epitelióides e células gigantes multinucleadas (corpo estranho e Langhans) contendo numerosas leveduras intracitoplasmáticas. Estas lesões granulomatosas nodulares desenvolvem-se e progridem para lesões fibrocaseosas com bordas fibroinflamatórias (Panackal et al., 2015).

Para que o micro-organismo consiga estabelecer um processo infeccioso no organismo do hospedeiro, ele necessita transpor as suas barreiras imunológicas. O relacionamento do tipo simbiótico-parasitismo produz um processo infeccioso que leva a formação de lesões nos tecidos do hospedeiro, propiciando o estabelecimento da doença. O hospedeiro oferece condições para o crescimento do micro-organismo, que, para sobreviver neste novo ambiente, deve resistir à alta temperatura, influências hormonais e ataque pelas células fagocitárias do sistema imune. Neste processo, o micro-organismo vai se adaptando, agredindo os tecidos, obtendo desta maneira maior resistência (processo conhecido como patogenicidade) (Voelz e May, 2010; Wang *et al.*, 2013).

Desta maneira, para o micro-organismo causar doença, ele precisa invadir os tecidos do hospedeiro, multiplicar-se, resistir aos mecanismos de defesa e ainda danificá-lo (Kronstad *et al.*, 2011). O sucesso desse processo vai depender dos fatores de virulência utilizados por este patógeno.

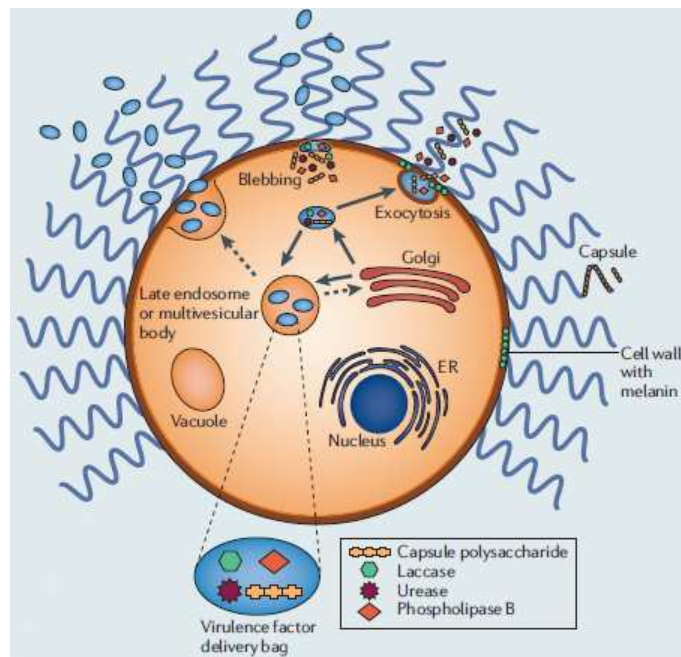
Dentre os inúmeros fatores de virulência produzidos destacam-se: a produção de melanina (Prates *et al.*, 2013; Almeida, Wolf e Casadevall, 2015; Alspaugh, 2015), parede celular e cápsula polissacarídica (Fonseca *et al.*, 2010; Chaturvedi e Chaturvedi, 2011; Prates *et al.*, 2013), o crescimento a 37°C (Ma e May, 2009; Chaturvedi e Chaturvedi, 2011), enzima fosfolipase (Ma e May, 2009; Almeida, Wolf e Casadevall, 2015), enzima superóxido dismutase, enzima proteína-quinases e as enzimas urease e lacase (Zhu *et al.*, 2001; Ma e May, 2009; Almeida, Wolf e Casadevall, 2015). Muitos fatores já foram caracterizados molecularmente e fenotipicamente e classificados como fatores de virulência, que, possibilitam evasão do sistema imune do hospedeiro e sobrevivência *in vivo* (Ngamskulrungraj *et al.*, 2012).

Considerado um dos mais importantes fatores de virulência, a cápsula polissacarídica é uma característica distintiva em relação a outras leveduras de importância médica. A virulência conferida à levedura pela cápsula se deve às suas propriedades biológicas, sendo a mais importante delas a inibição da

fagocitose pelos macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Alspaugh, 2015; Leopold Wager *et al.*, 2016; Scriven *et al.*, 2016). Consequentemente, há uma diminuição na resposta mediada por células. Além disso, este fator promove mudança na produção de citocinas, incluindo a diminuição da TNF- α , IL 1, IL 2 e aumento da IL 6 e IL 10, favorecendo um efeito imunossupressor (Urai *et al.*, 2015). A cápsula, além de ter propriedades antifagocíticas, fornece proteção contra diminuição do estresse oxidativo produzidos por macrófagos e neutrófilos como as espécies reativas de oxigênio (ROS). Os antígenos capsulares ajudam na remoção das selectinas de superfícies endoteliais dos neutrófilos e desta maneira inibem a migração destas células para o tecido, o que favorece a infecção nos pulmões (Lester *et al.*, 2011; Scriven *et al.*, 2016). Estudos realizados por (Kwon-Chung *et al.*, 2014) mostraram que leveduras mutantes deficientes de cápsula expressam pequena ou nenhuma virulência em ratos quando comparados a modelos encapsulados.

Quanto ao ambiente intracelular dos macrófagos, acredita-se que a capacidade de CNN e do CG em influenciar o ambiente intracelular destas células durante a proliferação, expulsão e transferência fúngica, se deve a fatores de virulência fúngicos liberados. As células fúngicas contêm em seu interior, vesículas de entrega de fatores de virulência, dentre eles: a cápsula polissacarídica, a enzima lacase (que sintetiza a melanina) e as enzimas fosfolipase B e urease que são liberadas por fusão, com a membrana citoplasmática. Assim, o seu conteúdo será liberado no citoplasma de macrófagos infectados tanto *in vivo* como *in vitro* (**Figura 8**). Desta maneira, estes fatores de virulência conferem a levedura um efeito protetivo contra reações oxidativas presentes no interior destas células (Kronstad *et al.*, 2011). A **figura 8** ilustra *Cryptococcus* sp liberando seus fatores de virulência para o citoplasma do macrófago.

Figura 8 – Liberação dos fatores de virulência pelas espécies de *Cryptococcus*.



Liberação dos diferentes fatores de virulência pelo *Cryptococcus* durante sua fase parasitária.

Fonte: KRONSTAD *et al.*, 2011.

Outro fator de virulência característico do gênero *Cryptococcus* consiste na síntese de melanina, que é catalisada pela enzima laccase e pode ocorrer quando compostos fenólicos, por exemplo, catecolaminas (dopamina e epinefrina) estão presentes no ambiente. Este fato explica provavelmente a afinidade da levedura pelo SNC (Kronstad *et al.*, 2011; Almeida, Wolf e Casadevall, 2015). A melanina presente na parede celular da levedura protege o fungo de radicais livres tóxicos (agentes oxidantes) que são produzidos pelas células do sistema imune do hospedeiro aos fagócitos; à ação dos antifúngicos e modificando a resposta imune, acentuando a virulência do fungo. Ainda no meio ambiente, a presença da cápsula protege o fungo contra a radiação (Negroni, 2012; Nascimento *et al.*, 2016).

Espécies reativas de oxigênio (ROS), acima citadas, 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, as espécies de *Cryptococcus* apresentam um sistema detoxificante de ROS, que incluem enzimas superóxido dismutase (SOD1 e SOD2), catalases e peroxidases

(Almeida, Wolf e Casadevall, 2015). A proeminente enzima SOD1 em CG protege a integridade funcional de diversos fatores de virulência. Já a enzima mitocondrial SOD2 é crucial para garantir o crescimento a 37°C (Chaturvedi e Chaturvedi, 2011). A catalase e a peroxidase convertem peróxido de hidrogênio (que é um ROS) em água e oxigênio molecular, contribuindo assim para a menor susceptibilidade de CG aos agentes antifúngicos (Ferreira *et al.*, 2013).

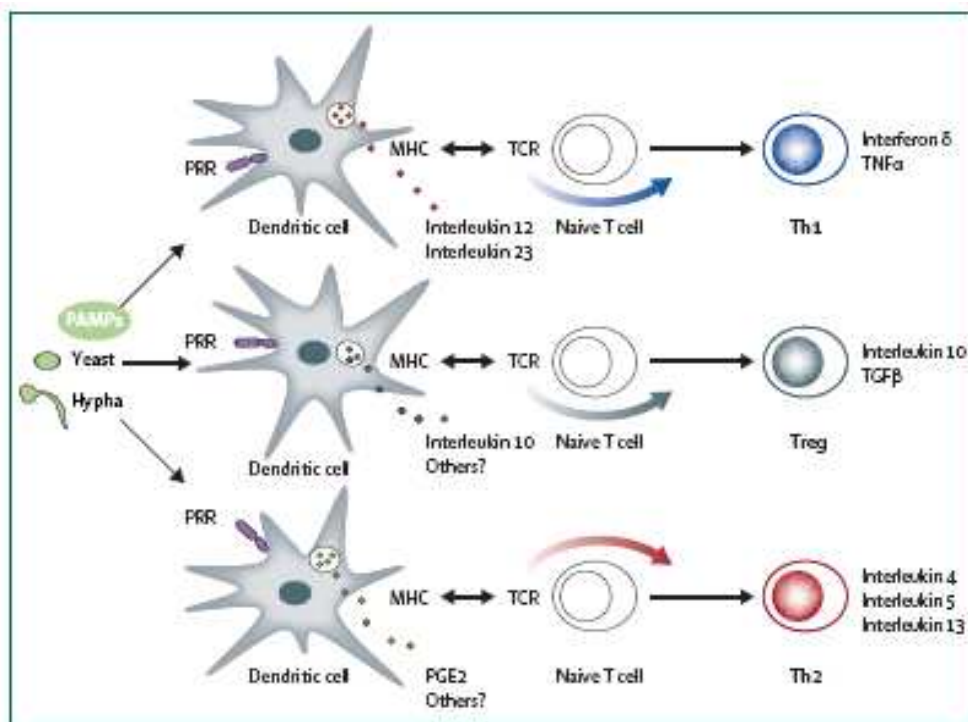
Outros fatores como produção de urease, fosfolipases, manitol e proteinases também têm sido associadas à virulência deste patógeno. As fosfolipases atuam degradando as membranas citoplasmáticas das células do hospedeiro contribuindo para o início da infecção pulmonar e sua disseminação pelas vias linfáticas ou sanguíneas. A fosfolipase parece também aumentar a aderência da célula leveduriforme no tecido epitelial pulmonar. A urease catalisa a reação de conversão da uréia em amônia e carbamato. A sua produção parece contribuir para o aumento na sobrevivência da levedura no hospedeiro (Ma e May, 2009; Kronstad *et al.*, 2011). Além disso, a sua capacidade de crescimento a 37°C é essencial para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro (Hoang, Philips e Galanis, 2011).

Neste contexto, o hospedeiro por sua vez, também apresenta mecanismos de defesa contra as infecções fúngicas em geral. Estes mecanismos são numerosos e incluem respostas que envolvem tanto a participação de componentes do sistema imune inato (presente no início da infecção) até respostas mais elaboradas e específicas como as da imunidade adquirida (presente ao longo do curso da infecção) (Voelz e May, 2010; Huston *et al.*, 2013).

A primeira linha de defesa, embora não apresente especificidade, é considerada importante, pois permite o rápido reconhecimento do patógeno através da interação de receptores presentes na superfície das células, como por exemplo, receptores do tipo Toll (TLRs) com os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) – são padrões moleculares conservados comuns às espécies microbianas, que estimulam a liberação de citocinas

responsáveis pela resposta imune pré e pós inflamatória (**Figura 9**) (Blanco e Garcia, 2008; Cassone, 2008; Romani, 2011). Caso as citocinas estimuladas, forem IL 12, INF e TNF- α , as mesmas tendem a estimular linfócitos Th0 oriundos do Timo, a se diferenciar, em Th1. No entanto, caso s citocinas sejam IL 10 e IL 6, a tendência é que o linfócito Th0 se diferencie para Th2, e, portanto, a infecção evolua para a formação de granuloma. A **figura 9** resume os principais aspectos das interações entre os receptores.

Figura 9 – Papel das células dendríticas em induzir e regular a imunidade adaptativa.



Células dendríticas, como células apresentadoras de antígeno, fagocitam o fungo, processam o antígeno e apresentam seus epitopos às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II, presentes nas células T.

Fonte: CASSONE, 2008.

No início da infecção, os neutrófilos eliminam as células fúngicas através da “explosão oxidativa”, e com o passar do tempo o seu papel tende a ser imunorreguladores, com a presença de IL 4 e IL10 típica de uma resposta Th2. No entanto o desenvolvimento de uma resposta imune celular (CMI) - Th1 é considerada crítica para eliminar o CG, atuando através de efeitos citotóxicos e/ou indiretamente por funções regulatórias de células *natural killer* (NK) ou

linfócitos T (Voelz e May, 2010). IL 12 é derivada das células apresentadoras de antígeno e desempenha um papel importante em promover a diferenciação de células Th1. IL-12 também foi reconhecida por ser importante para controlar infecção pulmonar e disseminada com *C. neoformans* (Angkasekwina *et al.*, 2014). O fator TNF- α e IFN- γ são liberados por linfócitos Th1 e estimulam as células de primeira linhagem na defesa contra as células criptocócicas, estimulam à expressão do complexo maior de histocompatibilidade, crescimento, maturação e diferenciação de linfócitos e regulam a resposta inflamatória (Siddiqui *et al.*, 2005; Hardison *et al.*, 2012; Tubo e Jenkins, 2014).

2.4 Tratamento da criptococose e suas implicações

Atualmente, a quimioterapia com antifúngicos é a base no tratamento da criptococose. Dependendo da virulência do fungo, do estado imunológico do hospedeiro, da manifestação clínica da doença e grau de comprometimento tecidual, o tratamento pode ser prorrogado por longos períodos com altas possibilidades de recorrência (Santos *et al.*, 2014).

Nas formas graves, principalmente de SNC, seja o paciente infectado ou não pelo HIV, o tratamento do paciente com criptococose meningoencefálica consiste em 3 fases: fase inicial (fase de indução), têm por objetivo, a negativação ou redução efetiva da carga fúngica, tendo como período mínimo de tratamento de duas semanas; fase de consolidação, que, compreende a manutenção de negatividade micológica e normalização de parâmetros clínicos e laboratoriais, por pelo menos oito semanas; fase de supressão também chamada de manutenção, realizada por no mínimo de 1 ano com tempo adicional variando de acordo com a condição do estado imune do hospedeiro (Ministério da Saúde, 2012).

As drogas disponíveis são: anfotericina B, anfotericina B formulações lipídicas (complexo lipídico e lipossomal), fluconazol, itraconazol e 5 fluocitosina (5-FC) (Butts *et al.*, 2013).

A anfotericina B é um polieno que age na síntese do ergosterol na membrana citoplasmática do fungo. Atua formando poros que resultam na desestabilização da mesma, aumentando sua permeabilidade, favorecendo a lise celular com consequente morte do micro-organismo (Espinel-Ingroff *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013). 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 (Thompson Iii, Cadena e Patterson, 2009). Neste caso é indicado o uso da anfotericina B lipossomal que possui a capacidade de oferecer maior dose, com menores níveis de toxicidade. Porém são significativamente mais caras (Ministério da Saúde, 2012).

O tratamento ideal da criptococose no SNC seria a combinação dos antifúngicos anfotericina B (0,7 mg/kg por dia) por via intravenosa e 5-fluorocitosina por via oral (25 mg/kg a cada 6 horas). Estudos indicam que a combinação destes fármacos foram associados à rápida esterilização dos fungos no líquido quando comparado ao uso isolado da anfotericina B. A morte mais rápida dos fungos no líquido dos pacientes está associada à redução da mortalidade. Este tratamento é considerado extremamente eficiente para a criptococose miningoencefálica (Cannon *et al.*, 2009; Severo *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012).

A Flucitosina (5-fluorocitosina) é considerada um análogo de pirimidina e atua inibindo a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Cannon *et al.*, 2009; Thompson Iii, Cadena e Patterson, 2009; Espinel-Ingroff *et al.*, 2012). Esta droga apresenta potencial mielotoxicidade e hepatotoxicidade, devendo seu uso ser acompanhado com controles laboratoriais por hemograma, hepatograma, e função renal (Ministério da Saúde, 2012).

Quanto às formas leves de criptococose, naquelas, quando não há o envolvimento do SNC, o tratamento habitual consiste na utilização do fluconazol por via oral a 400 mg diários de 6 a 12 meses. Este antifúngico

contribui também, para, a manutenção do tratamento da criptococose, a fim de, evitar recidivas (Santos *et al.*, 2014).

Este antifúngico pertence à classe dos azóis, assim como, o itraconazol, o voriconazol e o posaconazol. Caracteriza-se por inibir as enzimas P450 fúngicas como a esterol desmetilase, responsável pela síntese do ergosterol, que altera a fluidez da membrana (Ngamskulrunroj *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015). O fluconazol possui boa tolerância, com boa atividade clínica contra *Cryptococcus* sp (Santos *et al.*, 2014) com vantagem de apresentar alta eficácia, menor toxicidade e a sua administração pode ser realizada por via oral e parenteral (Shapiro, Robbins e Cowen, 2011).

