



UNIVERSIDADE PAULISTA

Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental

**IMPACTO DA CRIPTOCOCOSE NA EXPRESSÃO DOS GENES
DA VIA DE SÍNTESE DA TETRAIDROBIOPTERINA NOS
TECIDOS PULMONAR E ENCEFÁLICO**

Alex de Camargo Coque

Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva

SÃO PAULO

2024

ALEX DE CAMARGO COQUE

**IMPACTO DA CRIPTOCOCOSE NA EXPRESSÃO DOS GENES DA VIA DE SÍNTESE
DA TETRAIDROBIOPTERINA NOS TECIDOS PULMONAR E ENCEFÁLICO**

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de doutor em Patologia Ambiental e Experimental apresentado à Universidade Paulista – UNIP.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva

**SÃO PAULO
2024**

Coque, Alex de Camargo.

Impacto da criptococose na expressão dos genes da via de síntese da tetraidrobiopterina nos tecidos pulmonar e encefálico / Alex de Camargo Coque. - 2024.

70 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2024.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva.

1. *C. neoformans*. 2. *C. gattii*. 3. Briptococose. 4. BH4. I. Silva, Rodrigo Augusto Foganholi da (orientador). II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

ALEX DE CAMARGO COQUE

**IMPACTO DA CRIPTOCOCOSE NA EXPRESSÃO DOS GENES DA VIA DE SÍNTESE
DA TETRAIDROBIOPTERINA NOS TECIDOS PULMONAR E ENCEFÁLICO**

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de doutor em Patologia Ambiental e Experimental apresentado à Universidade Paulista – UNIP.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/__/_____
Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva
Universidade Paulista – UNIP

_____/__/_____
Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Universidade Paulista – UNIP

_____/__/_____
Profa. Dra. Juliete Diniz
IAMSPE - UNIFESP

_____/__/_____
Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

_____/__/_____
Prof. Dr. Célio Junior da Costa Fernandes
Universidade Estadual São Paulo - UNESP

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, meu mais profundo agradecimento. A minha mãe, Ana Rosa, pelo amor incondicional e apoio. Agradeço imensamente ao meu orientador, Rodrigo, por sua orientação incansável, pela oportunidade e por todos seus ensinamentos. Sua dedicação, paciência e sabedoria foram fundamentais para a realização deste trabalho, e sou eternamente grato por todo o apoio e incentivo que recebi ao longo dessa longa jornada. Agradeço ao meu grande amigo Dr. Rogério Aires que me deu forças na reta final deste trabalho. Agradeço à minha coorientadora, Dra. Martha Bernardi, por toda experiência e paciência, foram cruciais para a realização deste trabalho. Agradeço a todos os funcionários, colegas e alunos de iniciação científica do Centro de Pesquisa – UNIP, que dividiram comigo não apenas o espaço de trabalho, mas também as incertezas e conquistas. A convivência diária com todos vocês foram enriquecedoras. Juntos, aprendemos a importância do trabalho em equipe e do respeito às diversas opiniões.

Agradeço aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado durante todo este percurso, me ouvindo nos melhores e piores momentos. Agradeço por todas as palavras de incentivo.

Agradeço a minha namorada Ariane de Jesus Lopes de Abreu por todo o apoio e paciência e por estar sempre ao meu lado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a UNIP, que possibilitaram a realização desta pesquisa.

A todos, meu mais sincero e profundo agradecimento. Este trabalho é resultado de muitas mãos, e sem cada um de vocês, ele não teria sido possível.

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica oportunista causada pelas espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, com elevada mortalidade em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. Apesar de importantes avanços terem sido alcançados sobre sua fisiopatologia, ainda pouco sabemos a respeito dos mecanismos moleculares que envolvem o metabolismo da BH4 durante a evolução da criptococose. Utilizando um modelo de criptococose induzida em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos ou não pela infecção nasofaríngea das cepas pela *C. neoformans* e *C. gattii*, a caracterização da evolução clínica da criptococose foi avaliada por testes comportamentais, histopatológicos e microbiológicos. Assim como a qPCR para determinação da expressão dos genes do metabolismo da BH4 nos tecidos pulmonar e encefálico. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a infecção pelos microrganismos promoveu comprometimento do peso corporal, o comportamento tipo doentio, acompanhado de gliose de forma tempo dependente. Em relação a expressão gênica, foi possível observar que a infecção modulou de forma distinta a expressão dos genes nos tecidos pulmonar e encefálico sem interferência do estado imunológico, sendo tecido pulmonar o tecido mais sensível ao tempo de infecção. Assim, nossos mostram que a evolução da criptococose está diretamente relacionado ao comportamento doentio e gliose, além de modular genes-chave da via de síntese da BH4 de forma distinta entre os tecidos pulmonar e encefálico, sendo o tecido pulmonar o mais impactado.

Palavras-Chave: *C. neoformans*, *C. gattii*, criptococose, BH4.

ABSTRACT

Cryptococcosis is an opportunistic fungal infection caused by the species *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, with high mortality in immunocompromised and immunocompetent patients. Although important advances have been made regarding its pathophysiology, little is known about the molecular mechanisms involving BH4 metabolism during the progression of cryptococcosis. Using a model of cryptococcosis induced in C57BL/6 mice immunosuppressed or not by nasopharyngeal infection of the strains by *C. neoformans* and *C. gattii*, the characterization of the clinical progression of cryptococcosis was evaluated by behavioral, histopathological and microbiological tests, as well as qPCR to determine the expression of BH4 metabolism genes in lung and brain tissues. The results obtained in this study revealed that infection by microorganisms promoted impairment of body weight, sickly-like behavior, accompanied by gliosis in a time-dependent manner. Regarding gene expression, it was possible to observe that the infection modulated gene expression in lung and brain tissues differently without interference from the immune status, with lung tissue being the most sensitive tissue to the time of infection. Thus, our results show that the evolution of cryptococcosis is directly related to disease behavior and gliosis, in addition to modulating key genes of the BH4 synthesis pathway differently between lung and brain tissues, with lung tissue being the most impacted.

Keywords: *C. neoformans*, *C. gattii*, cryptococcosis, BH4.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vias de síntese da tetrahidrobiopterina (BH4).	18
Figura 2. Caracterização da evolução da Criptococose no ganho de peso corporal.	31
Figura 3. Avaliação da presença do microrganismo em homogenato dos diferentes órgãos nos períodos experimentais DPI 7 e DPI 14.	33
Figura 4. Efeito da infecção intranasal das cepas criptocócicas no comportamento psicomotor.	35
Figura 5. Efeito da infecção intranasal das cepas criptocócicas no esforço e tônus muscular e do Sistema Nervoso Autônomo (SNA).	36
Figura 6. Efeito da infecção intranasal das cepas criptocócicas no Estado Neuropsiquiátrico.	37
Figura 7. Efeito da infecção intranasal das cepas criptocócicas na Função Sensorial.	38
Figura 8. Análise histológica do tecido pulmonar dos camundongos infectados pela cepa <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>.	39
Figura 9. Análise histológica do tecido encefálico dos camundongos infectados pela cepa <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>.	40
Figura 10. Efeito da criptococose na atividade locomotora.	41
Figura 11. Efeito da criptococose no comportamento tipo doentio.	42
Figura 12. Efeito da criptococose no desenvolvimento dos animais infectados pela cepa <i>C. neoformans</i> no DPI 21.	43

Figura 13. Efeito da criptococose na atividade locomotora dos animais infectados pela cepa <i>C. neoformans</i> no DPI21.	44
Figura 14. Efeito da criptococose no comportamento tipo doentio dos animais infectados pela cepa <i>C. neoformans</i> no DPI21.	45
Figura 15. Dosagem das citocinas inflamatórias no soro dos camundongos infectados com <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> no DPI 7.	46
Figura 16. Dosagem das citocinas inflamatórias no soro dos camundongos infectados com <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> no DPI 14.	47
Figura 17. Dosagem das citocinas inflamatórias no soro dos camundongos infectados com a cepa <i>C. neoformans</i> no DPI 21.	48
Figura 18. Análise imunohistoquímica do tecido encefálico para determinação da ativação glial em camundongos infectados pela cepa <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>. 49	
Figura 19. Efeito da infecção criptocócica no controle transcricional do gene <i>Ifng</i> nos tecidos pulmonar e encefálico.	50
Figura 20. Padrão transcricional absoluto dos membros da via e síntese de BH4 nos tecidos pulmonar e encefálico.	51
Figura 21. Comparação entre os valores de expressão absoluta dos membros da via de síntese de BH4.	52
Figura 22. Efeito da infecção criptocócica no controle transcricional dos componentes da via de síntese da BH4 no tecido pulmonar no período experimental DPI 7.	53
Figura 23. Efeito da infecção criptocócica no controle transcricional dos componentes da via de síntese da BH4 no tecido encefálico no período experimental DPI 7.	54

Figura 24. Efeito da infecção criptocócica no controle transcricional dos componentes da via de síntese da BH4 no tecido pulmonar no período experimental DPI 14. 55

Figura 25. Efeito da infecção criptocócica no controle transcricional dos componentes da via de síntese da BH4 no tecido encefálico no período experimental DPI 14. 56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Criptococose	14
1.2. Metabolismo da BH4 e infecção fúngica.....	16
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Animais.....	23
4.2. Delineamento experimental e cálculo do n amostral	23
4.2.1. Modelo <i>in vivo</i>	23
4.3. Cultura microbiológica	24
4.4. Protocolo de imunossupressão com ciclofosfamida (Cy).....	24
4.5. Inoculação nasofaríngea.....	24
4.6. Parâmetros comportamentais	24
4.6.1. Protocolo SHIRPA	24
4.6.2. Campo aberto	25
4.6.3. Suspensão pela cauda.....	26
4.7. Necropsia, coleta de amostras e método de descarte	26
4.8. Parâmetros histopatológicos.....	27
4.8.1. Hematoxilina-eosina (H-E)	27
4.9. Parâmetros microbiológicos	28
4.9.1. Isolamento e identificação clássica	28
4.10. Parâmetros Moleculares	28
4.10. 1. Extração de Ácido Ribonucléico (RNA).....	28
4.10. 2. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	28
4.10. 3. Análise da expressão gênica por qPCR.....	29
4.11. Análise estatística	30
5. RESULTADOS	31

5.1. Caracterização da evolução da infecção intra-nasal de cepas criptocócicas pelo monitoramento do ganho de peso corporal e disseminação sistêmica	31
5.2. Caracterização das alterações comportamentais promovidas pela infecção criptocócica	34
5.3. Avaliação histológica do tecido pulmonar e encefálico	38
5.4. Avaliação do impacto da criptococose na atividade locomotora e no comportamento tipo doentio.....	40
5.4. Caracterização da concentração circulante de citocinas inflamatórias durante a evolução da criptococose.....	45
5.5. Impacto da criptococose no controle transcricional dos componentes da via de síntese da tetrahydrobiopterina (BH4).....	49
6. DISCUSSÃO	57
7. CONSTATAÇÕES	63
8. CONCLUSÃO.....	64
9. REFERÊNCIAS	65
ANEXO.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Criptococose

A infecção criptocócica (criptococose) tornou-se um importante problema em todo o mundo, especialmente entre pacientes imunocomprometidos. Com distribuição e impacto mundial que devido a epidemia da aids na década de 1980 ganhou importante destaque por ser uma doença oportunista com considerável impacto nas taxas de morbidade e mortalidade (Perfect et al., 2010). Esta infecção é causada por fungos do gênero *Cryptococcus spp.*, os quais são leveduras encapsuladas, saprófitas, normalmente associada a fezes de pombos e outras aves contaminadas (Kobayashi et al., 2005).

Apresentam maior prevalência em regiões de clima tropical e subtropical, fato este que pode ter relação com as faixas de temperatura ideal para seu desenvolvimento e manutenção de sua forma capsulada que se estabelecem no meio ambiente. Esta forma capsulada apresenta um diâmetro consideravelmente pequeno, por volta de 1 μm , o que favorece a penetração nos alvéolos pulmonares (May et al., 2016).

A infecção pode apresentar duas formas, cutânea e sistêmica. A forma cutânea é observada em aproximadamente 10% a 15% dos casos. Na maioria das vezes, a forma cutânea precede a doença sistêmica, sendo caracterizada por manifestações de lesões acneiformes, *rash* cutâneo, ulcerações ou massas subcutâneas que simulam tumores. Na forma sistêmica, o aparecimento de um quadro de meningite subaguda ou crônica é frequente observada. Caracterizada por febre, fraqueza, dor no peito, rigidez de nuca, dor de cabeça, náusea e vômito, sudorese noturna, confusão mental e alterações de visão. Pode ocorrer o comprometimento ocular, pulmonar, ósseo e, às vezes, da próstata (Zavala and Baddley, 2020) (Brasil and Saúde, 2010).

Dentre os diferentes membros do gênero, o *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* se destacam por apresentar como faixa térmica ideal de desenvolvimento entre 36°C à 38°C, sendo os únicos com capacidade patogênica à seres humanos (Althertum, 2015). Em relação a infecção em humanos, a carga global da meningite criptocócica é de quase um quarto de milhão de casos e 181.000 mortes anualmente, com taxas de mortalidade de 100% se as infecções não forem tratadas. Está infecção foi caracterizada como a principal causa de meningite oportunista relacionada aos pacientes portadores de HIV ou imunocompetentes (Carrijo et al., 2021).

Durante décadas, os agentes da criptococose foram agrupados em duas variedades que incluíam cinco sorotipos: *C. neoformans* var. *neoformans* para os sorotipos A, D e AD (agora conhecido por ser um híbrido entre as cepas A e D), e *C. neoformans* var. *gattii* para os sorotipos B e C (Kwon-Chung et al., 2014). A descoberta de dois teleomorfos distintos das duas espécies foi o primeiro passo para definir o que hoje é reconhecido como duas espécies distintas, *C. neoformans* e *C. gattii*. Embora os nomes de teleomorfos tenham sido usados para denotar que ambas as espécies patogênicas de *Cryptococcus* pertencem em a um gênero dentro de Basidiomycota, seu uso foi abandonado a partir de 2013 e hoje apenas *Cryptococcus* é usado de acordo com a nova regra de nomenclatura fúngica (Hawksworth et al., 2011).

Na maioria dos casos, a infecção criptocócica em humanos ocorre pela inalação do organismo, seja na forma de levedura ou talvez como basidiósporos, de uma fonte ambiental, tendo como primeiro alvo de infecção os pulmões e vias aéreas (Levitz, 1991) (Chen, Meyer and Sorrell, 2014). A infecção cutânea pode ocorrer em 10 a 15% dos pacientes podendo ser classificada como criptococose cutânea localizada ou como manifestações cutâneas de criptococose disseminada (Noguchi et al., 2019). A infecção cutânea primária é rara e apresenta manifestações inicialmente restritas à pele, apresentando-se como lesões confinadas a partes isoladas da pele, que não são disseminadas sistemicamente nem associadas à fungemia ou antigenemia criptocócica (Silva Souza et al., 2021).

Por outro lado, a infecção cutânea disseminada ocorre principalmente em pacientes imunossuprimidos onde as leveduras se reativam e podem proliferar no local da infecção inicial e se disseminar para outras partes do corpo dentro de fagócitos ou como células de levedura (Santangelo et al., 2004) (Yang et al., 2016). Em estágios avançados da infecção ainda pode ocorrer o tropismo para o Sistema Nervoso Central (SNC), ocasionando a meningite criptocócica e pode causar a forma neurológica avançada, denominada como Neurocriptococose. A causa para este tropismo ainda permanece desconhecida, porém existem possíveis explicações para este fenômeno, como por exemplo: 1) a presença de substratos que favoreçam o crescimento do fungo; 2) o fornecimento de um refúgio para o fungo conseguir evadir da resposta imune do hospedeiro e 3) a presença de receptores específicos que atraiam mais fortemente o fungo, quando comparado com outros órgãos (Lin and Heitman, 2006).

Outro fator desconhecido até o momento é sobre o mecanismo utilizado pelo fungo para penetrar a Barreira Hematoencefálica (BHE). Neste sentido, existem três possíveis mecanismos

propostos que são mais discutidos na literatura. Primeiro, as células de *Cryptococcus* poderiam forçar seu caminho entre as junções apertadas de células endoteliais em um processo conhecido como parasitose, usando proteases como a metaloprotease secretada (Mpr1) para promover migração endotelial (Vu *et al.*, 2014). Ainda, estudos usando técnicas de imagem demonstraram que os *Cryptococcus* podem atravessar a barreira hematoencefálica induzindo um evento embólico na microvasculatura que reveste o cérebro. Neste caso a migração criptocócica para o tecido cerebral é um processo ativo que depende da secreção da enzima urease pelo criptocócico (Shi *et al.*, 2010). Por fim, é postulado que o *Cryptococcus* possa utilizar o fagócito como um meio de transporte ou proteção durante a infecção (Kechichian, Shea and Del Poeta, 2007). Essa hipótese é sustentada pela evidência de que a remoção de macrófagos alveolares em camundongos diminuindo de forma significativa a disseminação criptocócica para o SNC (Kechichian, Shea and Del Poeta, 2007).

Nos casos de disseminação para o SNC, o início dos sintomas pode ser insidioso. Dores de cabeça, febre ou alterações do estado mental devem justificar testes diagnósticos. O impacto da meningite criptocócica (MC) não se contém apenas à taxa de infecção, mas principalmente a taxa de mortalidade apresentada por estes pacientes infectados. É a causa mais comum de meningite fúngica e a causa mais comum de criptococose extrapulmonar em todo o mundo (Fisher *et al.*, 2021). Em um contexto global, inclusive no Brasil, sua incidência é subnotificada uma vez que sua notificação não é obrigatória pelos sistemas de vigilância epidemiológica. Seu diagnóstico é presuntivo, pois a apresentação dos sintomas é muitas vezes indistinguível de outras doenças do SNC. Sua avaliação diagnóstica inclui história e exame físico focados, com atenção especial achados neurológicos sutis e evidência de quaisquer coinfeções com organismos oportunistas (Abassi, Boulware and Rhein, 2015). Embora o exame físico possa levantar a suspeita de meningite, testes adicionais como análises de soro devem ser feitos para correta avaliação de pacientes com suspeita. A punção lombar com análise de fluido espinal cerebral (CSF) pela coloração com nanquim e cultura de fungos é recomendada para pacientes com criptococose suspeita ou comprovada (Skipper, Abassi and Boulware, 2019).

1.2. Metabolismo da BH4 e infecção fúngica

A BH4 é um cofator enzimático obrigatório para a atividade enzimática da fenilalanina hidroxilase (PAH), tirosina hidroxilase (TH) e triptofano hidroxilase (TPH) e para a atividade da monooxigenase de éter-glicerol (AGMO) (Blau, Schoedon and Curtius, 1989) (Kaufman, 1963). Além disso, também é necessário na síntese de óxido nítrico (NO) atuando como cofator obrigatório de todas as isoformas da NOS (endotelial, neuronal e induzível) (Mayer et al., 1990, Werner et al., 1998), molécula envolvida em inúmeros processos fisiológicos além de atuar como um mensageiro retrógrado no SNC (Tayeh e Marletta, 1989; Schuman e Madison, 1991; Zhuo et al., 1994; Arancio et al., 1996; Son et al., 1996; Kleppisch et al., 1999).

Os níveis intracelulares de BH4 são regulados por três vias principais de síntese: *de novo*, de reciclagem e de salvação (**Figura 1**). Na via *de novo*, a enzima GTP Ciclohidrolase I (GTPCH) converte a guanosina trifosfato (GTP) em 7,8-dihidroneopterina trifosfato, constituindo a etapa limitante para a velocidade da síntese de BH4. Em seguida, a enzima 6-piruvoil-tetraidropterina sintase (PTPS) converte o 7,8-dihidroneopterina trifosfato em 6-piruvoil-tetraidropterina, produzindo neopterina como um subproduto, um biomarcador da ativação imunológica frequentemente utilizado para monitorar doenças relacionadas ao sistema imunológico (FUCHS et al., 1988). Seguidamente, a sepiapterina redutase (SPR) reduz o 6-piruvoil-tetraidropterina em BH4.