O itraconazol é uma droga auxiliar na escolha terapêutica da criptococose. Este antifúngico é prescrito no tratamento da criptococose pulmonar, sem o envolvimento do SNC. Este antifúngico pode ser administrado em combinação com anfotericina B para o tratamento nas formas disseminadas (Ferreira *et al.*, 2013).

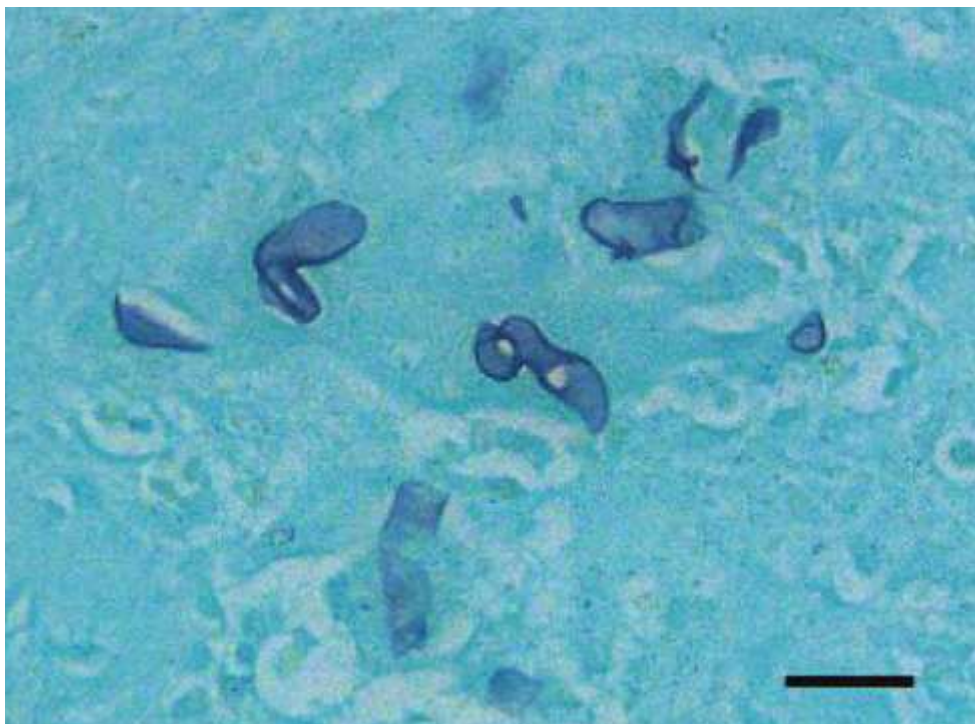
Alguns tratamentos foram bem sucedidos utilizando fármacos da segunda geração de triazóis, como o voriconazol e posaconazol. Ainda não há estudos comparativos para avaliar a sua eficácia. Ambos já demonstraram capacidade para atravessar a BHC. O voriconazol apresenta um perfil farmacocinético melhor do que posaconazol (Shapiro, Robbins e Cowen, 2011; Chen *et al.*, 2013).

2.5 Uso de antígenos somáticos de *Pythium insidiosum* como agentes imunomoduladores no tratamento da pitiose e doenças com uma reação inflamatória tipo th2

Pythium insidiosum é um oomycete pertencente ao reino Stramenopila filogeneticamente localizado na base das plantas em uma posição taxonômica próximo das algas (Alexopoulos *et al.*, 1996) (**Figura 10**). O gênero *Pythium* se caracteriza por sua capacidade para afetar plantas. O PYT é a única espécie

do gênero que afeta mamíferos incluindo humanos. Este organismo encontra-se localizado em áreas tropicais e subtropicais em águas paradas, onde produzem zoósporos flageladas assexuados. Os zoósporos têm sido sugeridos como unidades infectantes, e, penetram em fissuras de traumas cutâneos da pele, e, podem produzir queratitite. As manifestações clínicas produzidas por *P. insidiosum* são: infecções subcutâneas e sistêmicas com tropismo preferencial pelos tecidos endoteliais. A maioria dos antifúngicos têm pouca e/ou nenhuma ação contra este oomycete. A ausência de ergosterol (alvo da ação da maioria dos antifúngicos) na membrana celular do PYT é a principal causa intrínseca da falha terapêutica. Essas características dificultam a ação das drogas antifúngicas e representam uma grande dificuldade para o tratamento da pitiose (Gaastra *et al.*, 2010).

Figura 10 – O *Pythium insidiosum*

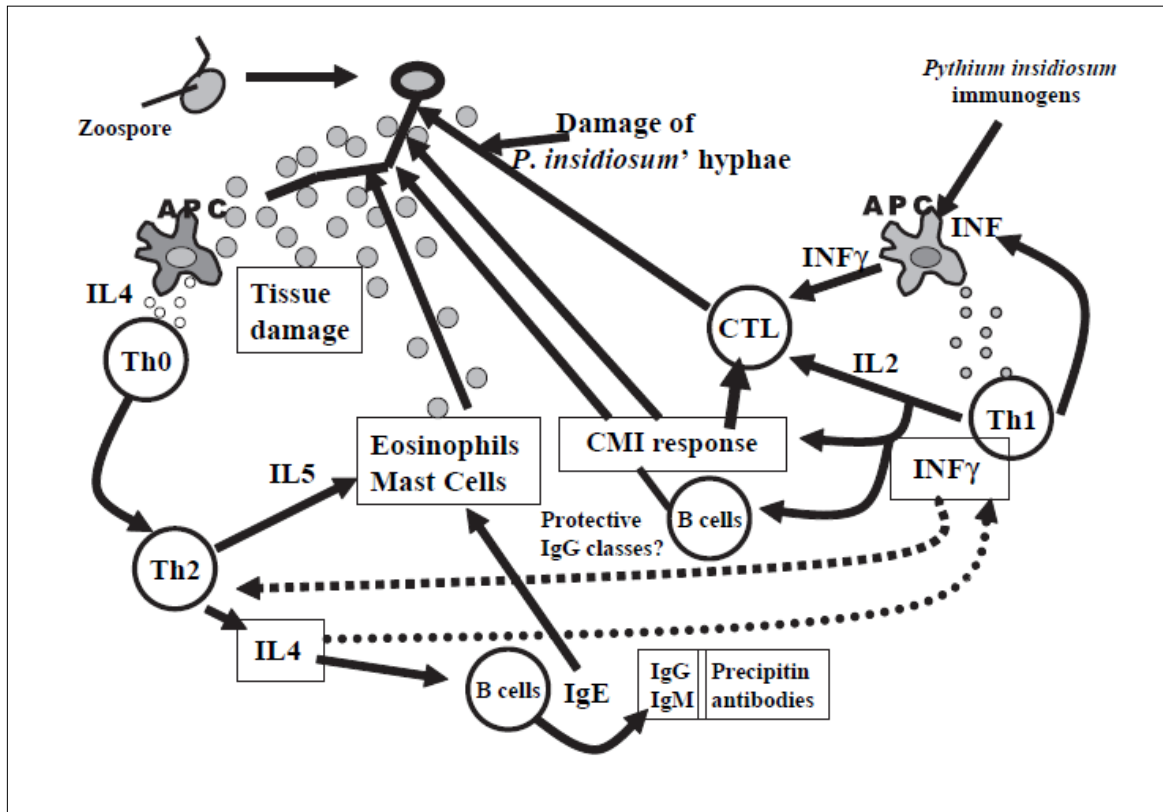


A estrutura do micro-organismo *Pythium insidiosum* a partir de uma lesão cutânea em cachorro.
Fonte: Hensel *et al.*, (2003)

A reação imunológica desencadeada na pitiose equina foi revelada por Hensel *et al.* (2003) e Mendoza e Newton (2005). De acordo com estes pesquisadores, quando o hospedeiro entra em contato, através de uma ferida, os zoósporos de

PYT, adquirem a forma de um tubo germinativo que penetra ativamente no tecido. Uma vez nos tecidos, as hifas liberam exoantígenos eventualmente reconhecido por células apresentadoras de antígenos (APCs). As APCs liberam IL4, que, estimula a diferenciação dos linfócitos T auxiliares (Th0) para linfócitos Th2, que, por sua vez, induzem a liberação de mais IL4 e IL5. As IL4 regulam negativamente a expressão de Th1 e estimulam linfócito B (LB) com a produção de IgE, IgM e IgG. As IL5 e IgE, por sua vez, desencadeiam a mobilização de eosinófilos e mastócitos para o local da lesão, e, conseqüentemente, tendem a degranular (responsáveis pelas lesões teciduais) sobre as hifas de *P. insidiosum*, produzindo o fenômeno de Splendore-Hoeppli (**Figura 11**). As hifas de *P. insidiosum* multiplicam-se no interior dos “kunkers” (massas necróticas), onde produzem exoantígenos em grande quantidade. Um evento, que, no final, bloqueia a resposta Th1. A **figura 11** esquematiza a hipótese dos mecanismos terapêuticos imunes desencadeados por antígenos do *Pythium insidiosum*. O PYT também expressa, fatores de virulência que estimulam citocinas do tipo Th2 (IL5, IL4, IL10). O mecanismo proposto seria semelhante ao relatado nas infecções parasitárias (Hensel *et al.*, 2003; Mendoza e Newton, 2005).

FIGURA 11 – Possível mecanismo de ação proposto para os antígenos do *Pythium insidiosum*.



Provável mecanismo de ação exercido pelo micro-organismo *Pythium insidiosum*.

Fonte: Mendoza e Newton (2005).

Uma alternativa interessante para o tratamento da pitiose equina foi proposto por MILLER em 1981, que desenvolveu um imunobiológico (imunoterápico), a partir de culturas do próprio agente. Para isto, utilizou-se um macerado de hifas. No caso do PYT, já foram identificados alguns antígenos imunodominantes potencialmente protetores, sem, no entanto, obter-se a comprovação dos mecanismos imunológicos desencadeados por tais antígenos (Mendoza, Mandy e Glass, 2003). A eficiência desta imunoterapia foi de aproximadamente 53% a 75% quando associado ao procedimento cirúrgico (Sallis, Pereira e Raffi, 2003; Leal *et al*, 2001). Ao longo das décadas de 80 e 90, vários autores utilizaram a imunoterapia a partir das proteínas imunomoduladoras do *P. insidiosum*, com modificações na técnica

originalmente descrita, visando à obtenção de antígenos capazes de estimular uma resposta imunológica eficiente (Mendoza *et al.*, 1992).

Acredita-se que os mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia, baseiam-se principalmente na resposta celular e de citocinas expressadas depois da aplicação dos imunógenos de PYT por via subcutânea (SC). Este fato é sustentado pelas alterações teciduais após o início da imunoterapia, com mudança de perfil imunológico inflamatório francamente eosinofílico (Th2), para uma resposta mononuclear, mediada por macrófagos e linfócitos T (Th1). É provável que os antígenos presentes no imunógeno induzam esta alteração no padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais (Mendoza, Mandy e Glass, 2003). Outros autores verificaram que o nível de anticorpos anti-Pythium aumenta em equinos doentes submetidos à imunoterapia. Sendo assim, o aumento do nível de anticorpos pode auxiliar na cura (Mendoza, Mandy e Glass, 2003).

Quando os imunógenos do imunoterápico são injetados no hospedeiro com pitiose, os antígenos são apresentados às APCs de uma maneira diferente daqueles da infecção natural. As APCs liberam interferon que ativam Th0 para se diferenciar em Th1. O Th1 ativado, produz mais IFN e, também, IL 2. Por sua vez, IL 2 e INF ativarão mediadores de células mononucleares como CMI composta por linfócitos T e macrófagos que danificam e destroem a hifa de *P. insidiosum*. Não está claro se durante a imunoterapia, as IL2 e IFN também estimulariam linfócitos B para produzir IgG protetores. A produção de IFN, no local da infecção, pelas APC e o Th1 produzidos, resultarão numa diminuição da resposta Th2. Portanto, a estimulação de Th1, e, o bloqueio de Th2, poderia explicar porque equinos, cães e humanos com pitiose são curados após injeções com os imunógenos do *P. insidiosum*. Os imunógenos em uso podem ter atuação prolongada e potencializada através de adjuvantes, como ficou demonstrado em estudos realizados com coelhos (LEAL *et al.*, 2001).

MENDOZA *et al.*, em 1992, publicaram seus trabalhos desenvolvidos desde 1981 em que comparou dois imunógenos para a imunoterapia da pitiose

equina. Uma delas utilizou proteínas extraídas da massa celular como antígeno e a outra utilizou proteínas concentradas solúveis. Os imunógenos apresentaram características imunorreguladoras estimulando a reação inflamatória para o polo Th1.

Em 2001, Leal relatou o teste de eficiência de um imunobiológico (PITIUMVAC) para tratamento da pitiose equina, baseando-se na proposta descrita por Miller em 1981. Neste estudo, o índice de cura variou de 50% a 83% entre os grupos de equinos tratados. Nos últimos anos a utilização do imunoterápico na pitiose bovina demonstrou eficácia de aproximadamente 100% (Mendoza, Mandy e Glass, 2003).

Wanachiwanawin e colaboradores (2004), descreveram o sucesso da imunoterapia com imunógenos de *P. insidiosum* em um paciente tailandês com talassemia, infectado pelo *P. insidiosum*. O paciente havia sido tratado sem sucesso com anfotericina B, iodetos, cetoconazol e cirurgia. A cura clínica foi obtida após três aplicações de (100 µL/20 µg) do imunoterápico, com intervalo de 14 dias. Estes resultados foram essenciais para a pesquisa com utilização de imunógenos e tratamento de infecções causadas por diferentes organismos que estimulam uma TH2 típica.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a eficácia das proteínas imunorreguladoras obtidas do micro-organismo *Pythium insidiosum*, aprovado pelo FDA, em modelos murinos infectados com *Cryptococcus gattii*.

3.2 Específicos

1. Avaliar o papel da fagocitose, ROS e PRN na terapia imunomoduladora.
2. Estabelecer modelo experimental para testes *in vivo* de terapia imunomoduladora:
 - ✓ Avaliar a toxicidade das proteínas imunomoduladoras de *Pythium insidiosum* administradas em camundongos C57BL/6.
 - ✓ Avaliar a melhor via de administração do imunomodulador para o modelo experimental com *C. gattii*.
 - ✓ Avaliar o tempo de sobrevida em camundongos infectados com *Cryptococcus gattii* e posteriormente tratados com o imunomodulador de *P. insidiosum* combinados com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol.
3. Avaliar a eficácia da terapia imunomoduladora em modelo murino de criptococose sistêmica comparada a terapia com anfotericina B e ao tratamento com PYT + anfotericina B:
 - ✓ avaliar a susceptibilidade de *C. gattii* ao tratamento com a terapia imunomoduladora:
 - i. avaliar a recuperação dos fungos no cérebro, lavado broncoalveolar e pulmão;
 - ii. avaliar a quantidade de células do sistema imune mononuclear e polimorfonuclear e qual tipo foi mais estimulado após a administração das proteínas imunomoduladoras de *Pythium insidiosum* dos pulmões e cérebro;

- iii. acompanhar e registrar alterações histopatológicas dos cérebros e pulmões;
- iv. avaliar a possível ação sinérgica das proteínas imunomoduladoras de *Phythium insidiosum* estimuladora da resposta Th1 no modelo murino que apresenta resposta intrínseca Th1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais:

Para a execução dos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos machos, com seis semanas de idade, da linhagem C57/BL6 agrupados em seis animais por gaiola. Todos os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Foram fornecidos água e ração e ciclos de claro/escuro foram mantidos. Previamente ao teste, todos os grupos foram vermífugados (Ivermectina, 1mL em 249 mL de tampão fosfato salino (PBS)). Este trabalho foi submetido e aprovado pelo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, com número de protocolo 305/2015.

4.2 Linhagens de *Cryptococcus gattii* e condições de cultivo

Neste estudo foi utilizada a linhagem L27-01 do fungo *C. gattii*. A linhagem pertence à coleção de micro-organismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia da UFMG. O fungo foi mantido em meio de cultivo Ágar *Sabouraud* dextrose (Difco Laboratories, Spark, MD, USA) a 35°C.

4.3 Fármacos utilizados

Para os experimentos, as drogas escolhidas foram anfotericina B e fluconazol, as quais foram adquiridas na empresa farmacêutica de manipulação Amphora, da empresa Sigma Aldrich. As mesmas foram mantidas sob-refrigeração a -20°C até a sua utilização. Os fármacos utilizados no trabalho estão listados na tabela a seguir (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Relação dos fármacos selecionados para os experimentos

Fármaco	Uso clínico	Concentração
Fluconazol	Antifúngico	20 mg/Kg
Anfotericina B	Antifúngico	0,5 mg/Kg

4.4 Preparo do Inóculo Fúngico:

Após 48h de crescimento em ágar Sabouraud dextrose, as colônias do fungo foram diluídas em PBS (pH 7,2) estéril. Para avaliar a viabilidade das células fúngicas foi utilizado o corante azul de Trypan, e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer. A concentração inicial foi ajustada para 1×10^4 células em 30 μ L de PBS (Angkasekwina *et al.*, 2014).