A via de reciclagem converte a dihidrobiopterina (BH2) em BH4 por meio da ação das enzimas dihidropteridina redutase (DHPR) e pterina carbinolamina desidratase (PCD). Esta via é crucial para recuperar e reutilizar BH4 que foi previamente oxidada, garantindo que o organismo mantenha concentrações adequadas deste cofator evitando a necessidade de utilizar novas moléculas de GTP (Thöny, Auerbach e Blau, 2000). Na via de reciclagem, a qual acontece principalmente no fígado, devido à grande demanda de BH4 para a atividade da enzima fenilalanina hidroxilase, a 4 α -hidroxi-tetrahidrobiopterina que é formada durante a oxidação do BH4 pela hidroxilação enzimática dos aminoácidos aromáticos, pode ser regenerada ao BH4 pela ação de duas enzimas adicionais: pterina-4 α -carbinolamina desidratase (PCD) e diidropterina redutase (DHPR) (Thony et al., 2000).

Por fim na via de salvação da BH4, que consiste na reconversão da pterina parcialmente oxidada de volta em BH4, um processo mediado pela enzima diidrofolato redutase (DHFR) (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011), onde o intermediário 1'-oxo-2'-hidroxipropil-tetraidropterina é convertido a 6-lactoil-7,8-diidropterina (sepiapterina) através de uma reação não

enzimática (Milstien e Kaufman, 1983). A síntese de BH4 através da via de salvação suporta duas possíveis rotas, uma vez que as enzimas SR e CR podem reduzir sepiapterina para gerar 7,8-diidrobiopterina (BH2), que é subsequentemente reduzida ao BH4 por DHFR (Milstien e Kaufman, 1983). Durante estados inflamatórios, a biossíntese da BH4 é regulada positivamente por meio de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (IFN- γ), IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e também certos estímulos imunológicos que regulam transcricionalmente a enzima GTPCH na via *de novo*, que pode aumentar em até 100 vezes (Thöny, Auerbach e Blau, 2000).

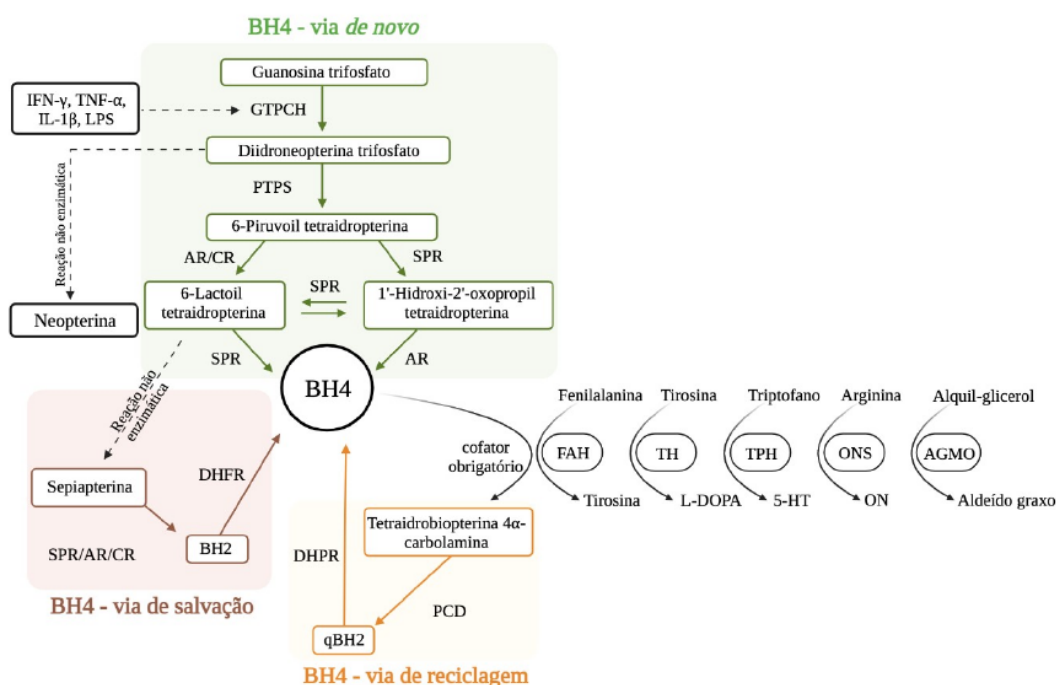


Figura 1. Vias de síntese da tetrahidrobiopterina (BH4). GTP, guanosina trifosfato; GTPCH, GTP ciclodrolase; PTPS, 6-piruvil tetraidropterina sintase; SR, sepiapterina redutase; DHFR, diidrofolato redutase; PCD, pterina-4 α -carbinolamina desidratase; DHPR, diidropterina redutase; Tyr, tirosina; Trp, triptofano; Phe, fenilalanina. Adaptado de Wang et al. (2020).

Os estudos que correlacionam as infecções fúngicas com o metabolismo da BH4 são limitados, especialmente estudos relacionados a infecção pelos fungos do gênero *Cryptococcus spp.* Em estudo publicado por Jarvis e colaboradores em 2014, os autores relataram apenas que o foi observado aumento dos níveis dos marcadores de ativação de macrófagos, sCD14 e neopterina, um intermediário da via de metabolismo da BH4, em macrófagos ativados tanto pelo IFN- γ como

pela infecção por *Cryptococcus* (Jarvis et al., 2014). Dados da literatura utilizando modelos *in vivo* sugerem que o IFN- γ possa proteger contra a infecção por *Cryptococcus* potencializando a depuração do microrganismo dos pulmões e impedindo sua disseminação para o SNC (Kawakami et al., 1996) (Zhou et al., 2007). Embora o papel crucial da imunidade inata contra infecção fúngica pulmonar na interação patógeno-hospedeiro foram bem descritas, as funções de imunidade adaptativa com respostas de células T representativas se mostram igualmente importantes para a defesa do organismo, sendo a resposta imune mediada por IFN- γ necessária para a depuração do microrganismo, especialmente no tecido pulmonar (Li, Lu and Meng, 2019).

Evidências crescentes indicam que a ativação de macrófagos e produção de Óxido Nítrico (NO) induzida por IFN- γ dependente de células T desempenha um papel importante nas defesas do hospedeiro contra muitos microrganismos (Li, Lu and Meng, 2019) (Lovchik, Lyons and Lipscomb, 1995) (Bhatt et al., 2021). No sentido oposto, Reardon et al. em 1996, relatou que o IFN- γ reduz a capacidade dos macrófagos alveolares humanos de inibir o crescimento de *C. neoformans in vitro* (Reardon et al., 1996). Ainda, foi demonstrado que a pré-ativação de macrófagos murinos por IFN- γ aumentou a taxa fagocitária apenas de *C. neoformans*, mas não promoveu fagocitose de *C. gattii* (Ikeda-Dantsuji et al., 2015). Diante destas informações e considerando a influência que fatores ambientais e condições sistêmicas geradas por inflamações ou infecções podem modular epigeneticamente a transcrição de genes, em especial, genes relacionados a codificação do IFN- γ , podendo ainda afetar a via de síntese do BH4 (Ghisoni et al., 2015).

A homeostase da BH4 tem um papel fundamental na modulação do NO, que é crucial para a defesa imunológica e a regulação da inflamação nos tecidos pulmonar e encefálico. Em níveis adequados, o NO auxilia na eliminação do *Cryptococcus*, colaborando no controle da infecção. No entanto, a produção excessiva de NO, provocada pelo aumento descontrolado de BH4, pode desregular o processo inflamatório, levando a danos significativos nos tecidos, como demonstrado em modelos de lesão pulmonar inflamatória (Feng Y. et al., 2024). Além disso, a oxidação excessiva da BH4 para BH2 pode resultar no desacoplamento da síntese de NO, o que favorece a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse desequilíbrio intensifica o estresse oxidativo, potencializando a resposta inflamatória e aumentando o risco de lesão celular. Pesquisas recentes mostraram que uma regulação adequada da via de síntese da BH4, especialmente por meio

da modulação da enzima GTP ciclohidrolase I (GCH1), pode ajudar a reduzir a geração de ROS e limitar os danos teciduais durante processos inflamatórios (Feng Y. et al., 2024).

Por outro lado, no contexto encefálico, o excesso de NO mediado por BH4 pode contribuir para a neuroinflamação e a disfunção da barreira hematoencefálica. Estratégias que buscam equilibrar os níveis de BH4 são essenciais, pois a redução excessiva deste cofator pode prejudicar a resposta imunológica adaptativa mediada por NO, enquanto que sua superprodução pode agravar os danos inflamatórios. Portanto, entender e modular o metabolismo de BH4 é uma abordagem promissora para mitigar os impactos patológicos da resposta inflamatória tecidual (Feng Y. et al., 2024). Essas observações corroboram com nossa hipótese de que a via de síntese da BH4 tem um papel fundamental na regulação da resposta imunológica e do equilíbrio redox durante a criptococose, especialmente nos tecidos pulmonar e encefálico. Dessa forma, compreender como a infecção por *C. neoformans* e *C. gattii* impacta a expressão dos genes da via de síntese da BH4 nesses tecidos é particularmente relevante para a prática clínica da doença, pois compreender essa dinâmica pode não apenas esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na infecção, mas também ajudar a identificar potenciais alvos terapêuticos para ajustar os níveis de BH4, otimizando a resposta imune sem provocar danos inflamatórios excessivos.

2. JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma doença fúngica de importância global, afetando de maneira desproporcional indivíduos imunocomprometidos e, em regiões tropicais, também imunocompetentes. Espécies como *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* apresentam alta morbidade e mortalidade, especialmente em casos de meningite criptocócica. Com incidência subnotificada no Brasil e alta letalidade sem tratamento, compreender a dinâmica da infecção é essencial para desenvolver estratégias diagnósticas e terapêuticas mais eficazes (Brasil, 2010; Zavala; Baddley, 2020). Estudos indicam que a modulação da resposta imunológica e a desregulação de citocinas inflamatórias têm papel crítico na patogênese da criptococose. Apesar disso, ainda há lacunas na compreensão de como esses processos moleculares influenciam a disseminação fúngica e o tropismo pelo sistema nervoso central, o que reforça a necessidade de pesquisas que integrem aspectos moleculares e imunológicos (May et al., 2016; Carrijo et al., 2021). Neste sentido, sabendo que a BH4 desempenha funções cruciais em vias metabólicas e na modulação da resposta imune e que sua conexão com as infecções fúngicas, em especial as causadas pelos fungos do gênero *Cryptococcus spp.* ainda permanece pouco explorada, a proposta deste estudo foi de ampliar o conhecimento científico sobre o impacto da criptococose no controle transcricional dos genes do metabolismo da BH4 nos tecidos pulmonar e encefálico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar a evolução clínica da criptococose e avaliar seu impacto na expressão dos genes da via de síntese do BH4 nos tecidos pulmonar e encefálico.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar as alterações comportamentais durante a evolução da criptococose em modelo murino de infecção nasofaríngea;
- ✓ Confirmar a infecção pulmonar e caracterizar a disseminação sistêmica dos microrganismos por técnicas histopatológicas, bioquímica e molecular;
- ✓ Determinar a presença fúngica dos microrganismos nos homogenatos de tecidos;
- ✓ Verificar a influência da supressão do sistema imune na evolução clínica da criptococose induzida pelas espécies *C. neoformans* (JEC21) (Sorotipo D) e *C. gattii* (R265) (Sorotipo B);
- ✓ Avaliar o impacto da imunossupressão e/ou da infecção nasofaríngea de *C. neoformans* e *C. gattii* na expressão gênica dos genes que codificam o IFN- γ e as enzimas da via de síntese de BH4 (*Dhfr*, *Spr*, *Gtpch* e *Pts*)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Black C57BL/6, livres de patógenos específicos - SPF, machos, adultos, com idade de 3 a 8 semanas e massa corporal variando entre 20 e 50 gramas, obtidos de Biotério Comercial e mantidos no Biotério do Departamento de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da UNIP - Universidade Paulista em São Paulo. Os animais foram mantidos por 10 dias para aclimatização em microisoladores, em número de 5/microisolador, e alocados em ambiente com temperatura controlada a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de 45-55%, em ciclo de iluminação de 12 horas claro/escuro (liga 8 horas AM). Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração peletizada, esterilizadas por irradiação e água esterilizada por autoclavagem. Todos os procedimentos foram realizados após a prévia aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista [CEUA 7694091222 (**Anexo 1**)]. Durante todos os procedimentos os princípios básicos do uso de animais em toxicologia (adotados pela Sociedade de Toxicologia em julho de 1989) foram seguidos com o objetivo de minimizar o número de animais bem como seu sofrimento.

4.2. Delineamento experimental e cálculo do n amostral

4.2.1. Modelo *in vivo*

Foram utilizados 102 camundongos, os quais foram divididos em 5 grupos: **Controle** – camundongos imunocompetentes e não-inoculados (5 animais); **Infectado 1** – camundongos inoculados com *C. neoformans* (5 animais); **Infectado 2** – camundongos inoculados com *C. gattii* (5 animais); **Cy-Infectado 1** – camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e inoculados com *C. neoformans* (7 animais) e **Cy-Infectado 2** – camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e inoculados com *C. gattii* (7 animais). Os camundongos foram infectados com 1×10^6 células de *C. neoformans* e *C. gattii* por inoculação nasofaríngea e mantidos por 7, 14 e 21 dias após a infecção como mostrado no fluxograma de processamento de amostras.

4.3. Cultura microbiológica

As cepas criptocócicas previamente caracterizadas molecularmente [*C. neoformans* e *C. gattii*] foram doadas pelo Prof. Dr. Marcelo Afonso Valim da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP foram mantidas no Laboratório do Centro de Micologia do Centro de Pesquisa da Universidade Paulista –UNIP em condições ideais de crescimento.

4.4. Protocolo de imunossupressão com ciclofosfamida (Cy)

A imunossupressão foi promovida pelo tratamento com ciclofosfamida (Cy) de acordo com protocolo previamente estabelecido por (Anete Lallo e Porta Miche Hirschfeld, 2012). Em resumo, os camundongos receberam duas doses de 100 mg/kg de ciclofosfamida (Cy) por via intraperitoneal (Genuxal®, Asta Médica Oncologia, São Paulo, Brasil), sendo uma dose semanal (14 dias antes da data prevista para inoculação do patógeno). A administração semanal da Cy foi mantida durante todo o período experimental, sendo que os animais do período experimental DPI 7 tomaram 3 doses; os animais do DPI 14 (4 doses) e os animais do DPI 21 tomaram 5 doses de Cy.

4.5. Inoculação nasofaríngea

Para a inoculação nasofaríngea os animais foram previamente anestesiados com isoflurano por via respiratória. Após a confirmação do aprofundamento anestésico, 50 µL da suspensão fúngica na concentração de 1×10^6 células volume correspondente a 50,000 células de levedura/camundongo, foi inoculada com o auxílio de uma micropipeta. Após a confirmação da total inalação da suspensão fúngica, o camundongo foi mantido separado dos demais em uma gaiola com maravalha para monitorização até que retornasse do aprofundamento anestésico.

4.6. Parâmetros comportamentais

4.6.1. Protocolo SHIRPA

Como procedimentos para avaliação comportamental longitudinal de disfunção neurológica foi aplicado o protocolo SHIRPA (“*SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital Phenotype Assessment*”) com algumas modificações (Rogers et al., 2001). A aplicação deste protocolo permitiu avaliar a morbidade dos animais infectados durante a evolução da criptococose até o surgimento dos sintomas graves.

Os comportamentos foram pontuados de forma a fornecer avaliação quantitativa para cada parâmetro avaliado: comportamento motor (geotaxis negativa, manobra do arame, encurvamento do tronco, elevação da cauda, atividade locomotora, tremor, posição corporal), estado neuropsiquiátrico (vocalização, escape ao toque, passividade posicional), função autônoma (defecação e micção), função e reflexo sensorial (reflexo postural, reflexo corneal), tônus e força muscular (força ao agarrar, tônus corporal) e peso. Os testes do protocolo SHIRPA foram realizados em todos os grupos (Rogers et al., 2001).

4.6.2. Campo aberto

Criado pelo psicólogo Calvin Hall na década de 1930, o campo aberto é um teste para se determinar o comportamento do animal em um ambiente novo, seu impulso de explorar novos locais (CRUSIO, 2011). São vários modelos disponíveis no mercado atualmente, mas o utilizado foi um com paredes brancas e linhas circulares pretas. Os animais foram colocados no centro do círculo e filmado por uma câmera de vídeo, mantendo-se por 5 minutos (Prut, Belsung, 2003). Os seguintes parâmetros foram observados: a) frequência de limpeza, b) tempo de limpeza, c) tempo de locomoção, d) frequência de levantar, e) tempo de imobilidade. O *grooming* ou comportamento de autolimpeza em roedores pode ocorrer em períodos de alto ou baixo nível de estresse e está associado com comportamento ansioso.

Níveis baixos de estresse podem aumentar o comportamento de limpeza espontânea junto com a associação a transição de outras atividades, enquanto elevados níveis de estresse aumentam o comportamento de limpeza como resposta a novos ambientes (Reis-Silva et al., 2019). Na medida em que este comportamento de características estereotipadas permite o animal fazer a higiene pessoal; a frequência de levantar, tempo de imobilidade e frequência de imobilidade estão relacionadas ao comportamento exploratório do animal (Kalueff; Tuohimaa, 2004, File et al.,

2001). Entre uma análise e outra, o local de exame era higienizado com álcool 5%. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5-7 animais.

4.6.3. Suspensão pela cauda

De acordo com Steru (1985) e Castagné (2011) o teste de suspensão pela cauda (*Tail Suspension/Hanging*) consiste na suspensão do animal de estudo pela cauda com uso de uma fita adesiva há 1 metro do chão e a posição adequada é o ventre direcionada para o pesquisador. Para este experimento, gravamos com câmera por 6 minutos. Este teste visa avaliar a resposta com relação a comportamentos relacionados a ansiedade/estresse. Em nossa pesquisa foram considerados três itens para avaliação: frequência de imobilidade (quantas vezes o animal fica sem movimento), tempo de imobilidade (quanto tempo o animal fica sem movimento), latência da 1ª. imobilidade. Entre uma análise e outra, o local de exame era higienizado com álcool 5%. O estado ansioso, depressivo ou doentio são formas de o animal expressar o medo e ativar mecanismo de adaptação.

Para esse estudo definimos os estados como a) ansioso como o aumento de atividade dos animais no campo aberto, sendo que o animal tende a permanecer mais tempo nas bordas do campo aberto e menos no centro. Aumento na frequência de autolimpeza (*grooming*). Na suspensão pela cauda possuem uma tendência de maior estímulo para soltura e tempo de luta quando comparado ao grupo controle; b) depressivo como redução no tempo e frequência de locomoção, bem como redução na frequência de levantar.

Na suspensão pela cauda observa-se aumento no tempo de imobilidade e menor resistência inicial, também é notada a redução na latência de primeira imobilidade; e c) doentio é caracterizado por uma redução na atividade geral do animal, com maior tempo de imobilidade que nos estados de ansiedade e depressão, também é notada a redução no comportamento de autolimpeza (*grooming*). Na suspensão pela cauda ocorre a diminuição no tempo de luta e na intensidade dos movimentos do animal, além da ausência da tentativa de escape (Steimer, 2002; Stein, Bouwer, 1997).