4.5 Infecção Intratraqueal

O isolado L27-01 de *C. gattii* foi utilizado na indução da criptococose em camundongos C57BL/6. O micro-organismo foi cultivado em ágar *Sabouraud* dextrose a 35°C durante 48 horas. As células foram transferidas para solução de PBS pH 7,2 estéril e o inóculo foi quantificado em câmara de Neubauer, o mesmo foi ajustado para 1×10^4 células/mL. Os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina em PBS (80 mg/Kg/10 mg/Kg). Em seguida, o animal foi colocado em posição ventral. Após, foi realizada uma pequena incisão na região cervical (~1cm), próximo a localização da glândula tireóide. A camada muscular foi afastada até que a traquéia fosse visualizada. Com uma seringa de 1ml colocada paralelamente dentro da traquéia foram inoculados 30 μ L da suspensão fúngica. Um ensaio prévio foi realizado para a recuperação de colônias viáveis dos animais, com o objetivo de se restaurar a virulência da linhagem selecionada. Depois de realizados os procedimentos, os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas separadas e os animais receberam água e ração seguindo as regulamentações do biotério.

4.6 Ensaio de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e espécies reativas de Oxigênio (ROS)

Para os procedimentos, camundongos machos saudáveis, de 8 a 10 semanas, foram previamente anestesiados, e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical, de acordo com os protocolos estabelecidos. Com o

auxílio de material cirúrgico, removeu-se a pele do animal na região femural, logo acima das pernas traseiras visando expor as articulações: bacia/fêmur e fêmur/tíbia. Imediatamente após a remoção das pernas, essas foram colocadas em um tubo contendo etanol durante 1 minuto e depois colocado em PBS 1X. Foi removido todo o 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 Meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI), sendo transferida para um tubo Falcon mantido em gelo. Após a coleta da medula, as células foram centrifugadas em meio RPMI-1640 (volume final de 30mL). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 20 mL de RPMI-1640. As células foram contadas em câmara de Neubauer. A concentração de células, por placa de 24 poços, foi ajustada para 7×10^6 /mL. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C, por sete dias, e a troca de meio realizada a cada três ou quatro dias do início da cultura.

Para infecção dos macrófagos (ensaio de fagocitose), foi preparada uma suspensão fúngica com o isolamento de *C. gattii* L27/01 (cultivado em ágar *Sabourraud* por 48 horas) em PBS 1x. A suspensão foi contada em câmara de Neubauer, com azul de Trypan para verificação das células viáveis. As células de *C. gattii* foram colocadas em soro murino a 10%, por 1 hora, a 37°C. Logo após, as células fúngicas foram ressuspensas em meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino. As leveduras viáveis foram ajustadas para $0,4 \times 10^5$ células por poço (1 de leveduras para cada 5 macrófagos) e adicionadas à cultura de macrófagos em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13mm. Em cada poço desta placa, foram colocados 2×10^5 células de macrófagos derivados da medula. Foram realizados dois controles: um com a suspensão de macrófagos e outro com a suspensão de *C. gattii*. As culturas foram incubadas a 37°C, com atmosfera de 5% CO₂. No intervalo de 3 e 24 horas, observou-se cada poço das placas ao microscópio. Paralelamente, foram incubados com *C. gattii*, diferentes tratamentos (**tratamento 1**- 10 µg do imunomodulador foram colocados previamente e após 3 horas adicionou-se o *C. gattii*; **tratamento 2**- 10 µg do imunomodulador e *C. gatti* ambos adicionados

ao mesmo tempo; **tratamento 3-** *C. gattii* colocado previamente e, após 3 horas adicionou-se 10 µg do imunomodulador) para avaliar a influência do mesmo na fagocitose. Após incubação de 3 e 24 horas, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas, lavadas em PBS 1x estéril, secas à temperatura ambiente, fixadas com metanol à 4°C, 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 macrófagos. Foram considerados aqueles com leveduras intracelulares, no tempo de 3 e 24 horas.

Para o ensaio de proliferação intracelular (IPR), foi utilizado o mesmo protocolo descrito anteriormente, exceto pela ausência da lamínula nos poços das placas. Após 3 e 24 horas o sobrenadante foi removido. Cada poço foi lavado de 4 a 5 vezes com PBS 1x, para a remoção das células de levedura extracelulares. Após, foram adicionados em cada poço 200 µL de água estéril para lise dos macrófagos, seguido por 30 minutos de incubação para liberação e coleta das células. As células de levedura intracelulares foram contadas com azul de Trypan (1:1) para determinação das células viáveis. A taxa de proliferação intracelular foi determinada no tempo de 3 e 24 horas e também foi calculada a taxa de proliferação intracelular, após a lise, através da relação de ambos os tempos. Para isto foi realizado o cálculo da divisão do número máximo de leveduras intracelulares (T24h) pelo número de células fúngicas fagocitadas (T3h).

No ensaio de ROS e PRN, as células obtidas da medula dos camundongos, foram tratadas como no teste da fagocitose, diferindo apenas no meio de cultura utilizado, no qual utilizou o RPMI-1640 sem fenol red e no modelo da placa (foi utilizada placa de 96 poços). Após 24h de incubação, foi adicionado 20nM de 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (Invitrogen, Life Technologies) e mensurada a fluorescência (Varioskan Flash, Thermo). Para o PRN utilizou-se, como controle, o peróxido de hidrogênio. A leitura dos poços, de ambos ensaios foram lidos em fluorímetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate

Reader; Biotec) de 485nm e emissão de 530nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7 Inoculação do imunomodulador de *P. insidiosum* em camundongos para avaliar a toxicidade.

Camundongos C57BL/6 foram inoculados intraperitonealmente (IP) e subcutaneamente (SC) com 100 mg/mL do imunomodulador, primeiramente em camundongos hígidos. Para avaliar se o imunomodulador apresentava toxicidade, 100 mg/mL do mesmo foi administrado em 8 camundongos. Quatro animais receberam a dose por via IP e 4 por via SC, sendo que estes últimos, a dose, foi dividida em 2 aplicações, cada uma com 50µL. Os animais foram observados durante 30 dias. Os animais receberam um total de 6 doses (100 mg/mL/por animal) administradas por via intraperitoneal e subcutânea, sendo que cada dose foi administrada a cada 5 dias.

4.8 Curva de sobrevida para a padronização da via terapêutica mais efetiva

Para analisar a atividade das proteínas imunomoduladoras obtida a partir do *P. insidiosum*, foi padronizada a via terapêutica mais efetiva. Para isto, os animais foram previamente infectados com *C. gattii*. Foi utilizada uma concentração de 100 mg/mL do imunomodulador, administradas por via IP e SC. Desta maneira, objetivou-se avaliar o perfil de resposta da infecção frente ao imunomodulador. O grupo controle foi representado pelos animais inoculados com PBS. O imunomodulador foi administrado em intervalos de 5 em 5 dias e a anfotericina B foi administrada diariamente até a morte dos animais. Na **Tabela 2**, estão resumidos os grupos utilizados no experimento.

Tabela 2 - Padronização da via terapêutica mais adequada para o imunomodulador.

Grupos	Identificação	Tratamento	Concentração
1	Controle	NT	-
2	Controle	PYT (IP)	100 mg/mL
3	Controle	PYT (SC)	100 mg/mL
4	Controle	ANF B (IP)	0,5 mg/Kg
5	Tratamento	ANF B (IP) + PYT (IP)	0,5 mg/Kg + 100 mg/mL
6	Tratamento	ANF B (IP) + PYT (SC)	0,5 mg/Kg + 100 mg/mL

Legenda: NT – Animais não tratados; PYT – *Pythium insidiosum* (Imunomodulador); ANF B – Anfotericina B; SC – via subcutânea; IP – via intraperitoneal.

4.9 Avaliação da combinação do imunomodulador com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol

Após a padronização da melhor via de administração, os animais foram infectados e distribuídos em 6 grupos: a) infectados com *C. gattii*, mas não tratados; b) sensibilizados com o imunomodulador; c) tratado com anfotericina B; d) tratado com o fluconazol; e) sensibilizados com o imunomodulador, combinado com a anfotericina B; f) sensibilizados com o imunomodulador combinado com o fluconazol. Os tratamentos foram iniciados após 24 horas de infecção com a anfotericina B e o fluconazol, ambos administrados diariamente, enquanto o imunomodulador foi inoculado a cada 5 dias. Os animais foram monitorados diariamente até o óbito e os dados utilizados para a construção das curvas de sobrevivência. A **Tabela 3** esquematiza os ensaios:

Tabela 3 - Avaliação da combinação do imunomodulador e os antifúngicos inoculados em camundongos C57/BL/6.

Grupos	Identificação	Tratamento	Concentração
1	Controle	NT	-
2	Controle	PYT	100 mg/mL
3	Controle	ANF B	0,5 mg/Kg
4	Controle	FLUCO	20 mg/Kg
5	Tratamento	ANF B + PYT	0,5 mg/Kg + 100 mg/mL
6	Tratamento	FLUCO + PYT	20 mg/Kg + 100 mg/mL

Legenda: NT – Animais não tratados; PYT – *Pythium insidiosum* (Imunomodulador); ANF B – Anfotericina B; FLUCO – Fluconazol.

4.10 Tratamento do modelo animal para realização dos seguintes testes: contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), contagem total e diferencial de células a partir do Lavado broncoalveolar (LBA), fagocitose "in vivo" em LBA e a realização da análise histológica.

Após a análise da curva de sobrevivência, foi realizada uma nova infecção em camundongos C57BL/6, na qual foram utilizados os seguintes tratamentos: a) não tratado (NT); b) não infectado (NI); c) não infectado e sensibilizado com o imunomodulador; d) infectado e tratado com anfotericina B; e) infectado e sensibilizado com o imunomodulador; f) infectado e tratado com anfotericina B combinada com o imunomodulador. Os testes foram realizados conforme descrito no item 4.5. Os animais receberam o antifúngico diariamente, enquanto, o imunomodulador foi administrado a cada 5 dias. Foi estabelecida a data de sacrifício dos animais, com 15 dias após a infecção baseando-se na curva de sobrevivência. A **Tabela 4** esquematiza os ensaios:

Tabela 4 - Procedimento para avaliação da combinação do imunomodulador ao antifúngico.

Grupos	Tratamento	Concentração
1	NT	-
2	NI	-
3	NI + PYT	100 mg/mL
4	AMB	0,5 mg/Kg
5	PYT	100 mg/mL
6	PYT + AMB	100 mg/mL + 0,5 mg/Kg

Legenda: NT – Animais não tratados; NI – Animais não infectados; PYT – Imunomodulador; AMB – Anfotericina B.

4.10.1 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

Para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina em PBS (80 mg/Kg/10 mg/Kg), e, sacrificados por deslocamento cervical, segundo a recomendação do CETEA. Cérebro e pulmão foram removidos e pesados. Os órgãos foram macerados em 1mL de PBS estéril por fricção dos mesmos entre lâminas histológicas foscas. Após a homogeneização completa do órgão, foi retirada uma alíquota de 50µl desse macerado e do fluido obtido do LBA. Foram cultivados, com auxílio de pérolas de vidro, em placas de Petri (60x15) contendo ágar *Sabouraud* dextrose. Em seguida as placas foram vedadas e incubadas em estufa (Laborlife BOD) a 35°C. Após 48 h foi realizada a contagem das colônias e o resultado foi expresso pelo número de UFC por quantidade em gramas de órgão e por mililitro de lavado. A presença da levedura foi confirmada por microscopia utilizando tinta nanquim.

4.10.2 Contagem total e diferencial de células a partir do Lavado broncoalveolar (LBA)

✓ Contagem Total

Uma alíquota de 20 μ L da solução de albumina contendo as células do lavado foi diluída em 180 μ L de Türck. Foi retirada uma alíquota de 10 μ L dessa solução para a contagem das células totais. Utilizou-se para contagem a câmara de Neubauer e microscópio óptico com aumento de 40x.

✓ Contagem diferencial

Foram realizados esfregaços preparados em citocentrífuga (CT-2000, CIENTEC) e corados pelo método panótico rápido e visualizados em microscópio óptico com objetiva de imersão e aumento de 100X. Para a distinção dos tipos celulares (polimorfonucleares e mononucleares) foram utilizados critérios morfológicos.

4.10.3 Ensaio de fagocitose “*in vivo*” a partir do lavado broncoalveolar (LBA)

Foram realizados esfregaços preparados em citocentrífuga (CT-2000, CIENTEC) corados pelo método panótico rápido e visualizados em microscópio óptico com a objetiva de imersão (100x). O número total de células mononucleares com células fúngicas fagocitadas foram contadas.

4.10.4 Análise histológica

As amostras de tecidos retiradas do Sistema Nervoso (cérebro e cerebelo) e pulmões dos camundongos, dos cinco grupos em estudo, foram fixadas em formol P.A. a 10% para análise histopatológica.

Estas amostras foram processadas rotineiramente no Laboratório de Pesquisa em Patologia Cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG para serem incluídas em blocos de parafina.

A partir dos blocos de parafina foram realizados cortes histológicos de 3 a 4 μm (micras ou micrômetros) de espessura, colocados sobre lâminas, desparafinados e desidratados por tratamento com xilol e álcool.

A seguir, as lâminas foram coradas pelo método de coloração de rotina pela Hematoxilina e Eosina (HE) e analisadas histopatologicamente por dois patologistas, ambos sem conhecimento prévio de qualquer informação sobre o grupo de origem das amostras.

A análise histopatológica foi feita em toda a extensão dos cortes histológicos, inicialmente em aumento de 40x e 100x, para avaliação dos seguintes aspectos:

- ✓ identificação dos órgãos;
- ✓ arquitetura tecidual das amostras;
- ✓ presença de reação inflamatória e sua intensidade semi-quantificada como ausente (0), leve (+), moderada (++) e acentuada (+++).

A pesquisa de criptococos foi feita em cortes histológicos dos parênquimas nervoso e pulmonar corados pela coloração de rotina HE e também pelas colorações com sais de prata (Método de Grogott) e PAS (Periodic Acid Schifit) para melhor visualização do agente específico. As lâminas coradas por todas essas colorações foram analisadas ao microscópico em aumento de 100x, 200x e 400x.

A presença de CG nas amostras foi considerada quando suas formas foram visualizadas claramente nos tecidos na coloração pela HE e comprovada pelas colorações especiais.

4.11 Análise estatística dos dados

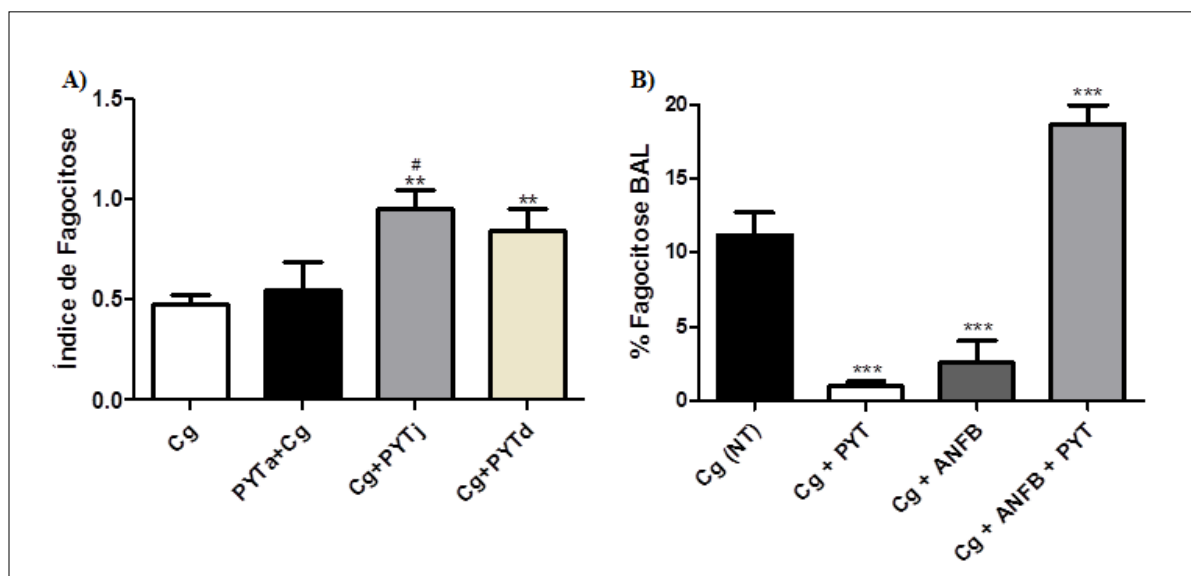
Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão e analisados utilizando o teste “*t*” de “*Student*” ou análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa Graph Pad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) e consideradas significativas as diferenças $\leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Testes de fagocitose, espécies reativas de oxigênio (ROS) e proliferação celular (IPR).

Para avaliar o efeito do imunomodulador obtido do micro-organismo *Pythium insidiosum* “*in vitro*”, os testes de fagocitose, proliferação intracelular (IPR) e espécies reativas de oxigênio (ROS) foram considerados.