4.7. Necropsia, coleta de amostras e método de descarte

Nos dias 7, 14 e 21 pós-infecção (DPI), os animais foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico por via intraperitoneal, utilizando-se mistura [quetamina (300 mg/kg), xilazina (30 mg/kg) e acepromazina (2,5 mg/kg)]. Após a eutanásia o sangue foi coletado por punção cardíaca. Em seguida o animal foi perfundido com 10 mL de PBS e os órgãos (pulmão, pâncreas, baços, rins, coração e encéfalo) foram coletados. O encéfalo foi coletado através de técnica de craniotomia fronto-parieto-occipital, após abertura da calota craniana com tesoura de Metzembaun na região frontal e no osso interparietal, que foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posteriores análises bioquímicas e moleculares.

4.8. Parâmetros histopatológicos

Para a realização dos estudos histopatológicos os tecidos pulmonar e encefálico foram coletados após perfusão do animal com 10 mL de PBS estéril e fixados em formol tamponado a 10%. Após 72 horas as amostras foram devidamente posicionadas em capsulas (cassetes) em sua totalidade ou partes representativas, de até 4 mm. Em seguida, as amostras foram desidratadas, clarificadas e impregnadas por parafina. Após o término do processo, os blocos foram fatiados em micrótomo (5-6 μ m) e posicionados em lâminas histológicas. Em seguida, as lâminas foram submetidas as colorações específicas para determinação de alterações morfológicas e glomerados de leveduras (H.E).

4.8.1. Hematoxilina-eosina (H-E)

As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas em 2 banhos de xilol, sendo o primeiro na estufa, a 60°C por 30 minutos, e o segundo à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, hidratadas por meio de sequências alcoólicas em concentrações decrescentes, álcool 100%, 95% e 70%, até água destilada. Após a hidratação, as lâminas foram coradas com hematoxilina por 50 segundos, lavadas em água corrente para oxidação da hematoxilina por 2 a 4 minutos. Após a lavagem em água, as lâminas foram coradas com eosina por 20 segundos precedida de uma passagem em álcool absoluto. Após o final da coloração, as lâminas foram desidratadas em álcool 100% (3 banhos de 3s cada), xilol (2 banhos de 3s cada) e montadas com resina sintética (Entellan® Merck).

4.9. Parâmetros microbiológicos

4.9.1. Isolamento e identificação clássica

Para garantir que não ocorresse a contaminação das amostras, os órgãos (pulmão, pâncreas, baços, rins, coração, próstata e encéfalo) foram retirados em condições assépticas, pesados e macerados em 1,0 mL PBS estéril. A seguir, 100 µL de cada suspensão foram semeadas na superfície de placas de ágar YPD (Extrato de Levedura - Peptona – Dextrose). As placas semeadas foram incubadas a 30°C por 48h (Feder et al., 2015) e o número de unidades formadoras de colônias (CFU) foram contadas e compiladas em planilha para análise comparativa com ufc/mL derivadas das diferentes amostras. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 5 animais independentes.

4.10. Parâmetros Moleculares

4.10. 1. Extração de Ácido Ribonucléico (RNA)

O RNA total foi isolado as amostras de pulmão e encéfalo pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Para isso após homogeneização das estruturas em 0,5 mL do reagente TRIzol®; a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL de clorofórmio e (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) e centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos novos e devidamente identificado, sendo desprezada a fase precipitada. Em seguida, a precipitação do RNA foi realizada com adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado ao sobrenadante coletado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Após ao término da incubação das amostras (10 minutos a temperatura ambiente), as amostras foram novamente centrifugadas (14.000 rpm por 15 minutos). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75% e ressuspendido em 20 µL de água ultrapura e armazenados a -80°C. A quantidade e pureza do RNA extraído deverá ser estimada em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

4.10. 2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 μL contendo 500 μM de dNTP, 25 $\mu\text{g/mL}$ de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 μM de DTT pela enzima Superscript II. A mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias e em seguida a reação de síntese acontecerá durante 50 minutos a 50°C, como inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído a concentração final de 100 ng/ μL e armazenado a -20°C.

4.10. 3. Análise da expressão gênica por qPCR

Para o estudo da expressão gênica as reações foram realizadas com iniciadores específicos (**Tabela 1**) e tiveram como controle endógeno os genes *β -actina* [F: (5` TCT TGG GTA TGG AAT CCT GTG 3`); R: (5` AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG 3`)], *Gapdh* [F: (5` CCG CAG CGA GGA GTT TCT C 3`); R: (5` GAG CTA AGC TCA GGC TGT TCC A 3`)] e *Rn18s* [F: (5` CGC GGT TCT ATT TTG TTG GT 3`); R: (5` TCG TCT TCG AAA CTC CGA CT 3`)]. Todas as reações tiveram volume final de 10 μL ; contendo 5 μL de SYBR Green I Master, 0,4 μM de iniciadores específicos, 1 μL do cDNA sintetizado e q.s.p. de água *Milli-Q Rnase free*. A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo é subtraída pela média do Ct dos controles endógenos utilizados (*β -actina*, *Gapdh* e *18S*), resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão o valor de ΔCt obtido foi substituímos na fórmula $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à média da expressão gênica dos genes utilizados como normalizadores. Os resultados foram expressos como média \pm SEM padrão de 5-7 animais independentes realizados em duplicata técnica, na forma absoluta para a comparação do perfil transcricional entre os diferentes órgãos e normalizados em relação ao grupo controle (atribuído valor 1).

Tabela 1: Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica.

Gene (ID)	Iniciador	5'- 3' Sequencia	Condições de reação	pb
Gch1 (14528)	Forward Reverse	TGT TGG TGT GTG CCT TGT CT TGT CAG CCA GAG GGA GAA CT	95°C – 15s; 60°C– 30s; 72°C– 30s	191
Dhfr (13361)	Forward Reverse	GAG GTC CAG GAG GAA AAA GG ATC CCC AGG ATC ACA AAA CA	95°C – 15s; 60°C– 30s; 72°C– 30s	209
Pts 1 (19286)	Forward Reverse	CTG CAT GTG GTT TTG GTG AG TTA ACG GCT GAG CCA TCT CT	95°C – 15s; 60°C– 30s; 72°C– 30s	178
Spr (20751)	Forward Reverse	TAG AGG TGG GAA GAG CAG GA CCA GTG AAC ACC ACA GGA TG	95°C – 15s; 59°C– 30s; 72°C– 30s	190
Ifng (15978)	Forward Reverse	CAT TCA GAG CTG CAG TGA CC GGA AGC ACC AGG TGT CAA GT	95°C – 15s; 60°C– 30s; 72°C– 30s	167

4.11. Análise estatística

Os dados obtidos foram armazenados em uma planilha do Excel e posteriormente analisados pelo teste de variância ANOVA two-way, seguido pelo teste de Tukey como um teste de comparação múltipla, para avaliar os efeitos dos fatores: Imunossupressão, Infecção e a interação entre eles, usando GraphPad Prism9. Em todas as medidas o α foi de 5% bicaudal, ou seja, a significância estatística foi considerada para valores de $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 a 7 animais independentes. Todas as reações foram realizadas em duplicata técnica. A correlação entre a expressão gênica e o padrão de metilação da região promotora foi testada utilizando o Coeficiente de correlação de Pearson (r), sendo considerado significativo os valores de $r \geq 0.6$.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da evolução da infecção intra-nasal de cepas criptocócicas pelo monitoramento do ganho de peso corporal e disseminação sistêmica

Em relação ao ganho de peso corporal nossos resultados mostram que tanto a infecção com a cepa *C. gattii* como a cepa e *C. neoformans* comprometeram o ganho de peso corporal de forma significativa quando comparados em relação ao grupo Controle. Entretanto, foi possível observar diferença entre os grupos imunossuprimidos e imunocompetentes para os animais infectados pela cepa *C. gattii* apenas no DPI 7, com expressiva perda de peso entre os grupos no DPI 14 (linhas azuis). Por outro lado, os animais infectados pela cepa *C. neoformans* o comprometimento no ganho de peso corporal se manteve igual entre os grupos imunossuprimidos e imunocompetentes até o período DPI 14. Após a segunda semana de infecção foi possível observar uma expressiva redução no ganho de peso apenas no grupo dos animais imunossuprimidos, com redução do peso corporal no DPI 21 (**Fig.2**). Devido evolução da criptococose e o rápido agravamento dos sintomas clínicos dos animais infectados pela cepa *C. gattii* observados no DPI 14, optamos por interromper os experimentos relacionados aos grupos infectados com o *C. gattii* no período de 21 dias (DPI 21).

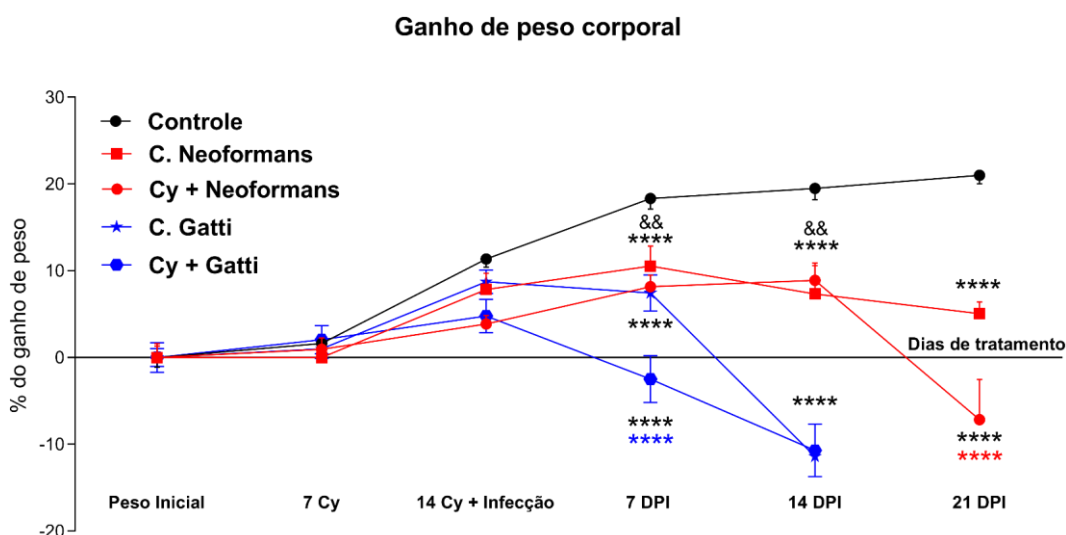


Figura 2. Caracterização da evolução da Criptococose no ganho de peso corporal. O ganho de peso corporal dos animais foi monitorado semanalmente do grupo Controle e inoculados pela via intra-nasal com as cepas criptocócicas (50,000 cels/animal) durante todo o período experimental. Os dados representam a média \pm erro padrão da média, **** $P < 0,0001$ quando comparados com o grupo Controle; **** $P < 0,0001$ entre os grupos *C. gattii* X *Cy + Gattii*; *** $P < 0,0001$ entre os grupos *C. neoformans* X *Cy + Neoformans* e && $P < 0,001$ diferença entre o grupo *C. neoformans* com os grupos *C. gattii* e *Cy + Gattii*.

A fim de confirmar a disseminação da infecção fúngica, homogenato dos órgãos foram preparados em ambiente estéril, semeados em placas de cultivo e incubadas a 30°C por 48h. Os resultados apresentados na **Fig.3** mostram que os homogenatos provenientes dos animais do DPI 7 apresentaram um maior número de colônias para todos os órgãos avaliados (**Fig. 3a, c, e, g, i, k**) quando comparados aos resultados do DPI 14 (**Fig. 3b, d, f, h, j, l**). Cabe ressaltar que no DPI 14 os órgãos que apresentaram um maior número de colônias fúngicas foram o pulmão (**Fig. 3b**), encéfalo (**Fig. 3d**) e coração (**Fig. 3h**) para a cepa *C. gattii*.

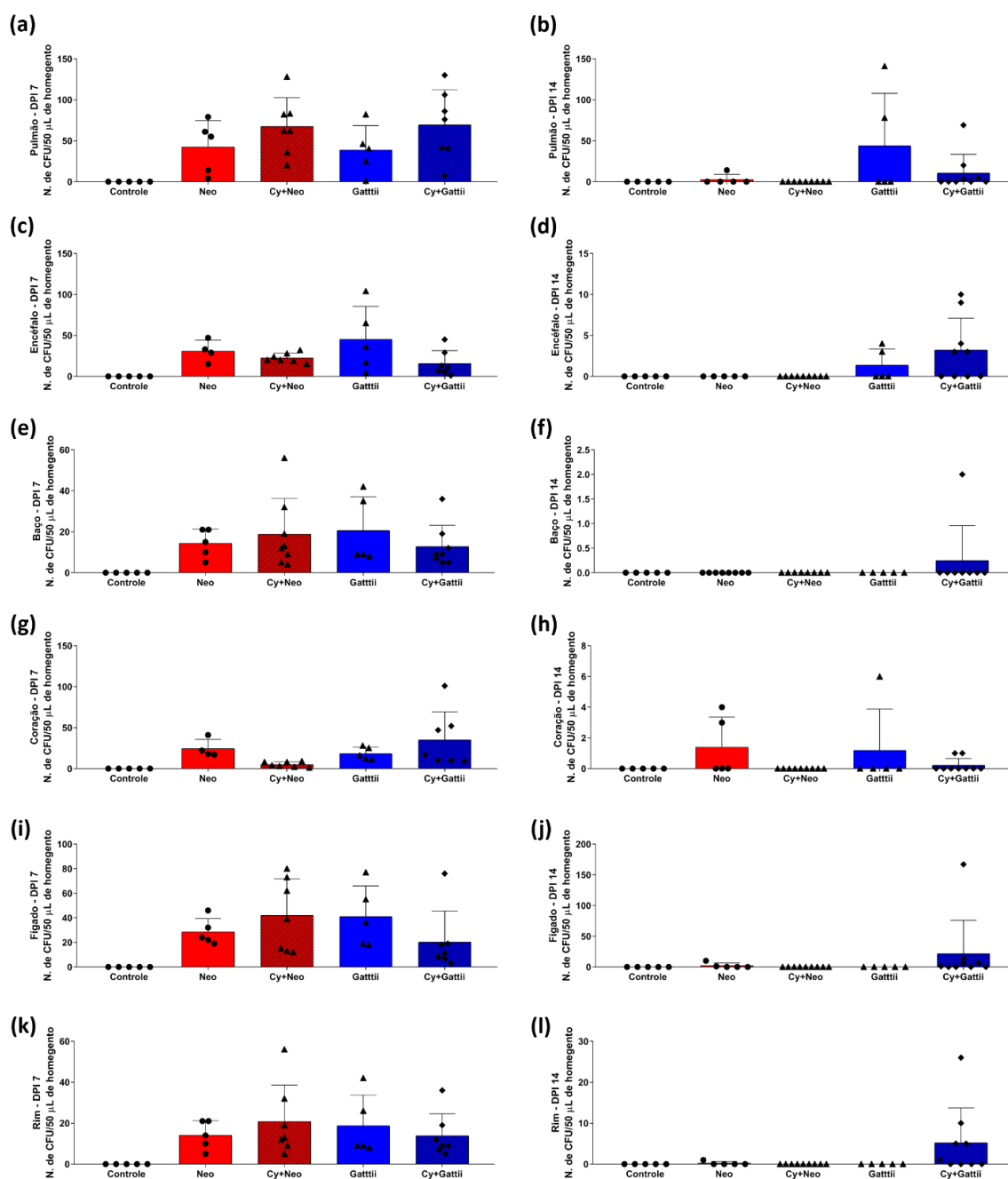


Figura 3. Avaliação da presença do microrganismo em homogenato dos diferentes órgãos nos períodos experimentais DPI 7 e DPI 14. Os gráficos (a, c, e, g, i, k) representam a contagem de colônias fúngicas no período de 7 dias após infecção (DPI 7) e os gráficos (b, d, f, h, j, l) no período de 14 dias após infecção (DPI 14). Nota-se a presença de fungos no período de pesquisa de DPI 7 dias tanto na cepa *C. gattii*, quanto na *C. neoformans*; entretanto, a presença destes só foi notada no período de pesquisa nas cepas *C. gattii* em todos os órgãos e *C. neoformans* somente no coração.

5.2. Caracterização das alterações comportamentais promovidas pela infecção criptocócica

Todos os testes comportamentais relacionados ao desenvolvimento (Protocolo SHIRPA) utilizados para a avaliação da evolução da infecção fúngica foram observados semanalmente durante todo o período experimental, sendo os resultados apresentados abaixo a representação gráfica da média dos escores das análises semanais. A **Fig. 4** mostra os resultados das análises dos parâmetros referentes ao comportamento motor dos animais dos períodos experimentais DPI 7 e DPI 14. Dentre as categorias avaliadas foi observado redução do escores dos animais imunocompetentes e imunossuprimidos infectados pelas duas cepas (*C. gattii* e *C. neoformans*) no DPI 7 (**Fig. 4c**) e aumento do escore apenas no grupo *C. gattii* no DPI 14 (**Fig. 4d**). Em relação a categoria Encurvamento do tronco aumento do escore foi observado apenas no grupo Cy + *gattii* (**Fig. 4e, f**) e redução do escore do Tremor no grupo *C. gattii* (**Fig. 4h**), ambos no DPI 14. Adicionalmente, redução do escore do Trem posterior foi observado nos grupos *C. gattii*, Cy + *gattii* e Cy + *neoformans* foi observado no DPI 7 e aumento no grupo Cy + *gattii* no DPI 14 (**Fig. 4i, j**). Não foi observado diferenças significativas da Elevação da Cauda em nenhum período experimental (**Fig. 4a, b**).

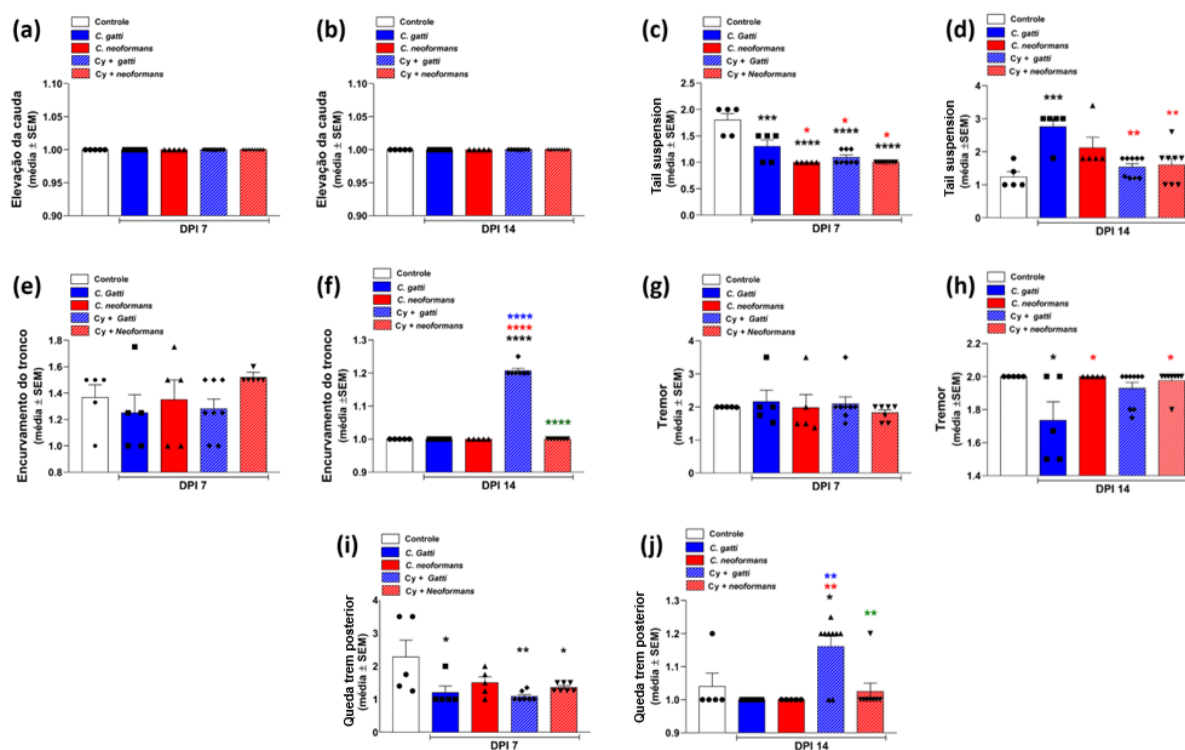


Figura 4. Efeito da infecção intranasal das cepas criptocólicas no comportamento psicomotor. O comportamento psicomotor dos animais inoculados foi avaliado utilizando o protocolo SHIRPA semanalmente durante a linha do tempo experimental (DPI 7 e DPI 14) empregando 5 categorias funcionais: Elevação da cauda (**a**, **b**), Geotaxia Negativa (**c**, **d**), Encurvamento do tronco (**e**, **f**), Tremor (**g**, **h**) e Trem posterior (**i**, **j**). Os resultados representam a média \pm SEM das análises semanais do escore de 5-7 animais independentes. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os asteriscos pretos correspondem a diferenças em relação ao grupo Controle; vermelhos em relação *C. neoformans* e verdes em relação ao grupo *Cy + gattii*.