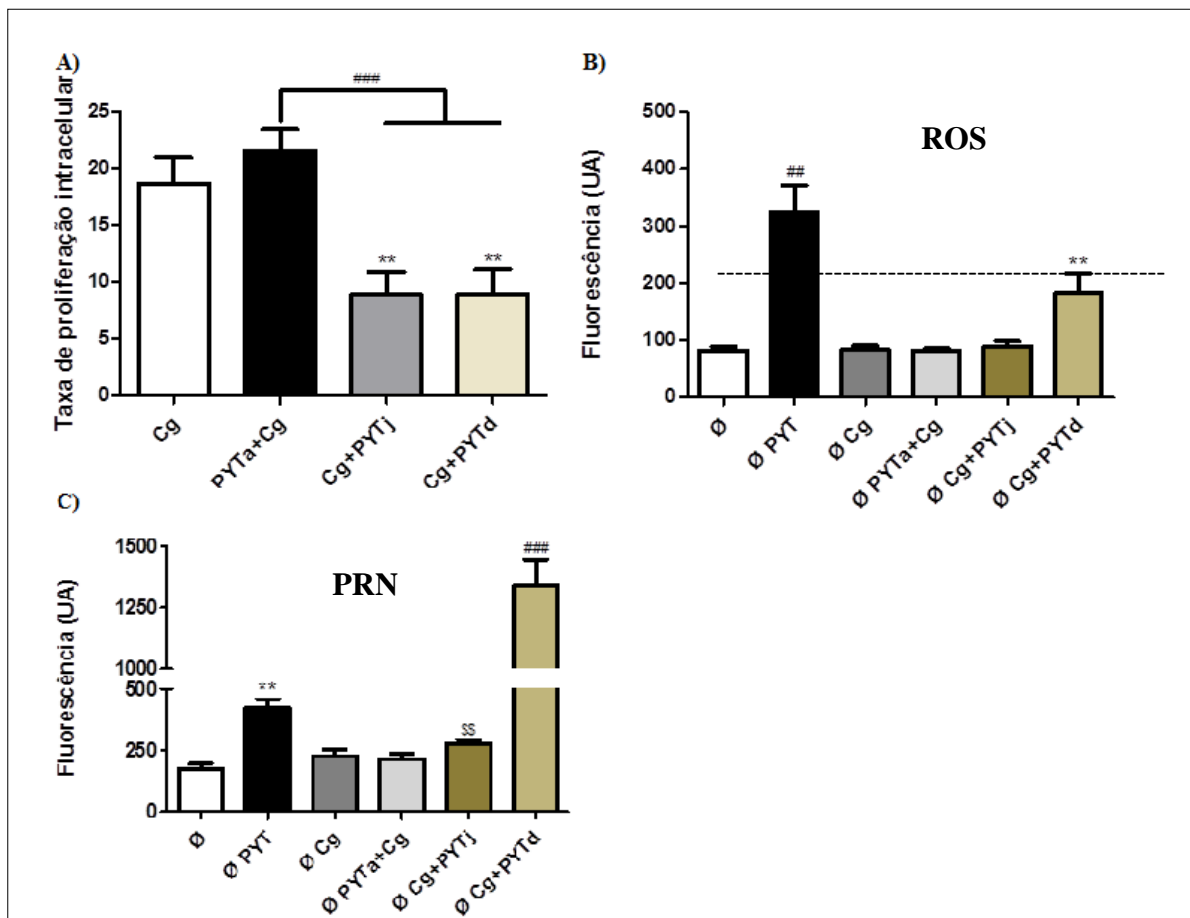
O ensaio de fagocitose (**Figura 12**) demonstrou que o imunomodulador, quando adicionado (ao poço da placa de 24 poços) junto (j) (Cg+PYTj) e posteriormente (d) (Cg+PYTd) com o *C. gattii* após 24 horas de incubação, aumenta o percentual de fagocitose comparados ao controle ($p < 0,01$) (**Figura 12A**). Também foi observada diferença estatística entre os grupos com o imunomodulador adicionado ao mesmo tempo com o *C. gattii* (Cg+PYTj), comparado ao grupo com o imunomodulador previamente adicionado (a) com *C. gattii* (PYTa+Cg). O primeiro grupo demonstrou maior índice de fagocitose ($p < 0,05$). Além disso, também foi observado um aumento no percentual de fagocitose quando o imunomodulador foi combinado com o antifúngico anfotericina B, na análise *in vivo* de macrófagos, presentes na lâmina citológica a partir do lavado bronco alveolar (LBA) quando comparado ao controle ($p < 0,005$) (**Figura 12B**).

Figura 12 – Ensaio de fagocitose

(A) O ensaio de fagocitose foi realizado “*in vitro*” com macrófagos obtidos da medula de murinos C57BL/6. Após 24 horas de incubação, o índice fagocítico dos macrófagos, tratados com o imunomodulador, inoculado ao mesmo tempo e posteriormente com o *C. gattii*, aumentou a fagocitose quando comparado ao controle. **(B)** O ensaio de fagocitose foi realizado “*in vivo*”, a partir do BAL, realizado a análise microscópica da lâmina citológica. Após a contagem foi possível observar um aumento da fagocitose do fungo por macrófagos, para o grupo tratado, com a combinação imunomodulador mais anfotericina B (Cg+ANFB+PYT) quando comparado ao controle. # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,005$.

O teste de ROS (**Figura 13B**) e PRN (**Figura 13C**) mostrou que o imunomodulador altera as propriedades antioxidantes da cápsula polissacarídica, com uma elevação ($p < 0,01$) na produção de ROS e PRN pelos macrófagos, quando comparado aos demais grupos e no grupo controle. Esses resultados estabelecem uma relação direta com o ensaio IPR (**Figura 13A**). Nos grupos (Cg+PYTj; Cg+PYTd), observou-se uma significativa redução no índice de proliferação intracelular ($p < 0,01$), comparado com os demais grupos.

Figura 13 – Ensaio de ROS e PRN



(A) Índice de proliferação intracelular (IPR). **(B)** O imunomodulador aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no interior dos macrófagos. A linha pontilhada (----) indica os níveis de ROS nos tratamentos. **(C)** O imunomodulador aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio - Peroxinitrito (PRN) no interior dos macrófagos. ∅ macrófago; ∅PYT macrófago com imunomodulador; ∅Cg macrófago com a levedura; ∅PYTa+Cg macrófago com imunomodulador adicionado previamente a levedura; ∅Cg+PYTj macrófago com o imunomodulador adicionado ao mesmo tempo da levedura; ∅Cg+PYTd macrófago com imunomodulador adicionado posteriormente à levedura. **p<0,01; ##p<0,01; \$\$p<0,01 e ###p<0,005.

5.2 Toxicidade do imunomodulador

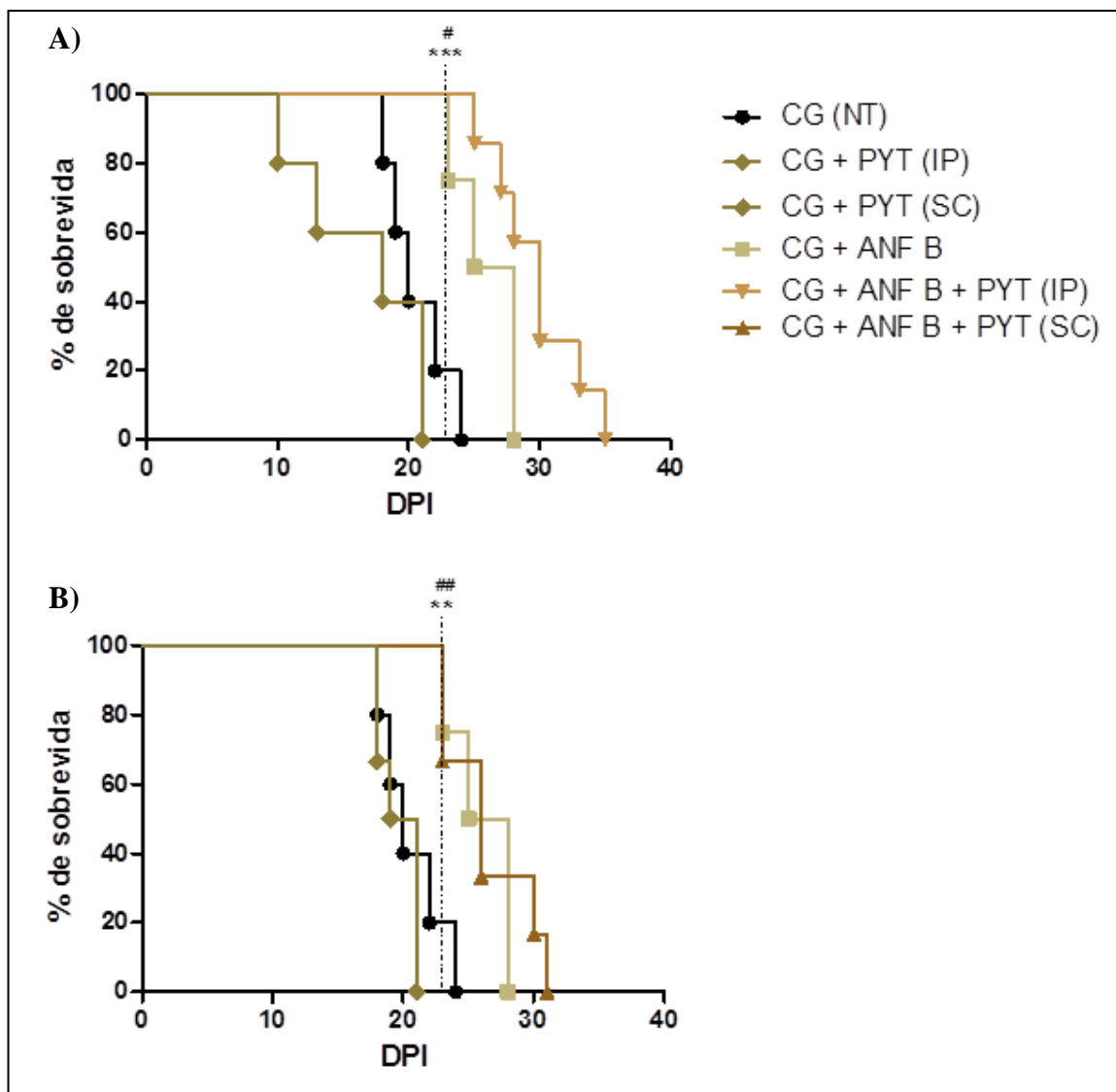
Baseando-se nos resultados obtidos das análises “*in vitro*” (fagocitose, IPR, ROS e PRN) os testes “*in vivo*” foram realizados. Com a finalidade de verificar a segurança do imunomodulador, inicialmente, o mesmo foi submetido a um teste de toxicidade. Para isso, foram utilizados (6) camundongos machos

C57BL/6. Depois de serem inoculados com 100 mg/mL do imunomodulador os animais foram sacrificados após 60 dias. Dados não mostrados.

5.3 Curva de sobrevivência de camundongos infectados com *C. gattii*, submetidos a diferentes vias de tratamentos.

Após a avaliação da toxicidade, foi realizada a padronização da via terapêutica mais efetiva, para a administração do imunomodulador. Em ambas as curvas foram observados um aumento na sobrevivência dos animais. Na curva **A**, onde o imunomodulador foi administrado por via intraperitoneal, a média de sobrevivência dos animais foi de 30 dias. Além disso, foi observado um aumento na sobrevivência dos animais tratados, com a combinação anfotericina B mais imunomodulador, em comparação aos grupos tratados com o imunomodulador, e o grupo não tratado (controle) ($p < 0,005$) (**Figura 14A**). Já na curva **B**, também observou-se aumento na sobrevivência dos animais recebendo a combinação imunomodulador (administrado por via subcutânea) mais anfotericina B ($p < 0,01$), quando comparado aos grupos tratados com o imunomodulador e o grupo não tratado (controle) (**Figura 14B**). Os animais tratados com anfotericina B apresentaram um perfil de sobrevivência semelhante aos da combinação, não havendo diferença estatisticamente significativa entre elas. Porém, os grupos que receberam o antifúngico foram estatisticamente diferentes, em ambas as curvas **A** e **B**. Especialmente, quando comparada aos grupos que receberam o imunomodulador e o grupo controle sendo $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente. A média de sobrevivência dos animais que receberam o imunomodulador por via subcutânea foi de 25 dias. Como estabelecido em Materiais e Métodos, a via intraperitoneal foi escolhida para os demais testes.

Figura 14 – Padronização da via de administração



(A) Curva de sobrevivência de camundongos sensibilizados com o imunomodulador administrado por via intraperitoneal (IP). **(B)** Curva de sobrevivência de camundongos sensibilizados com o imunomodulador administrado por via subcutânea (SC). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. NT= não tratado; CG = infectado e não tratado; PYT = imunomodulador; ANF = anfotericina B; IP = via intraperitoneal; SC = via subcutânea; DPI = dias pós a infecção.

5.4 Avaliação da curva de sobrevivência dos camundongos tratados com a combinação imunomodulador + anfotericina B e imunomodulador + fluconazol.

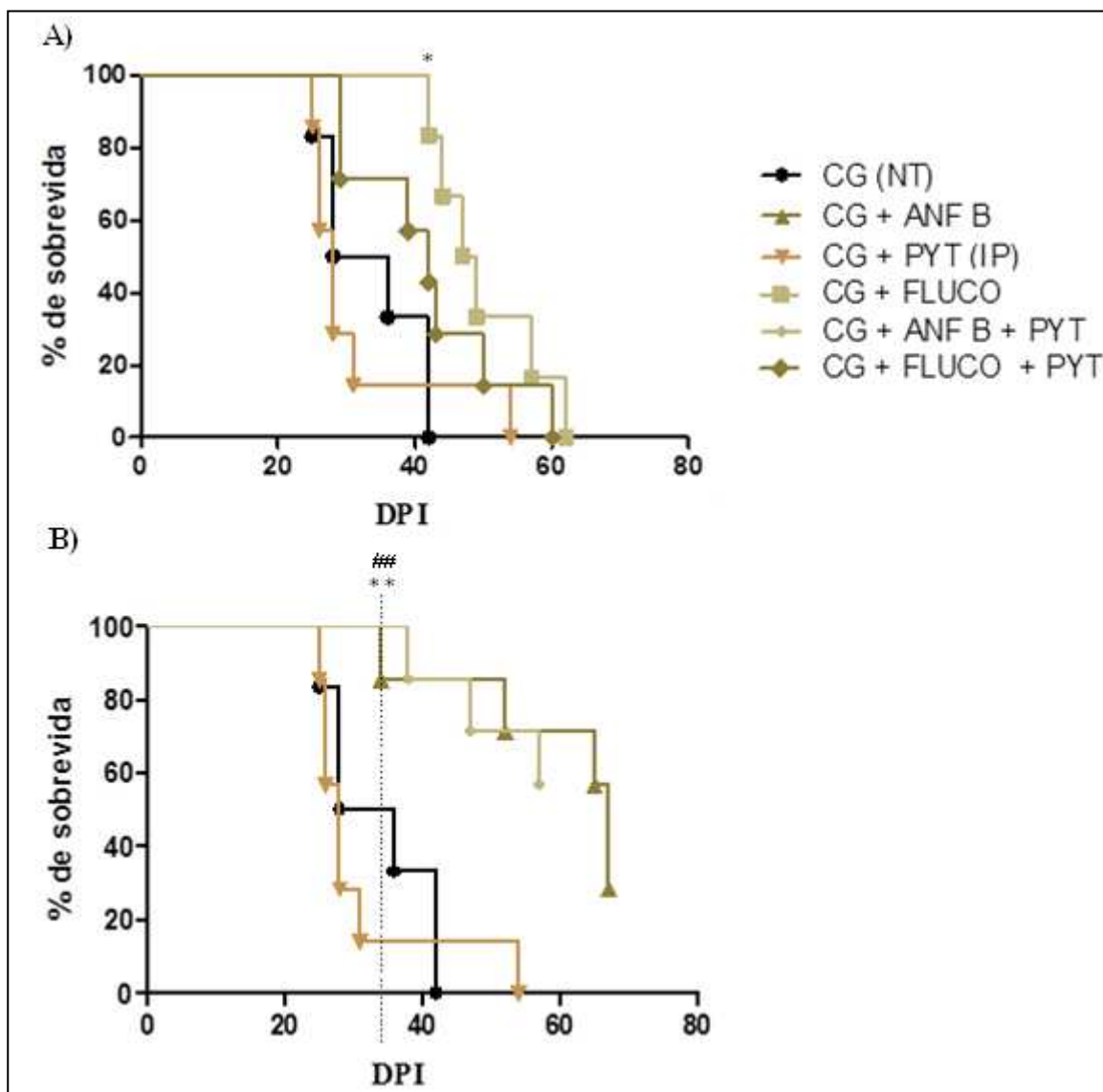
Após a avaliação da via terapêutica, baseado na sobrevivência dos camundongos, realizou-se a avaliação da ação sinérgica do imunomodulador frente aos

antifúngicos anfotericina B (ANF B) e fluconazol (FLUCO). Camundongos C57BL/6 machos em modelo de infecção Intratraqueal, conforme descrito no item 4.5.