Os resultados apresentados na Figura 6 referentes a avaliação da força e tônus muscular e do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), sugerem que apenas o SNA foi comprometido pela infecção com aumento da média para defecação nos grupos *C. neoformans* e *Cy + C. neoformans* no DPI 7 (**Fig. 5g**) e redução nos grupos *C. gattii* e *Cy + C. gattii* no DPI 14 (**Fig. 5f**). Não sendo observados diferenças significativas para as demais categorias avaliadas (**Figs. 5a, b, c, d, e, f**).

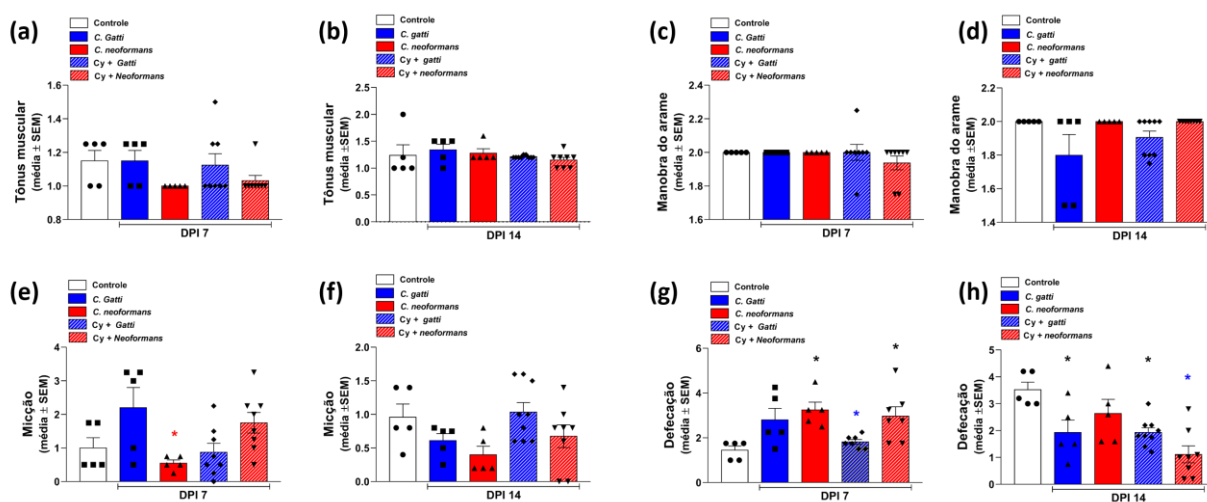


Figura 5. Efeito da infecção intranasal das cepas criptocólicas no esforço e tônus muscular e do Sistema Nervoso Autônomo (SNA). O esforço e tônus muscular e a atividade do SNA foram avaliadas utilizando o protocolo SHIRPA semanalmente durante a linha do tempo experimental (DPI 7 e DPI 14) empregando 4 categorias funcionais distintas, sendo Tônus muscular (**a, b**) e a Manobra do Arame (**c, d**), relacionados a força e tônus muscular e a micção (**e, f**) e defecação (**g, h**) relacionadas ao SNA. Os resultados representam a média \pm SEM das análises semanais do escore de 5-7 animais independentes. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os asteriscos pretos correspondem a diferenças em relação ao grupo Controle; vermelhos em relação *C. neoformans* e verdes em relação ao grupo *Cy + gattii*.

Adicionalmente o estado neuropsiquiátrico do animal foi avaliado levando em conta a atividade espontânea, a excitação de transferência, o escape ao toque, a passividade posicional, o medo, irritabilidade e vocalização. Para isso, as categorias funcionais de Atividade geral, Escape ao toque, Vocalização, Pinçamento da cauda e Fotofobia foram avaliadas. Os resultados apresentados na **Figura 6** mostram que no DPI 7 os animais dos grupos *C. neoformans*, *Cy + gattii* e *Cy + neoformans* tiveram seus escores reduzidos (**Fig. 6c**) e apenas os animais do grupo *Cy + Gattii* no DPI 14 tiveram a média dos escores aumentados na categoria Escape ao toque (**Fig. 6d**). Nenhuma alteração significativa foi observada para as demais categorias [Atividade geral (**Fig. 6a, b**); Vocalização (**Fig. 6e, f**); Resposta ao toque (**Fig. 6g, h**); Pinçamento da cauda (**Fig. 6i, j**) e Fotofobia (**Fig. 6k, l**)].

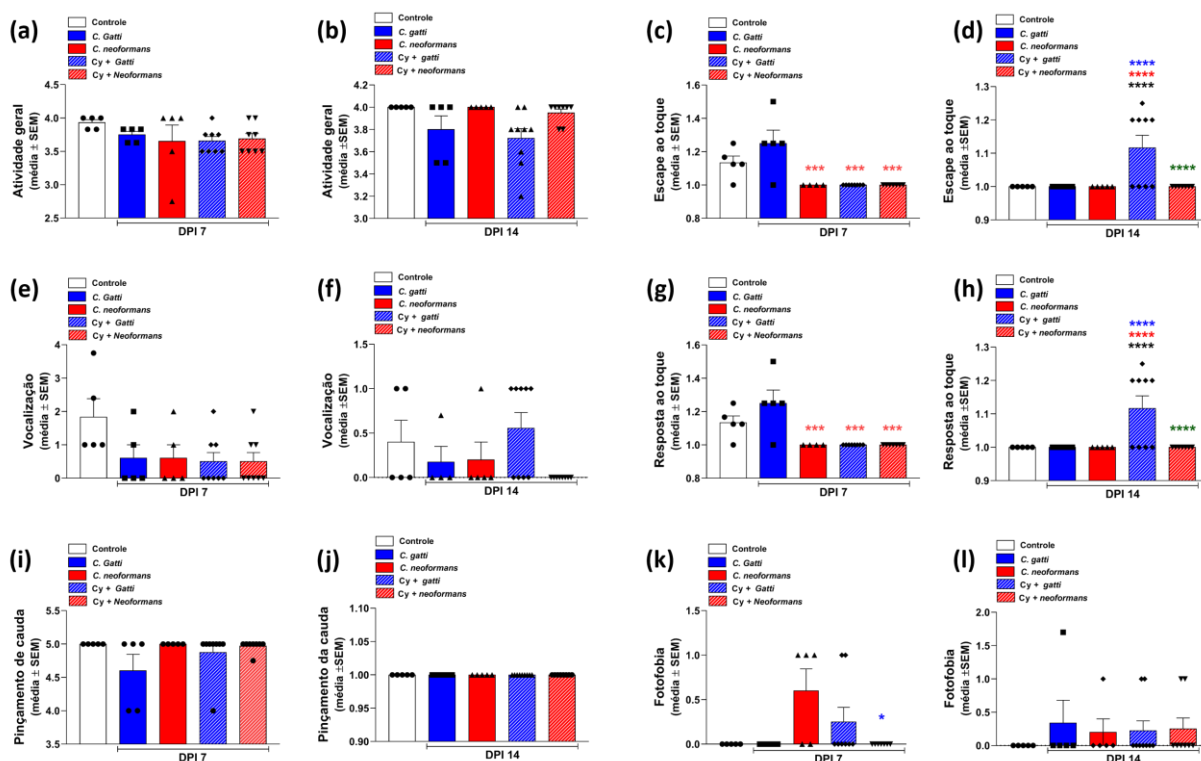


Figura 6. Efeito da infecção intranasal das cepas criptocócicas no Estado Neuropsiquiátrico. O estado neuropsiquiátrico dos animais foi avaliado utilizando o protocolo SHIRPA semanalmente durante a linha do tempo experimental (DPI 7 e DPI 14) empregando 5 categorias funcionais distintas: Atividade geral (a, b), Escape ao toque (c, d), Vocalização (e, f), Resposta ao toque (g, h), Pinçamento da cauda (i, j) e Fotofobia (k, l). Os resultados representam a média ± SEM das análises semanais do escore de 5-7 animais independentes. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os asteriscos pretos correspondem a diferenças em relação ao grupo Controle; vermelhos em relação *C. neoformans* e verdes em relação ao grupo *Cy + Gattii*.

O reflexo e a função sensorial foram avaliados utilizando as categorias do reflexo corneal e resposta postural. Os resultados obtidos na avaliação dos animais revelaram que a infecção pelas cepas *C. gattii* e *C. neoformans* promoveram um aumento no escore do reflexo corneal apenas no DPI 7 para todos os grupos estudados (Fig. 7a), não sendo observadas diferenças significativas no DPI 14 (Fig. 7b). Resultados semelhantes foram observados para a categoria de resposta postural, sendo observado redução do escore nos grupos *C. neoformans* e *Cy + gattii* no DPI 7 (Fig. 7c) sem diferença no DPI 14 (Fig. 7d).