A sobrevida dos animais, tratados com a combinação, imunomodulador e fluconazol, imunomodulador e anfotericina B, foram estatisticamente maior, quando comparados, aos grupos, que receberam o imunomodulador e o grupo não tratado (controle) ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$); (**Figura 15A**) e (**Figura 15B**) respectivamente. Entretanto, 1 animal do grupo tratado com anfotericina B, e, 3 animais tratados com a combinação imunomodulador + anfotericina B sobreviveram por mais tempo.

O grupo que recebeu o fluconazol (**Figura 15A**), mesmo não havendo diferença estatística, sobreviveu mais do que os que receberam a combinação imunomodulador + fluconazol. Para os testes a seguir, foi escolhido apenas o antifúngico anfotericina B. Diante destes resultados realizou-se uma nova curva de sobrevida.

Figura 15 – Curva de sobrevida comparando os antifúngicos anfotericina b e fluconazol



(A) Curva de sobrevida dos animais tratados com a combinação imunomodulador e fluconazol

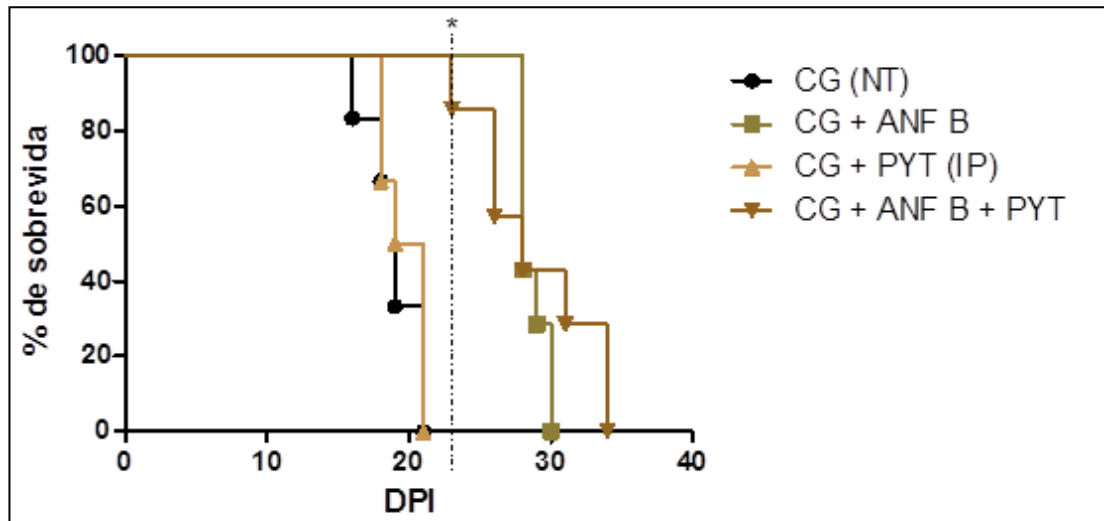
(B) Curva de sobrevida dos animais tratados com a combinação imunomodulador e anfotericina B. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ### $P < 0,01$. NT= não tratado; CG = infectado e não tratado; PYT = imunomodulador; ANF B = anfotericina B; FLUCO = fluconazol; IP = via intraperitoneal.

5.5 Avaliação da ação sinérgica do imunomodulador com a anfotericina B.

Para avaliar a combinação imunomodulador + anfotericina B, o modelo de infecção intratraqueal conforme descrito no item 4.5 foi utilizado. Após 34 dias de tratamento, foi obtida uma curva de sobrevivência (**Figura 16**).

A **figura 16**, mostra que os animais que foram inoculados com a combinação de ANF B + PYT, sobreviveram por mais tempo que aqueles tratados apenas com ANF B. Os animais tratados com a combinação apresentaram diferença estatística em relação ao grupo tratado apenas com o imunomodulador e ao não tratado (grupo controle) (* $p < 0,05$). A média de sobrevivência dos animais tratados com a combinação ANF B + PYT foi de 29 dias enquanto a média dos animais que receberam apenas o antifúngico (CG + PYT) foi em torno de 26 dias.

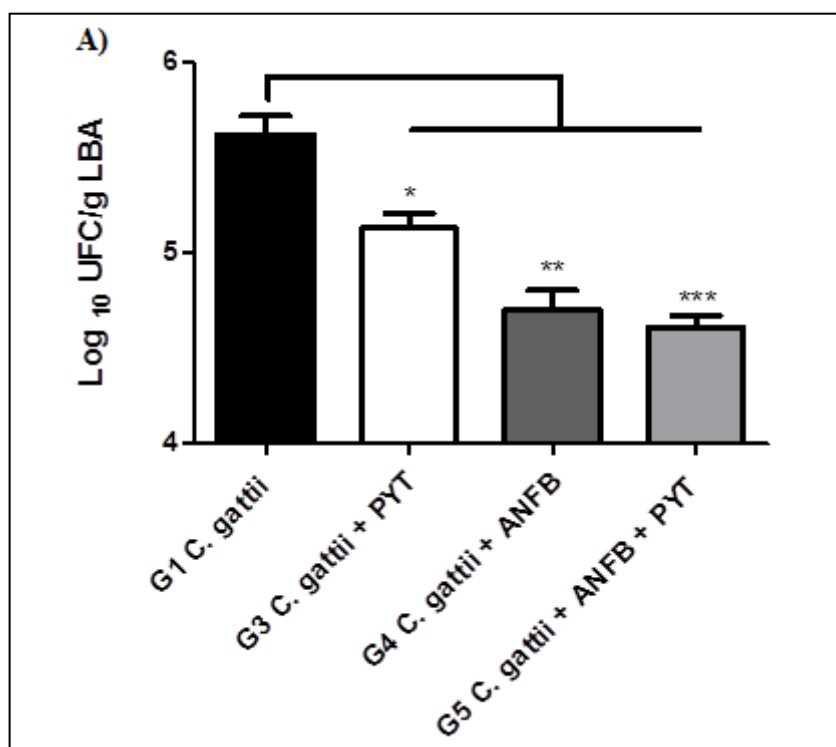
Figura 16 – Curva de sobrevivência utilizando o antifúngico anfotericina B.



Seis camundongos por grupo foram inoculados com 10^4 células da linhagem de CG L27/0, pela via intratraqueal e tratados diariamente com anfotericina B (0,5 mg/Kg), e, a cada 5 dias com o imunomodulador (PYT) 100mg/mL. NT= não tratado; ANF B = anfotericina B; PYT = imunomodulador; ANF B + PYT = combinação imunomodulador e anfotericina B; IP = via intraperitoneal * $p < 0,05$.

Para avaliar o efeito, entre a combinação imunomodulador + antifúngico foi realizada a quantificação das UFC. Para quantificar as UFC recuperadas dos órgãos dos camundongos realizou-se uma nova infecção. Após 15 dias de infecção, 43 animais, foram sacrificados. O lavado bronco alveolar, cérebros e tecidos pulmonares foram coletados. Os resultados destas contagens estão demonstrados nas figuras (**Figura 17, 18 e 19**) respectivamente.

Figura 17 – Contagem de Unidades formadoras de colônia no Lavado bronco alveolar.

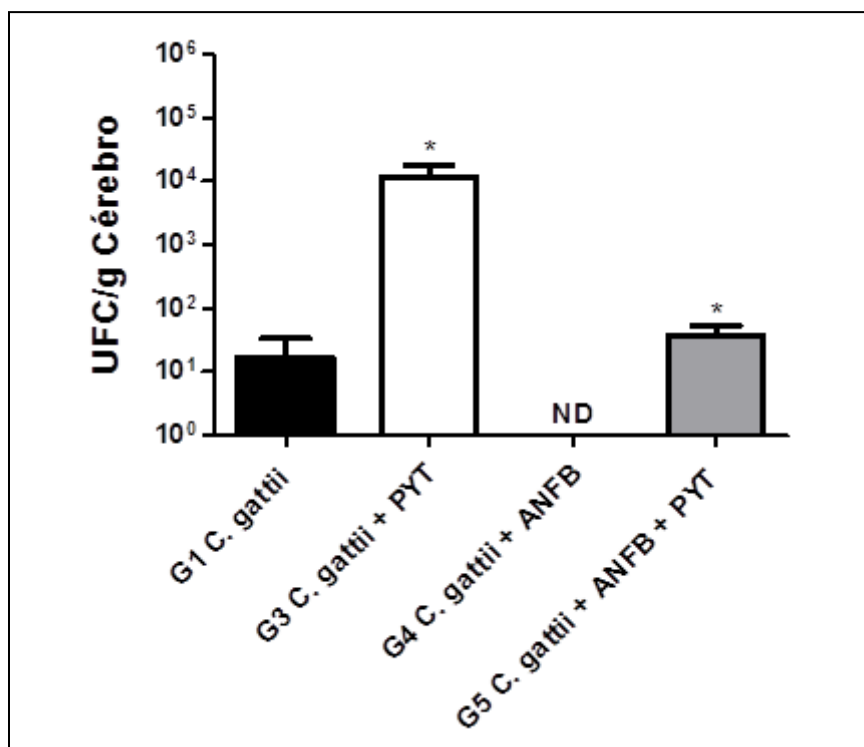


Unidades formadoras de colônias (UFCs) recuperadas dos pulmões após 15 de infecção nos diferentes tratamentos. NT (Controle, não tratado); ANFB (Anfotericina B); PYT (Imunomodulador); ANFB + PYT (Anfotericina B + Imunomodulador). *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,005.

O número de UFC recuperadas no lavado bronco alveolar (BALF) de todos os grupos comparados com o grupo controle foram estatisticamente significativos (p < 0,01). Os grupos tratados com o CG + imunomodulador + PYT e CG + ANFB e anfotericina B (p < 0,005) foram estatisticamente significativos (**Figura 17**).

Quanto ao cérebro, após 15 dias de infecção, o *C. gattii* foi recuperado no tecido cerebral nos grupos não tratados ($p < 0,05$), tratado apenas com o imunomodulador ($p < 0,05$) e tratado com a combinação imunomodulador e anfotericina B ($p < 0,05$) (**Figura 18**). Observou-se que o imunomodulador apresentou um abundante crescimento da levedura ($p < 0,05$).

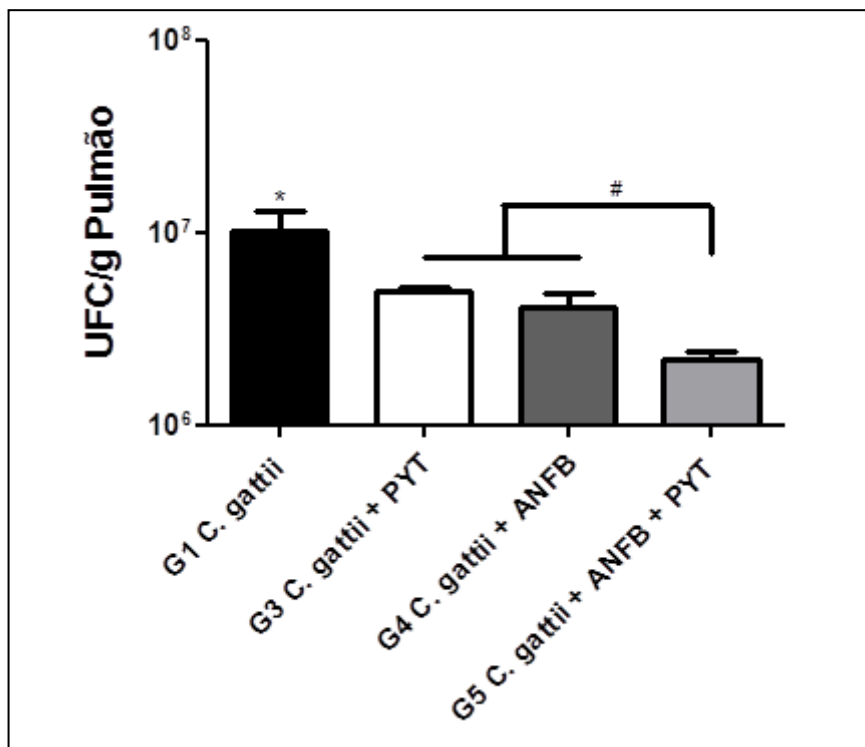
Figura 18 - Contagem de unidades formadoras de colônia no cérebro



G1 *C. gattii* (Controle, não tratado), *C. gattii* + PYT (o fungo + o imunomodulador de *Pythium*); *C. gattii* + ANFB (o fungo + anfotericina B), *C. gattii* + ANFB + PYT (imunomodulador de *Pythium* + anfotericina B).

Nos pulmões o número de UFC recuperadas após 15 dias de infecção foram quantificadas (**Figura 19**), o controle apresentou diferença estatística com os demais grupos ($p < 0,05$). A combinação de CG + ANFB + PYT apresentou diferença estatística quando comparada aos grupos, CG + PYT ($p < 0,005$) e CG + ANFB ($p < 0,01$).

Figura 19 - Contagem de unidades formadoras de colônia nos tecidos pulmonares



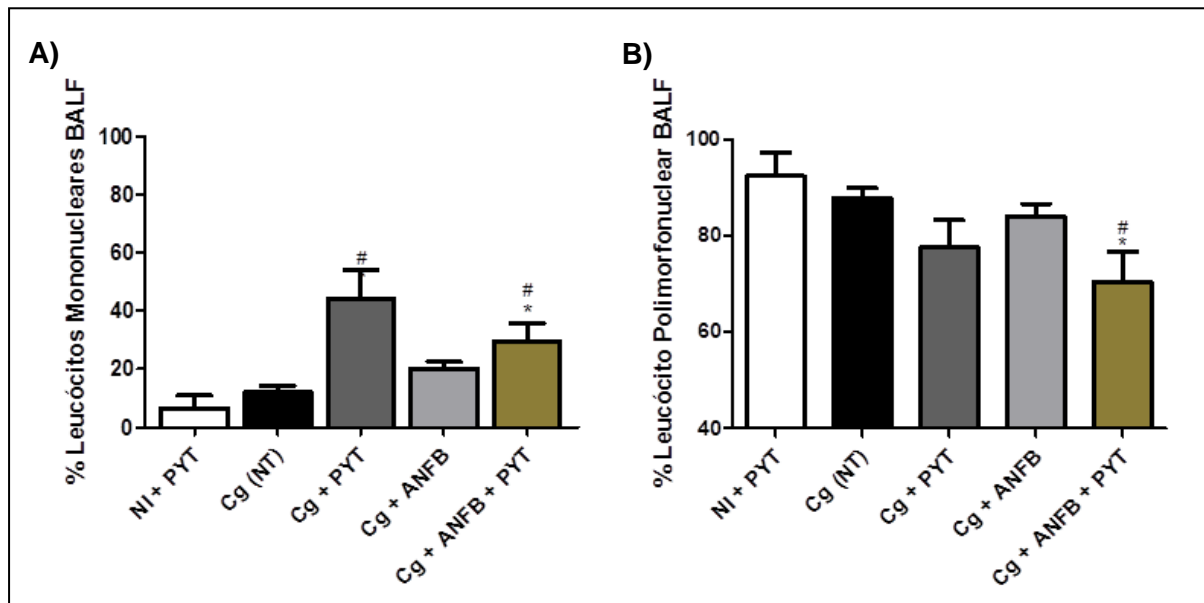
NT (Controle, não tratado), ANFB (Anfotericina B), PYT (Imunomodulador), ANFB + PYT (Anfotericina B + Imunomodulador). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

5.5.1 Contagem de células a partir do Lavado broncoalveolar (LBA)

✓ Contagem diferencial

Foi realizada também a contagem diferencial entre células mononucleares e polimorfonucleares.

Como se observa na (**Figura 20A**), no grupo controle as células mononucleares estão baixas comparadas com aquelas observadas em camundongos tratados com o CG + PYT e com a combinação de ambos (CG + ANFB + PYT) ($p < 0,05$). Na (**Figura 20B**), a análise quantitativa de células polimorfonucleares, com predomínio de neutrófilos, estão aumentadas nos camundongos controles, e, mais sutilmente diminuídas nos camundongos inoculados com o imunomodulador + PYT + ANFB, ou com ambos ($p < 0,05$). Os grupos NI + PYT, e, CG + NT, apresentaram diferença para todos os grupos.

Figura 20 – Contagem de células a partir do lavado broncoalveolar

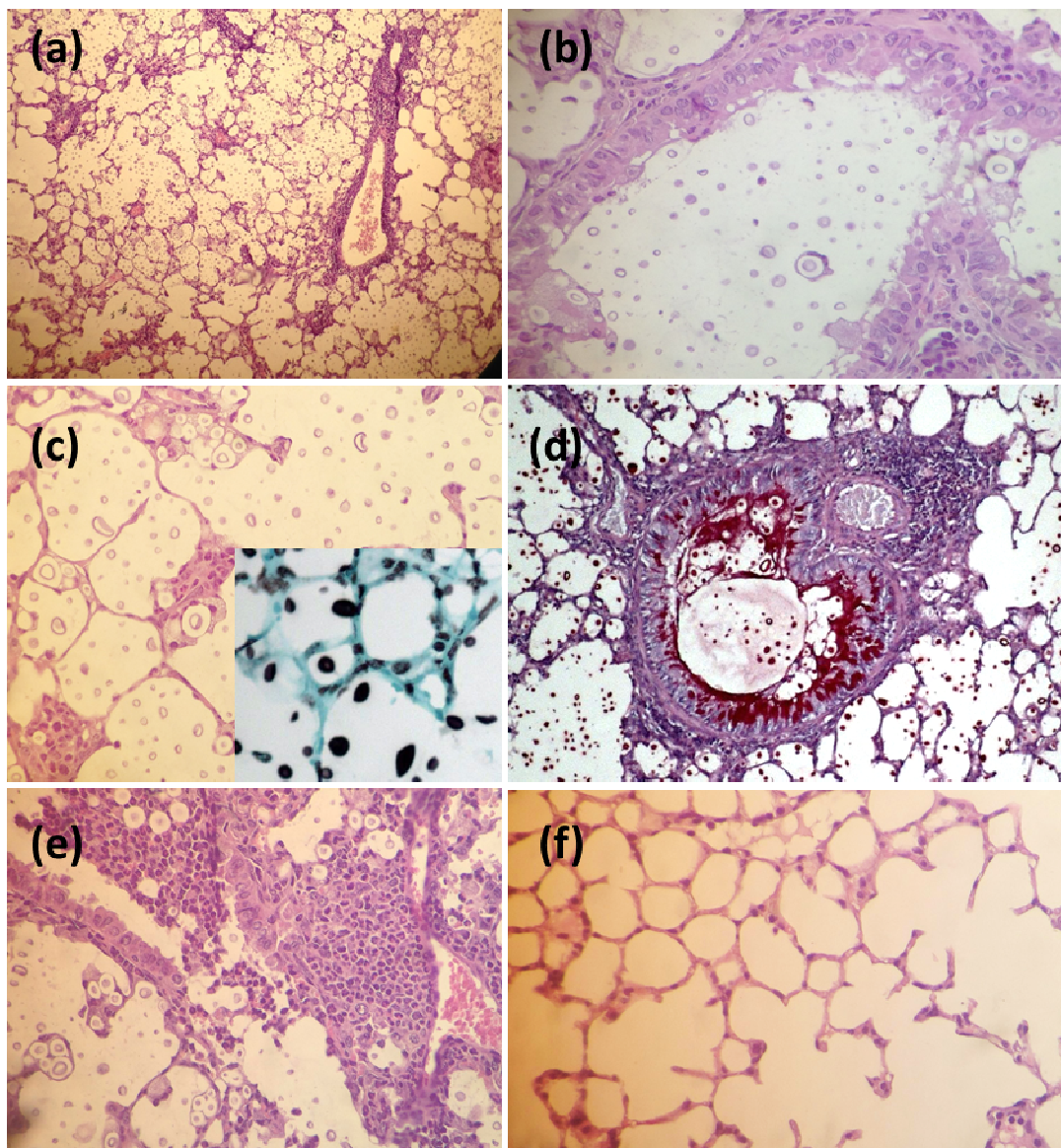
A) Os controles demonstraram poucas células mononucleares, enquanto PYT, ANFB e ANFB + PYT demonstraram um aumento dessas células. **B)** Os controles demonstraram um aumento de células polimorfonucleares com predomínio de neutrófilos. Entretanto, os camundongos que foram inoculados com PYT, ANFB e ANFB + PYT observou-se uma diminuição moderada. NT (Controle, não tratado), ANFB (Anfotericina B), PYT (Imunomodulador), ANFB + PYT (Anfotericina B + Imunomodulador). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

5.6 Análise histopatológica

Os exames histopatológicos do pulmão demonstraram grande quantidade de leveduras de *C. gattii* nos alvéolos e nas ramificações bronqueoalveolares (**Figura 21**). A reação inflamatória nas regiões alveolares foi mínima ou estava completamente ausente. As regiões linfodonais do Pulmão, demonstraram reações focais compostas por numerosas células mononucleares do tipo linfocitárias. Observou-se poucas leveduras de *C. gattii* dentro das regiões linfóides. Em H&E as leveduras aparecem descoradas, com parede celular grossa e uma cápsula proeminente. As leveduras dentro dos alvéolos, aparecem como estruturas esféricas ou ovaladas separadas por espaços amplos (cápsulas), formando conglomerados, que, por sua vez, induzem deformação anatômica dos alvéolos. As leveduras esféricas de *C. gattii* apresentam um diâmetro de 3 a 13 μm e todas possuem cápsula proeminente de 2 a 6 μm . A característica mais importante das lesões pulmonares foi a

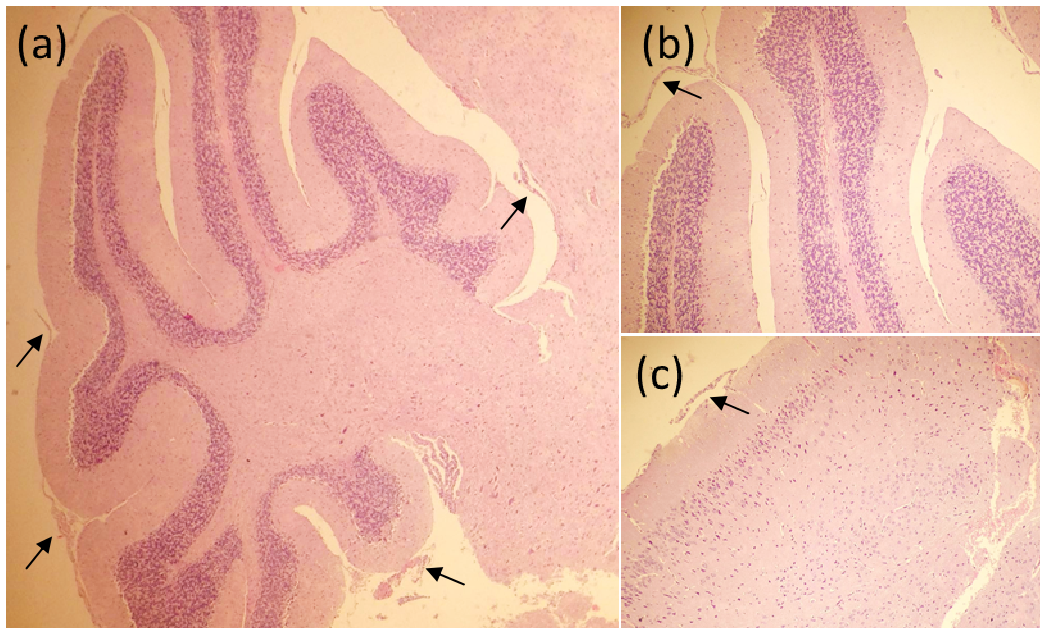
quantidade exacerbada de leveduras de *C. gattii*, mas as mesmas não produziram reação inflamatória importante. Em contraste, nos cortes de tecidos cerebrais corados com H&E, a presença de leveduras de *C. gatti* foi baixa ou ausente (Figura 22). Não foi observado reação inflamatória proeminente. As meninges aparecem engrossadas e separadas da massa encefálica. A característica mais relevante observada no cérebro dos camundongos inoculados com *C. gattii*, consiste na pouca reação inflamatória e também na quantidade mínima de leveduras observadas (Figura 22).

Figura 21 – Anatomopatológico de pulmão dos camundongos C57BL/6.



A figura mostra: (a) uma visão geral do Pulmão de um camundongo inoculado com *C. gattii*. As leveduras aparecem como pequenos pontos dentro dos alvéolos. Note a grande quantidade de leveduras encapsuladas (espaços vazios entre as leveduras) (10X); (b) esta figura mostra a presença de numerosas leveduras de *C. gattii* dentro de um espaço bronquial (40X); (c) a figura mostra detalhes das leveduras encapsuladas de *C. gattii* dentro dos alvéolos. A figura da parte inferior direita, mostra um detalhe do mesmo corte histológico corado com coloração de Grocott (40X); (d) mostra de tecido pulmonar de um camundongo corado com coloração de PAS mostrando grande quantidade de leveduras nos espaços intra-alveolares e dentro do tecido bronquial (20X); (e) a figura mostra a reação pulmonar linfocítica detectada em regiões linfóides do pulmão. Algumas leveduras podem ser observadas (40X); (f) corte de pulmão de um camundodongo controle (nao inoculado com *C. gattii*) (20X). É importante ressaltar que todos os camundongos nos grupos inoculados com *C. gattii* mostraram pouca reação inflamatória linfocitaria e grande quantidade de leveduras.

Figura 22 – Anatomopatológico de cérebro dos camundongos C57BL/6



A figura (a) mostra um corte histopatológico do cérebro de um camundongo inoculado com *C. gattii*. É evidente uma meningoencefalite aguda com separação física das meninges (flechas pretas) e engrossamento da massa encefálica. A ausência de leveduras encapsuladas é a característica mais relevante nos cortes histopatológicos do cérebro (10X). As figuras (b e c) mostram detalhes do dano tissular das meninges com desprendimento físico do tecido encefálico (20X). A quantidade de leveduras observadas nos cortes e nos cortes dos demais grupos, foi mínima ou estavam ausentes. Este resultado contrasta com a grande quantidade de leveduras observadas nos pulmões de todos os grupos inoculados com *C. gattii* neste estudo.

6 DISCUSSÃO

A criptococose é uma doença fúngica de impacto epidemiológico mundial. Atualmente existem poucas opções terapêuticas para o tratamento desta infecção, e, para a comunidade médica, é ainda considerado um grande desafio. Novas modalidades terapêuticas são uma perspectiva para minimização dos efeitos colaterais dos fármacos existentes no mercado. A imunoterapia surge como uma possível alternativa para auxiliar na ação sinérgica e/ou redução do tempo no tratamento. Proteínas com ação imunomoduladora, como as de *Pythium insidiosum*, têm sido estudadas em caso de pitiose ativa em humanos, caes e cavalos com resultados significativos (Mendoza, Mandy e Glass, 2003).

As características imunomoduladoras das proteínas extraídas de *Pythium insidiosum* foram documentadas desde 1983 (Miller e Campbell, 1982; 1984; Mendoza *et al.*, 1992; Mendoza, Mandy e Glass, 2003; Mendoza e Newton, 2005). De acordo com estes estudos, as proteínas imunogênicas extraídas a partir de isolamentos de *P. insidiosum* apresentam propriedades de modular uma resposta imune com perfil Th2 para um perfil Th1, em animais e humanos com pitiose ativa.

Sabe-se que o *P. insidiosum* estimula uma resposta típica Th2 nos animais, e seres humanos com pitiose. A resposta inflamatória desencadeada por este patógeno inclui uma reação granulomatosa eosinofílica franca (Mendoza e Newton, 2005; Gaastra *et al.*, 2010). As interleucinas tipo IL5, IL4 e IL10, se apresentam elevadas em pacientes com a doença. Com a utilização das proteínas imunomoduladoras de PYT, observa-se uma mudança de resposta Th2 para Th1, com a expressão de IFN-gama, IL2 e IL12 (Thitithanyanont *et al.*, 1998; Mendoza e Newton, 2005; Bach *et al.*, 2010). Infelizmente, com a exceção de coelhos, as infecções experimentais por *P. insidiosum* não podem ser reproduzidas em animais (Gaastra *et al.*, 2010; Schmiedt *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013; Zanette *et al.*, 2015).

A falta de um modelo animal apropriado, para avaliar as propriedades imunomodulatórias destas proteínas, tem sido considerada um grande

problema. Nesta investigação, foi utilizado o modelo de camundongo C57BL/6 desafiado com *C. gattii*. O objetivo foi avaliar as proteínas de PYT e explorar estas propriedades, para auxiliar no tratamento de animais com criptococose experimental (Fonseca *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012; Angkasekwina *et al.*, 2014).

Várias linhagens de camundongos poderiam ter sido escolhidas para o presente estudo. Uma das principais razões para a escolha de camundongos C57BL/6 foi justamente a primícia, de que em outros trabalhos realizados por (Wakeham, Wang e Xing, 2000; Watanabe *et al.*, 2004; Busch *et al.*, 2016) estes animais apresentam uma resposta imunológica intrínseca Th1 e Th2. Contrapondo, por exemplo, aos camundongos BALB/C que são notórios por estimular uma resposta Th2 (Angkasekwina *et al.*, 2014). A hipótese do presente trabalho é que as proteínas imunomoduladoras de PYT que estimulam uma resposta Th1, somadas a consistência da resposta Th1 da linhagem de camundongo C57BL/6, seriam sinérgicas e eliminariam o *C. gattii* dos tecidos afetados, uma vez que não existem modelos experimentais de criptococose crônico descritos na literatura (Wakeham, Wang e Xing, 2000; Watanabe *et al.*, 2004; Busch *et al.*, 2016).

Numerosos estudos que utilizam o imunomodulador de *P. insidiosum* em humanos, bovinos, cavalos, cães, gatos, e outros (Miller e Campbell, 1983; Mendoza *et al.*, 1992; Thitithanyanont *et al.*, 1998; Mendoza, Mandy e Glass, 2003; Mendoza e Newton, 2005; Schmiedt *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013) determinaram que as proteínas imunogênicas extraídas a partir deste organismo Oomycota, foram bem toleradas nestas espécies. O mesmo ocorreu quando o imunomodulador foi administrado várias vezes sem nenhuma toxicidade. Bach e colaboradores (Bach *et al.*, 2010; Bach *et al.*, 2013) obtiveram resultados semelhantes utilizando um modelo de coelho para pitiose. Neste modelo, os imunógenos de *P. insidiosum* não demonstraram efeitos colaterais. O teste de toxicidade realizado nos camundongos, demonstraram também que o produto é seguro. Sintomas tóxicos e/ou adversos não foram observados nos camundongos inoculados. Estes achados são importantes

para assegurar que o produto não age aumentando a capacidade patogênica de *C. gattii*, mais diretamente no aparelho imune do hospedeiro (Mendoza e Newton, 2005; Bach *et al.*, 2013).

Quando as características, ficou evidente que essas proteínas apresentam capacidades imunogênicas ativas estimulando a fagocitose, especialmente quando testados *in vitro* com leveduras preparadas de cultivos frescos de *C. gattii*. Apoio estatístico, para a estimulação *in vitro*, dos macrófagos da médula óssea obtida a partir do camundongo C57BL/6 com o *C. gattii* são observados na **Figura 12A**. A figura mostra que o sistema imunológico é estimulado com o imunomodulador utilizado em combinação com o *C. gattii* e/ou quando este é adicionado posteriormente. Em pacientes com pitiose que receberam o imunomodulador e no modelo de coelhos inoculados com o produto, observou-se um aumento no número de neutrófilos e macrófagos monucleares (Miller e Campbell, 1983; Thitithanyanont *et al.*, 1998; Mendoza e Newton, 2005; Bach *et al.*, 2010; Schmiedt *et al.*, 2012; Bach *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013). Estes autores, também relataram um aumento em suas propriedades fagocíticas. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo utilizando as contagens citológicas de macrófagos quando exposto a uma combinação de *C. gattii* e anfotericina B com o imunomodulador “*in vivo*” (**Figura 12B**). Neste experimento, o aumento na capacidade fagocítica dos macrófagos foi quase o dobro daqueles observados nos controles. O aumento na capacidade fagocítica dos macrófagos expostos a uma combinação de *C. gattii*, anfotericina B e imunomodulador, foi estatisticamente significativo, com quase o dobro daqueles observados no grupo controles. Especialmente quando comparado com os camundongos expostos, apenas como o *C. gattii* ($p < 0,005$). Os trabalhos de Bach *et al* (Bach *et al.*, 2010; Bach *et al.*, 2013) e aqueles em paciente com pitiose (cães, cavalos e seres humanos) (Miller e Campbell, 1983; Hensel *et al.*, 2003; Gaastra *et al.*, 2010; Schmiedt *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013) junto com os resultados deste estudo, indica que os imunógenos de *P. insidiosum* exercem uma estimulação ativa nos macrófagos dos hospedeiros mamíferos. Baseados nos casos clínicos (Dixon *et al.*, 1998; Thitithanyanont *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 2003; Mendoza, Mandy e Glass,

2003; Mendoza e Newton, 2005; Schmiedt *et al.*, 2012), e no modelo experimental em coelhos (Bach *et al.*, 2013; Santurio *et al.*, 2003) e em camundongos (este estudo), pode-se concluir que os imunógenos de *P. insidiosum* produzem uma reação positiva no sistema imunológico inato. Nos estudos de casos clínicos, encontrou-se que, a inoculação de 100 mg/mL dos imunógenos de *P. insidiosum* em cavalos e seres humanos com pitiose, estimula uma resposta Th1, com o estímulo de células fagocíticas (Thitithanyanont *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 2003; Mendoza e Newton, 2005). Os resultados do presente trabalho sugerem que o imunomodulador de *P. insidiosum*, em camundongos, comporta-se de uma maneira semelhante aos casos da doença ativa em cavalos, seres humanos, assim como o modelo animal utilizado em coelhos (Bach *et al.*, 2013; Santurio *et al.*, 2003; Zanette *et al.*, 2015).

O aumento da capacidade fagocítica desencadeada pelo imunomodulador de *P. insidiosum*, também foi apoiado, pelos resultados obtidos nos experimentos que avaliaram a resposta “*in vitro*” de ROS, IPR e PRN. Nesses experimentos, as alterações nas propriedades antioxidantes da cápsula de *C. gattii* (ROS) e a diminuição da proliferação das leveduras de *C. gattii* intracelular (IPR) nos macrófagos, apresenta apoio estatístico. Acredita-se que este resultado poderia ser o efeito do imunomodulador. Este fato pode ser visualizado nos controles que não reagiram como células estimuladas com o imunomodulador ($p < 0,01$) (IPR e ROS) (**Figuras 13A,B**). As atividades intracelulares dos macrófagos têm sido comprovadas em casos clínicos de pitiose inoculados com o imunomodulador (*in vivo*). Outros estudos revelaram que coelhos inoculados com os imunógenos de *P. insidiosum*, demonstraram um aumento intracelular das atividades de NTPDase, que hidrolisa nucleosídeos para formar AMPcíclico dentro da célula (Bach *et al.*, 2010; Bach *et al.*, 2013). Similarmente, a atividade da aminase ecto-adenosina (E-ADA) foi baixa na pitiose experimental em coelhos, mais a mesma aumentou após a imunoterapia com o imunomodulador (Bach *et al.*, 2013). Essas atividades enzimáticas intracelulares aumentam a capacidade fagocítica dos macrófagos.

Estudos realizados por Ferreira, *et al.*, 2013, indicam que ROS e IPR podem ser estimulados pelo uso de antifúngicos. Nossos resultados sugerem que mecanismos semelhantes aos reportados por Bach e colaboradores em coelhos (Bach *et al.*, 2010; Bach *et al.*, 2013) poderiam estar envolvidos na ativação de ROS e IPR pelos imunógenos de *P. insidiosum*. A **Figura 13A e 13B**, mostra o índice de proliferação intracelular e o aumento na produção de espécies de Reativas de Oxigênio (ROS) respectivamente. Quando a avaliação de espécie reativa de oxigênio - Peroxinitrito (PRN), o grupo macrófago combinado com o imunomodulador, este adicionado posteriormente à levedura (θ Cg+PYTd) demonstraram a produção de PRN com um forte apoio estatístico ($P < 0,005$).

Os grupos: a) somente com macrófago; b) macrófago com a levedura; c) sem o imunomodulador; d) macrófago com o imunomodulador adicionado previamente a levedura; e) macrófago com o imunomodulador adicionado ao mesmo tempo em que a levedura; f) macrófago com imunomodulador adicionado posteriormente a levedura, apresentaram um efeito mínimo na produção de PRN. Curiosamente, os macrófagos estimulados unicamente com o imunomodulador (θ PYT) mostraram a segunda melhor resposta, quando comparados com macrófagos estimulados com o imunomodulador adicionado posteriormente as leveduras (θ CgPYTd) ($p < 0,01$). Este resultado adicionado a estimulação da fagocitose, em conjunto com os resultados experimentais reportados em coelhos (Bach, *et al.*, 2010, Miller & Campbell, 1983; Santurio *et al.*, 2003) confirmam que o imunomodulador apresenta um impacto positivo na primeira linha de defesa do sistema imunológico. Este estudo está apoiado por resultados do uso deste imunomodulador em casos clínicos de cura quando inoculado em seres humanos e animais com pitiose (Thitithanyanont *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 2003; Mendoza, Mandy e Glass, 2003; Mendoza e Newton, 2005; Schmiedt *et al.*, 2012).

Depois de testar vias alternativas de inoculação do imunomodulador de *P. insidiosum* em camundongos, determinou-se que os melhores resultados de sobrevivência foram obtidos utilizando a via intraperitoneal (**Figura 14A**). Em

contraste, em casos clínicos, e, em modelo experimental de coelhos, a via subcutânea apresentou melhores resultados (Thitithanyanont *et al.*, 1998; Mendoza, Mandy e Glass, 2003; Mendoza e Newton, 2005; Bach *et al.*, 2010; Schmiedt *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013). É de importância mencionar que a sobrevivência dos camundongos previamente inoculados com *C. gattii* e depois inoculados IP com apenas o imunomodulador de *P. insidiosum*, nenhum camundongo neste grupo mostrou aumento na taxa de sobrevivência. No entanto, quando os camundongos previamente inoculados com *C. gattii* e depois tratados com uma combinação de anfotericina B e o imunomodulador, a taxa de sobrevivência neste grupo aumentou com resultados estatisticamente significativos ($p < 0.005$). É importante mencionar que a sobrevivência dos camundongos, independente da combinação proposta, deve ser analisada conjuntamente com os outros parâmetros desenvolvidos no presente trabalho.

Para acrescentar as metas propostas nesta pesquisa, investigou-se se além da anfotericina B, algum imidazólico possuía uma taxa de sobrevivência melhor. Sendo assim, o fluconazol foi também avaliado junto com a anfotericina B. Nos camundongos inoculados apenas com fluconazol ou com uma combinação deste antifúngico com o imunomodulador, os resultados demonstraram um suporte estatístico baixo com uma taxa de sobrevivência igual a $p < 0,05$. A taxa deste grupo apresenta baixo apoio estatístico quando comparados com o controle. A falta de estudos comparativos, que avaliem a ação de um imunomodulador com antifúngicos em um modelo animal, dificulta uma discussão mais profunda, mas ao mesmo tempo, ressalta o valor deste trabalho para estudos posteriores. Estes dados comparados com os dos camundongos inoculados com anfotericina B e o imunomodulador apresentam taxa de sobrevivência com baixo apoio estatístico, quando comparados com o grupo controle ($p < 0,01$) (**Figure 15 A e 16**). Estes resultados estão em concordância com os trabalhos de Santos *et al.* (2012), que utilizaram a anfotericina B e fluconazol em um modelo animal de Criptococose. Quando os camundongos foram inoculados apenas com o imunomodulador a taxa de sobrevivência não foi diferente da do grupo controle inoculado apenas com *C. gattii* (**Figure 16**). Estes resultados sugerem que, mesmo quando o

imunomodulador provou estimular fagocitose *in vitro* e *in vitro*, este efeito aparentemente não foi suficientemente forte para alcançar a diferença estatística no modelo murino de criptococose (Santos *et al.*, 2012). Até o presente momento é a primeira vez que imunógenos de *P. insidiosum* foram testados em um modelo animal com um patógeno diferente a *P. insidiosum*. Deste ponto de vista, nossos resultados são animadores.

Além da taxa de sobrevivência utilizando o imunomodulador e Anfotericina B, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) nos órgãos-alvo foram quantificados. Os dados do presente trabalho demonstraram que 15 dias após a infecção experimental com *C. gattii* (L27/01) o número de UFC em amostras broncoalveolares de animais não tratados, foi alta (Fig. 17A). Estes resultados são similares aos reportados para o modelo em camundongos de *C. gattii* (Santos *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014). Uma redução no número de UFC, foi notada nos grupos de camundongos inoculados com *C. gattii* e, em seguida, desafiados com o imunomodulador (G3 *C. gattii* + PYT) ($p < 0,05$) ou anfotericina B (G4 *C. gattii* + ANFB) ($p < 0,01$). Surpreendentemente, a combinação de ambos, anfotericina B e o imunomodulador (G5 *C. gattii* ANFB+PYT) demonstraram o menor conteúdo de UFC, um resultado que apresentou forte apoio estatístico ($p < 0,005$). Este estudo sugere que a diminuição no número de UFC no LBA dos camundongos inoculados com anfotericina B em associação com o imunomodulador, foi devido a um possível sinergismo positivo entre o antifúngico e os imunógenos de *P. insidiosum*. Esta observação é apoiada pelos estudos realizados por Santos *et al.* (2012).

Resultados contrastantes foram obtidos nas amostras do cérebro. A contagem de UFC no cérebro de camundongos, inoculados com *C. gattii* (G1 *C. gattii*), mostrou 10^{-1} UFC, enquanto que os camundongos inoculados com *C. gattii* e, em seguida tratados com o imunomodulador (G3 *C. gattii*+PYT), exibiram um inesperado aumento na quantidade de UFC ($\sim 10^4$ UFC). Estes dados também contrastam com os camundongos desafiados com *C. gattii* e inoculados com o imunomodulador e anfotericina B (G5 *C. gattii* + ANFB + PYT) ($\sim 10^{1,5}$ UFC).

Em ambos os casos o número de UFC foi menor do que aqueles obtidos no grupo inoculado apenas com o imunomodulador.

Na contagem de UFC presentes no cérebro, observou-se um resultado discrepante quanto ao grupo *C. gattii* posteriormente tratado com a anfotericina B. Este grupo não mostrou UFC no cultivo realizado. Curiosamente, este experimento foi acompanhado com cultivo negativo de todas as outras pesquisas realizadas no laboratório de micologia no mesmo período. Este fato poderia ser explicado, por uma falha na adição dos nutrientes utilizados para produção do meio de cultura. Esta afirmativa foi atribuída como verdadeira, pois após a regularização na produção do meio, voltou-se a observar contagem positiva para UFC. Optamos por não repetir o experimento, seguindo as normas éticas, apoiadas pela normatização na utilização de modelos animais experimentais regulamentados pelo CETEA.

No entanto, nos pulmões foi observada uma diminuição no número de UFC devido à ação sinérgica da combinação de anfotericina B com o imunomodulador (G5 *C. gattii*+ANFB+PYT) ($p < 0,005$) quando se compara com os grupos controle, *C. gattii* apenas, anfotericina B + *C. gattii* ($P < 0,01$) o imunomodulador + *C. gattii* ($P < 0,05$).

O estudo histopatológico em H&E mostrou grande quantidade de leveduras de *C. gattii* na região alveolar e brônquios. Entretanto, nos cortes histopatológicos do cérebro, as formas leveduriformes foram raramente observadas ou estavam ausentes. Estes dados contrastam com a quantidade de UFC encontradas no cultivo das amostras de cérebro deste estudo, e, em outros estudos utilizando o modelo animal de *C. gattii* (Santos *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014). Independente desta contradição, a constatação de que existe um possível sinergismo entre a anfotericina B e os imunógenos de *P. insidiosum* é por si mesmo, um resultado inesperado. Este resultado possivelmente é explicado pelo modelo escolhido neste estudo. É importante ressaltar que este modelo apresenta reação intrínseca de resposta Th1, que foi possivelmente exacerbada com a utilização do imunomodulador que, sabe-se, estimula uma

resposta Th1. Como a fonte de inoculação foi por via intratraqueal, a carga parasitária exibida no parênquima pulmonar, mais a resposta combinada Th1, favoreceu uma resposta aguda com produção linfocítica. Provavelmente este mecanismo de resposta Th1, dificultou a passagem hematoencefálica das células leveduriformes de CG para o SNC. Sendo assim, por limitações técnicas, a Histopatologia, que apresenta baixa sensibilidade, não mostrou células fúngicas, e/ou se visualizadas foram raras. A contagem de UFC no cérebro foi evidenciada, pois esta técnica apresenta uma maior sensibilidade. Wakeham (Wakeham, Wang e Xing, 2000) utilizaram camundongos BALB/C e C57BL/6 em um modelo de lepra pulmonar. Estes pesquisadores encontraram que os BALB/C inoculados com *M. Leprae* expressaram nos primeiros 14 dias IL 12, Interferon gama e TNF- α e a fagocitose, nestes camundongos, estava aumentada. Estas mesmas citocinas apresentaram-se baixas nos animais C57BL/6. Nos dias 27, 43 e 71 os mesmos animais apresentaram uma inversão na expressão destas citocinas. Isto demonstra que nos BALB/C estas citocinas estavam diminuídas enquanto que nos C57BL/6 elas estavam aumentadas. Os níveis de citocinas Th2 mantiveram-se diminuídas tanto em BALB/C quanto em C57BL/6. Estes pesquisadores concluíram que os níveis de citocinas não se mantem constantes durante o tempo do experimento. Estes estudos apresentam concordância com os nossos resultados, e, é bem conhecido que o modelo animal BALB/C e C57BL/6 apresentam uma Th2 e Th1 intrínseca, respectivamente. Outros estudos indicaram que a heterogenicidade genética nos modelos BALB/C e C57BL/6, poderiam induzir mudanças diferenciais em suas imunidades inatas e adaptativas dependendo do modelo patogênico utilizado (Watanabe *et al.*, 2004; Busch *et al.*, 2016). De acordo com (Wakeham, Wang e Xing, 2000), o número de bacilos vistos em coloração de álcool ácido resistência na amostra de pulmão e baço no dia 14, foram visualizados numerosos bacilos em BALB/C e poucos no C57BL/6. A leitura realizada no dia 43 demonstrou o contrário descrito anteriormente. Baseados nestes resultados e de outros estudos já citados, concluímos que, o uso destas linhagens, que, apresentam tendências intrínsecas estabelecidas, devem ser avaliados com muito critério. Os resultados podem ser influenciados por vários fatores: micro-organismo utilizado para desafiar os animais, tempo

da coleta de amostra do experimento, variabilidade genética do modelo animal, dentre outras (Watanabe *et al.*, 2004).

Estes resultados apoiam os dados obtidos nos experimentos de fagocitose e a expressão de ROS, IPR e PRN e também aqueles testados utilizando o modelo de *C. gatti* com diferentes antifúngicos (Santos *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014). Nesses experimentos, nota-se uma correlação entre a diminuição da proliferação das leveduras de *C. gattii* intracelular (IPR) e a produção de espécies reativas de oxigênio-Peroxinitrito (PRN). Observa-se um aumento na taxa de fagocitose, contrapondo a ação sinérgica da anfotericina B e do imunomodulador. Esses dados sugerem que o imunomodulador utilizado isoladamente, estimula uma reação Th1, entretanto sua combinação com anfotericina B poderia apresentar um efeito positivo no curso da infecção como foi encontrado por Wakeham *et al.*, (2000). Um efeito similar foi reportado utilizando apenas anfotericina B (Santos *et al.*, 2012).

A resposta inflamatória em camundongos controle inoculados apenas com *C. gatti* demonstrou células polimorfonucleares com predomínio de neutrófilos e poucas células mononucleares do tipo linfocítico. Entretanto, camundongos inoculados com *C. gattii* e depois inoculados com o imunomodulador apenas com o imunomodulador e anfotericina B, demonstraram um aumento no número de células mononucleares (linfócitos) (**Figura 20A, B**). Dados semelhantes têm sido reportados com o modelo murino de *C. gattii* (Santos *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2012). No presente estudo, foi observado um aumento evidente em células mononucleares em camundongos inoculados com o imunomodulador apenas ou em combinação com a anfotericina B (**Figura 21 e 22**). Em contraste, os controles não tratados com camundongos desafiados com *C. gattii* Cg (NT), ou camundongos inoculados com o imunomodulador (NI+PYT) demonstraram concentração relativamente baixa de células mononucleares. Os dados demonstraram que o imunomodulador exerce um efeito proliferativo em células de tipo mononuclear. Resultados análogos foram reportados por Wakeham *et al.*, (2000) utilizando um modelo C57BL/6 e BALB/c inoculado com *M. leprae*. Neste estudo, encontrou-se uma

reação linfocítica em C57BL/6, entretanto em BALB/C observou-se uma reação granulomatosa típica. Resultados com o uso de imunomodulador tem sido estabelecidos clinicamente e utilizados no modelo de coelho (Miller e Campbell, 1983; Mendoza, Mandy e Glass, 2003; Bach *et al.*, 2010). Por sua vez, esse resultado pode indicar que o imunomodulador possui ação imunogênica em camundongos utilizados nestes experimentos, porém sua ação não é suficientemente forte para controlar o *C. gattii* em modelo agudo C57BL/6. A ausência relativa de células inflamatórias nas preparações histológicas reforça estes dados.

A contagem de células mononucleares, a partir do lavado brocoalveolar, apresentou resultados satisfatórios, com aumento de contagem celular, no grupo CG posteriormente tratado com imunomodulador. Este resultado apoia a ideia de que o modelo de Th1 mais o imunomodulador poderia potencializar a reação Th1 do modelo C57BL/6. Contudo, a resposta Th1 não foi suficientemente mantida para eliminar o patógeno, porém foi suficiente para manter a linhagem celular linfocitária (Th1). Conforme os resultados apresentados utilizando *M. leprae* em camundongo C57BL/6, uma reação linfocítica foi também preservada (Th1) (Wakeham, Wang e Xing, 2000).

7 CONCLUSÃO

- ✓ O uso das proteínas imunorreguladoras obtidas de *Pythium insidiosum* mostrou discreta ação estimuladora da resposta Th1.
- ✓ Os ensaios realizados de fagocitose, proliferação intracelular e espécies reativas de oxigênio, demonstraram um interessante efeito do imunomodulador.
- ✓ O teste da toxicidade com o imunomodulador foi satisfatório, não apresentando qualquer efeito adverso significativo.
- ✓ A via de administração intraperitoneal foi a elegida e utilizada com sucesso no modelo murino C57BL/6.
- ✓ O modelo murino C57BL/6, apresentou ser um modelo satisfatório para a criptococose.
- ✓ Não foram observados resultados estatisticamente relevantes quanto ao tempo de sobrevivência dos camundongos, porém alguns animais mantiveram-se vivos por mais dias.
- ✓ A anfotericina demonstrou uma melhora na sua ação terapêutica com o uso das proteínas imunomoduladoras de PYT.
- ✓ A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e as análises anatomopatológicas apresentaram resultados satisfatórios mostrando diminuição da carga fúngica dos pulmões e lavado broncoalveolar. No cérebro, estes resultados, foram contrastantes.
- ✓ A contagem total e diferencial das células demonstrou um predomínio de polimorfonucleares.

8 PERSPECTIVAS

Até onde nós sabemos, não há relato na literatura da utilização da combinação de drogas antifúngicas e o imunomodulador de *P. insidiosum*. Esta sugestão investigatória teria o objetivo de avaliar esta aplicação, com o enfoque no possível efeito na taxa de sobrevivência utilizando um modelo animal, previamente inoculado com um patógeno (em nosso caso *C. gattii*). Os resultados deste trabalho poderiam servir como preâmbulo para testar novos modelos. De acordo com os resultados histopatológicos o modelo murino de *C. gattii* proposto, demonstrou uma evidente reação aguda e também que os camundongos não apresentaram uma Th1 clara. Baseados em nossos resultados, aventa-se a possibilidade de que um modelo murino utilizando um agente etiológico que estimule uma reação crônica típica de uma Th2, poderia ser ideal para testar imunomoduladores que revertem uma Th2 em uma Th1. Entretanto, os imunógenos de *P. insidiosum* estimularam fagocitose e aumentaram timidamente a sobrevivência do modelo murino de *C. gattii*. Estes achados sugerem que o imunomodulador de *P. insidiosum* poderia ter resultados melhores em um modelo murino que desenvolvesse uma reação crônica Th2 nos tecidos afetados. Nosso estudo abre várias janelas investigativas sobre a possível utilização de imunomoduladores no aumento da sobrevivência de animais e futuramente esta aplicabilidade em outros mamíferos e seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-85, Dec 2015. ISSN 1535-9786.

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 55-58, 5// 2015. ISSN 1087-1845. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184514001613>>.

ANGKASEKWINAI, P. et al. *Cryptococcus gattii* infection dampens Th1 and Th17 responses by attenuating dendritic cell function and pulmonary chemokine expression in the immunocompetent hosts. **Infect Immun**, v. 82, n. 9, p. 3880-90, Sep 2014. ISSN 0019-9567.

BACH, B. C. et al. E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. **Cell Biochem Funct**, v. 31, n. 6, p. 476-81, Aug 2013. ISSN 0263-6484.

_____. Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. **Biomed Pharmacother**, v. 64, n. 10, p. 718-22, Dec 2010. ISSN 0753-3322.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune response to fungal infections. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 125, n. 1-2, p. 47-70, Sep 15 2008. ISSN 0165-2427 (Print) 0165-2427.

BRITO-SANTOS, F. et al. Environmental Isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from Indoor Dust from Typical Wooden Houses in the Deep Amazonas of the Rio Negro Basin. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0115866, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115866>>.

BUSCH, R. A. et al. Innate Mucosal Immune System Response of BALB/c vs C57BL/6 Mice to Injury in the Setting of Enteral and Parenteral Feeding. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 40, n. 2, p. 256-63, Feb 2016. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071.

BUTTS, A. et al. A repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 2, p. 278-87, Feb 2013. ISSN 1535-9786.

BYRNES, E. J., 3RD et al. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infect**, v. 13, n. 11, p. 895-907, Oct 2011. ISSN 1286-4579.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 291-321, Table of Contents, Apr 2009. ISSN 0893-8512.

CASSONE, A. Fungal vaccines: real progress from real challenges. **Lancet Infect Dis**, v. 8, n. 2, p. 114-24, Feb 2008. ISSN 1473-3099 (Print) 1473-3099.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 11, p. 564-71, Nov 2011. ISSN 0966-842x.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 20, n. 3, p. 507-44, v-vi, Sep 2006. ISSN 0891-5520 (Print) 0891-5520.

CHEN, S. et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 499-508, Aug 2000. ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838.

CHEN, S. C. et al. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. **Clin Infect Dis**, v. 57, n. 4, p. 543-51, Aug 2013. ISSN 1058-4838.

CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 4, p. 980-1024, Oct 2014. ISSN 0893-8512.

CORREA MDO, P. et al. [Cryptococcosis in children in the State of Para, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, n. 5, p. 505-8, Sep-Oct 1999. ISSN 0037-8682 (Print) 0037-8682.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; MARR, K. A. *Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2009, p. 176532, 2009. ISSN 1687-708X (Print) 1687-708x.

DIXON, D. M. et al. Development of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 57-67, 1998. ISSN 1369-3786 (Print) 1369-3786.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3107-13, Jun 2012. ISSN 0066-4804.

ESPINEL-INGROFF, A.; KIDD, S. E. Current trends in the prevalence of *Cryptococcus gattii* in the United States and Canada. **Infect Drug Resist**, v. 8, p. 89-97, 2015. ISSN 1178-6973.

FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 50 Pt 3, p. 1351-71, May 2000. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026.

FERREIRA, G. F. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 8, p. 1801-11, Aug 2013. ISSN 0305-7453.

FINDLEY, K. et al. Discovery of a modified tetrapolar sexual cycle in *Cryptococcus amyloletus* and the evolution of MAT in the *Cryptococcus* species complex. **PLoS Genet**, v. 8, n. 2, p. e1002528, 2012. ISSN 1553-7390.

FONSECA, F. L. et al. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. **Infect Immun**, v. 78, n. 9, p. 3861-70, Sep 2010. ISSN 0019-9567.

FRANCO-PAREDES, C. et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **Lancet Infect Dis**, v. 15, n. 3, p. 348-55, Mar 2015. ISSN 1473-3099.

GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Vet Microbiol**, v. 146, n. 1-2, p. 1-16, Nov 20 2010. ISSN 0378-1135.

GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 76-86, May 2015. ISSN 1087-1845.

HADDAD, N. et al. Pulmonary cryptococcoma: a rare and challenging diagnosis in immunocompetent patients. **Autops Case Rep**, v. 5, n. 2, p. 35-40, Apr-Jun 2015. ISSN 2236-1960.

HAGEN, F. et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71148, 2013. ISSN 1932-6203.

_____. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16-48, 5// 2015. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184515000328> >.

HARDISON, S. E. et al. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. **J Immunol**, v. 189, n. 8, p. 4060-8, Oct 15 2012. ISSN 0022-1767.

HENSEL, P. et al. Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 223, n. 2, p. 215-8, 197, Jul 15 2003. ISSN 0003-1488 (Print) 0003-1488.

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, 12/15/ 2011. ISSN 0196-4399. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439911000523> >.

HUSTON, S. M. et al. *Cryptococcus gattii* is killed by dendritic cells, but evades adaptive immunity by failing to induce dendritic cell maturation. **J Immunol**, v. 191, n. 1, p. 249-61, Jul 1 2013. ISSN 0022-1767.

HUSTON, S. M.; MODY, C. H. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. **Clin Chest Med**, v. 30, n. 2, p. 253-64, vi, Jun 2009. ISSN 0272-5231.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. ISSN 1740-1526.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 7, p. a019760, Jul 2014.

LACATIVA, P. G. et al. [Pseudotumoral pulmonary cryptococcosis in association with Cushing's syndrome]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 48, n. 2, p. 318-23, Apr 2004. ISSN 0004-2730 (Print) 0004-2730.

LAZERA, M. S. et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **J Med Vet Mycol**, v. 34, n. 2, p. 127-31, Mar-Apr 1996. ISSN 0268-1218 (Print) 0268-1218.

LAZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, n. 6, p. 449-454, 1993/01/01 1993. ISSN 0268-1218. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02681219380000581>>.

LEITE, D. P., JR. et al. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **J Occup Med Toxicol**, v. 7, n. 1, p. 11, 2012. ISSN 1745-6673.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Front Microbiol**, v. 7, p. 105, 2016. ISSN 1664-302x.

LESTER, S. J. et al. Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. **Vet Clin Pathol**, v. 40, n. 1, p. 4-17, Mar 2011. ISSN 0275-6382.

LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proc Am Thorac Soc**, v. 7, n. 3, p. 186-96, May 2010. ISSN 1546-3222.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006. ISSN 0066-4227 (Print) 0066-4227.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol**, v. 67, p. 131-90, 2009. ISSN 0065-2164 (Print) 0065-2164.

MACDOUGALL, L. et al. Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 193-9, Feb 2011. ISSN 1080-6040.

MCCLELLAND, E. E. et al. The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63632, 2013. ISSN 1932-6203.

MCMULLAN, B. J.; SORRELL, T. C.; CHEN, S. C. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. **Future Microbiol**, v. 8, n. 12, p. 1613-31, Dec 2013. ISSN 1746-0913.

MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**, v. 21, n. 21-22, p. 2797-804, Jun 20 2003. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410x.

MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Med Mycol**, v. 43, n. 6, p. 477-86, Sep 2005. ISSN 1369-3786 (Print) 1369-3786.

MENDOZA, L. et al. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosi in horses. **Mycopathologia**, v. 119, n. 2, p. 89-95, Aug 1992. ISSN 0301-486X (Print) 0301-486x.

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. Immunological studies on equine phycomycosis. **Aust Vet J**, v. 58, n. 6, p. 227-31, Jun 1982. ISSN 0005-0423 (Print) 0005-0423.

_____. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**, v. 21, n. 4, p. 331-41, Dec 1983. ISSN 0036-2174 (Print) 0036-2174.

_____. The comparative pathology of equine cutaneous phycomycosis. **Vet Pathol**, v. 21, n. 3, p. 325-32, May 1984. ISSN 0300-9858 (Print) 0300-9858.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-48, Oct 1995. ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512.

MORTENSON, J. A. et al. Detection of *Cryptococcus gattii* in selected urban parks of the Willamette Valley, Oregon. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 351-5, Apr 2013. ISSN 0301-486x.

NASCIMENTO, E. et al. Refractory and/or Relapsing Cryptococcosis Associated with Acquired Immune Deficiency Syndrome: Clinical Features, Genotype, and Virulence Factors of *Cryptococcus* spp. Isolates. **Am J Trop Med Hyg**, Feb 29 2016. ISSN 0002-9637.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599-609, 11// 2012. ISSN 0738-081X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X12000351>>. Acesso em: 2012/12//.

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

_____. *Cryptococcus gattii* Virulence Composite Candidate Genes Revealed by Microarray Analysis of High and Less Virulent Vancouver Island Outbreak Strains. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16076, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016076>>.

PANACKAL, A. A. et al. Paradoxical Immune Responses in Non-HIV Cryptococcal Meningitis. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 5, p. e1004884, May 2015. ISSN 1553-7366.

PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 124, p. 61-79, 2013. ISSN 0065-7778 (Print) 0065-7778.

PEREIRA, D. I. et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3-4, p. 309-15, Oct 2013. ISSN 0301-486x.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 16, n. 4, p. 837-74, v-vi, Dec 2002. ISSN 0891-5520 (Print) 0891-5520.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 1 2010. ISSN 1058-4838.

PRATES, R. A. et al. Effect of Virulence Factors on the Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2013. ISSN 19326203. Disponível em: <[http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=85383600\(=p t-br&site=ehost-live&authtype=ip,cookie,uid](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=85383600(=p t-br&site=ehost-live&authtype=ip,cookie,uid)>.

RAVIKUMAR, S.; WIN, M. S.; CHAI, L. Y. Optimizing Outcomes in Immunocompromised Hosts: Understanding the Role of Immunotherapy in Invasive Fungal Diseases. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1322, 2015. ISSN 1664-302x.

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes Infect**, v. 1, n. 4, p. 293-301, Apr 1999. ISSN 1286-4579 (Print) 1286-4579.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 275-288, 04/print 2011. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri2939> >.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 1297-313, Nov 2012. ISSN 1746-0913.

SANTOS, C. E. et al. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 8, p. 1397-9, Aug 2011. ISSN 1556-679x.

SANTOS, J. R. et al. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 5, p. 2553-8, May 2012. ISSN 0066-4804.

_____. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112669, 2014. ISSN 1932-6203.

SANTURIO, J. M. et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosa developed and evaluated. **Vaccine**, v. 21, n. 2, p. 2535-2540, 2003.

SCHMIEDT, C. W. et al. Treatment of intestinal pythiosis in a dog with a combination of marginal excision, chemotherapy, and immunotherapy. **J Am Vet Med Assoc**, v. 241, n. 3, p. 358-63, Aug 1 2012. ISSN 0003-1488.

SCRIVEN, J. E. et al. A Glucuronoxylomannan-Associated Immune Signature, Characterized by Monocyte Deactivation and an Increased Interleukin 10 Level, Is a Predictor of Death in Cryptococcal Meningitis. **Journal of Infectious Diseases**, 2016. Disponível em: < <http://jid.oxfordjournals.org/content/early/2016/02/15/infdis.jiw007.abstract> >.

SEVERO, C. B. et al. Cryptococcosis in children. **Paediatr Respir Rev**, v. 10, n. 4, p. 166-71, Dec 2009. ISSN 1526-0542.

SEVERO, L. C.; DE MATTOS OLIVEIRA, F.; LONDERO, A. T. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. **Rev Iberoam Micol**, v. 16, n. 3, p. 152-4, Sep 1999. ISSN 1130-1406 (Print) 1130-1406.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 2, p. 213-67, Jun 2011. ISSN 1092-2172.

SIDDIQUI, A. A. et al. IFN-gamma at the site of infection determines rate of clearance of infection in cryptococcal meningitis. **J Immunol**, v. 174, n. 3, p. 1746-50, Feb 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

SILVA, D. C. et al. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 72, n. 4, p. 332-9, Apr 2012. ISSN 0732-8893.

SPRINGER, D. J. et al. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 8, p. e1004285, Aug 2014. ISSN 1553-7366.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, Feb 2014. ISSN 0749-503x.

TENOR, J. L. et al. Live Imaging of Host-Parasite Interactions in a Zebrafish Infection Model Reveals Cryptococcal Determinants of Virulence and Central Nervous System Invasion. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e01425-15, 2015.

THITITHANYANONT, A. et al. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. **Clin Infect Dis**, v. 27, n. 6, p. 1394-400, Dec 1998. ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838.

THOMPSON, G. R., 3RD et al. A murine model of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 6, p. 1432-8, Jun 2012. ISSN 0305-7453.

THOMPSON III, G. R.; CADENA, J.; PATTERSON, T. F. Overview of Antifungal Agents. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 2, p. 203-215, 6// 2009. ISSN 0272-5231. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272523109000148> >.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Paracoccidioidomycosis vaccine. **Hum Vaccin Immunother**, v. 8, n. 10, p. 1450-3, Oct 2012. ISSN 2164-5515.

TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455-62, Aug 2008. ISSN 0074-0276.

TUBO, N. J.; JENKINS, M. K. CD4+ T Cells: guardians of the phagosome. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 2, p. 200-13, Apr 2014. ISSN 0893-8512.

URAI, M. et al. Evasion of Innate Immune Responses by the Highly Virulent *Cryptococcus gattii* by Altering Capsule Glucuronoxylomannan Structure. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 5, p. 101, 2015. ISSN 2235-2988.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 6, p. 835-46, Jun 2010. ISSN 1535-9786.

WAKEHAM, J.; WANG, J.; XING, Z. Genetically determined disparate innate and adaptive cell-mediated immune responses to pulmonary Mycobacterium bovis BCG infection in C57BL/6 and BALB/c mice. **Infect Immun**, v. 68, n. 12, p. 6946-53, Dec 2000. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

WANACHIWANAWIN, W. et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**, v. 22, n. 27-28, p. 3613-21, Sep 9 2004. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410x.

WANG, J. L. et al. Changes of Th1/Th2 cytokines in immunocompetent patients with pulmonary cryptococcosis. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 4, p. 5733-42, 2013. ISSN 1676-5680.

WATANABE, H. et al. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. **Shock**, v. 22, n. 5, p. 460-6, Nov 2004. ISSN 1073-2322 (Print) 1073-2322.

YANG, C. J. et al. Clinical and radiographic presentations of pulmonary cryptococcosis in immunocompetent patients. **Scand J Infect Dis**, v. 38, n. 9, p. 788-93, 2006. ISSN 0036-5548 (Print) 0036-5548.

YANG, M. L. et al. Fluconazole Susceptibility in *Cryptococcus gattii* is dependent on the ATP binding cassette (ABC) Transporter PDR11. **Antimicrob Agents Chemother**, Dec 7 2015. ISSN 0066-4804.

ZANETTE, R. A. et al. Complex interaction of deferasirox and *Pythium insidiosum*: iron-dependent attenuation of growth in vitro and immunotherapy-like enhancement of immune responses in vivo. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0118932, 2015. ISSN 1932-6203.

ZHAI, B.; LIN, X. Recent progress on antifungal drug development. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, n. 8, p. 1255-62, Aug 2011. ISSN 1389-2010.

ZHU, X. et al. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5589-96, Sep 2001. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.