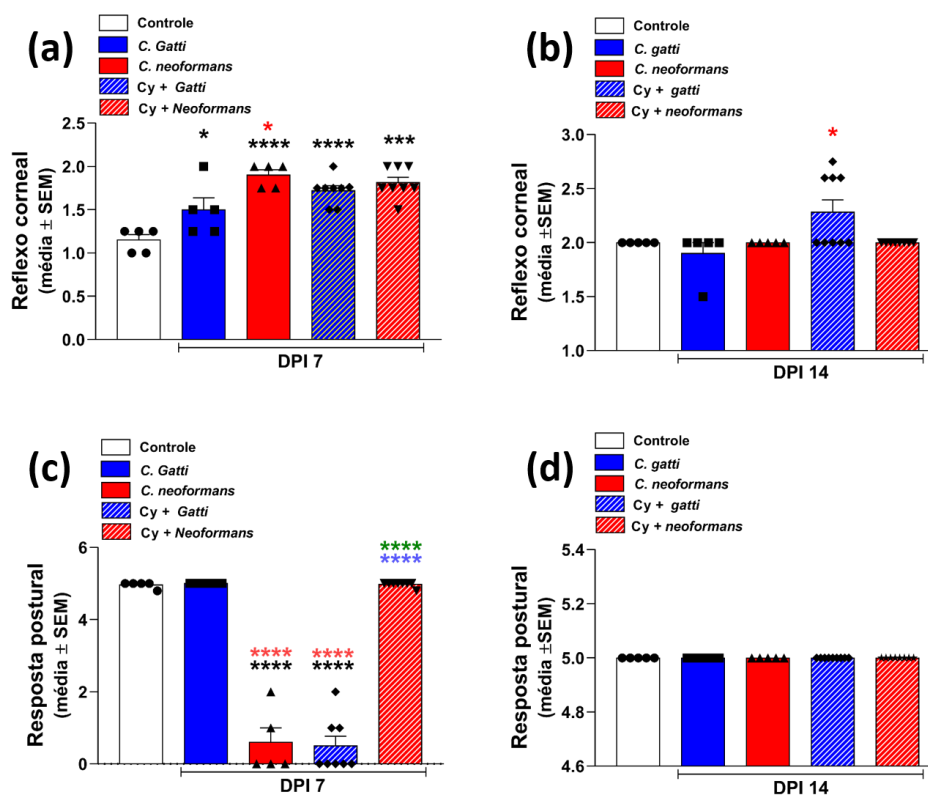


Figura 7. Efeito da infecção intranasal das cepas criptocócicas na Função Sensorial. A função sensorial dos animais foi avaliada utilizando o protocolo SHIRPA semanalmente durante a linha do tempo experimental (DPI 7 e DPI 14) empregando 2 categorias funcionais distintas: Reflexo corneal (a, b) e Resposta postural (c, d). Os resultados representam a média \pm SEM das análises semanais do escore de 5-7 animais independentes. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os asteriscos pretos correspondem a diferenças em relação ao grupo Controle; vermelhos em relação *C. neoformans* e verdes em relação ao grupo *Cy + gattii*.

5.3. Avaliação histológica do tecido pulmonar e encefálico

As análises microscópicas descritivas dos cortes histológicos do tecido pulmonar e encefálico corado por HE dos animais infectados cepas *C. gattii* e *C. neoformans* foram apresentados nas **Figs. 8 e 9**. No tecido pulmonar no período experimental DPI 7 foi possível detectar a presença do fungo no pulmão apenas de animais imunocompetentes e infectados pela cepa *C. gattii*, não sendo possível a identificação nos animais infectados pela cepa *C. neoformans*.

Por outro lado, mesmo não sendo observado a presença de fungos no grupo dos animais imunossuprimidos (*Cy + gattii*) foi observado infiltrado inflamatório no tecido pulmonar. Em relação ao DPI 14, as análises descritivas dos cortes histológicos do tecido pulmonar mostram um aumento na quantidade de fungos presentes no tecido dos animais imunocompetentes e

imunossuprimidos com importante infiltração leucocitária, análoga à descrita no grupo anterior apenas nos animais infectados com a cepa *C. gattii* com identificação de processo broncopneumônico, com comprometimento de bronquíolos e alvéolos, infiltrados por população leucocitária mista, de polimorfonucleares e mononucleares. Destaque para a população eosinofílica. A observação da presença de numerosos exemplares fúngicos em luz de vias aéreas e na luz de vaso venoso pode sugerir a disseminação hematogênica do parasita (**Fig. 8**).

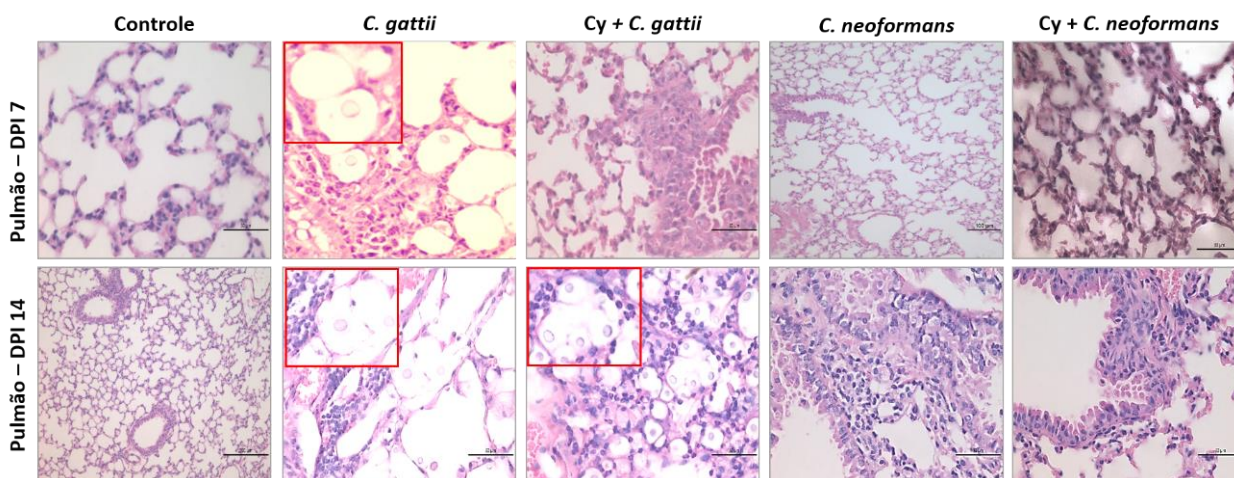


Figura 8. Análise histológica do tecido pulmonar dos camundongos infectados pela cepa *C. gattii* e *C. neoformans*. Fotomicrografias representativas do tecido encefálico corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H.E) de camundongos infectados (50,000 cels fúngicas/animal) pelas cepas criptocócicas após 7 e 14 dias pós infecção. Cy – animais imunossuprimidos, Barra = 40x.

Por outro lado, as análises microscópicas descritivas dos cortes histológicos do tecido encefálico corado por HE dos animais infectados pelas cepas *C. gattii* e *C. neoformans* não revelaram alterações histopatológicas significativas (**Fig. 9**).

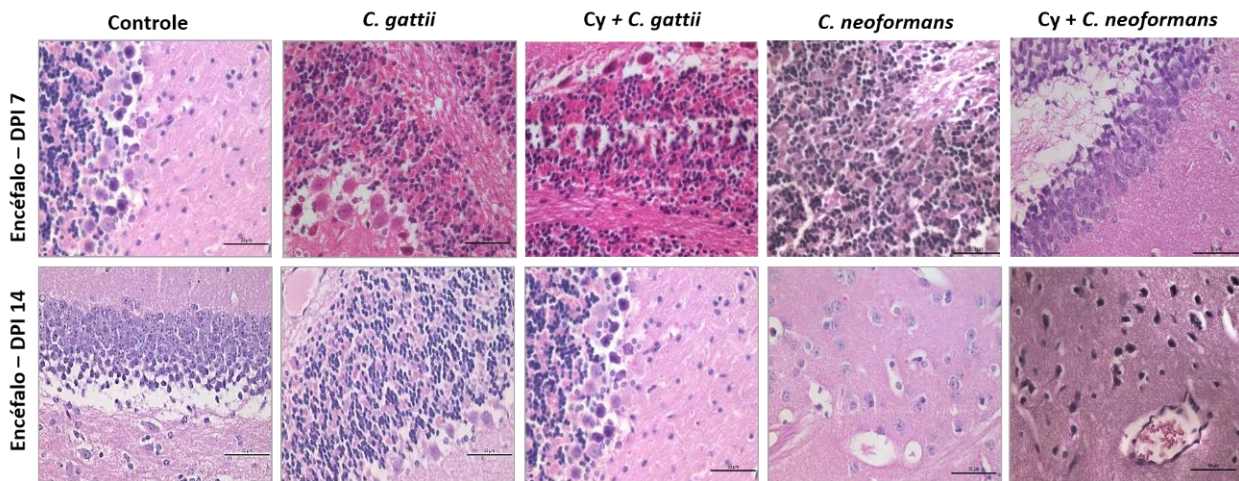


Figura 9. Análise histológica do tecido encefálico dos camundongos infectados pela cepa *C. gattii* e *C. neoformans*. Fotomicrografias representativas do tecido encefálico corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H.E) de camundongos infectados (50,000 cels fúngicas/animal) pelas cepas criptocócicas após 7 e 14 dias pós infecção. Cy – animais imunossuprimidos, Barra = 40x.

5.4. Avaliação do impacto da criptococose na atividade locomotora e no comportamento tipo doentio

O Campo aberto foi utilizado como parâmetro de avaliação da atividade locomotora e exploratória. Os animais foram avaliados durante 5 minutos, sendo mensurados durante este tempo os seguintes parâmetros: tempo de locomoção, frequência de levantar, tempo e frequência de limpeza e o tempo e frequência de imobilidade. Os resultados da **Figura 10**, mostram que a infecção pelas cepas aumentou o tempo de imobilidade em todos os grupos avaliados no DPI 7 (**Fig. 10a**). Por outro lado, o tempo de imobilidade se mostrou aumentado apenas nos grupos *C. gattii* e *Cy + neoformans* no DPI 14 (**Fig. 10b**). Em relação ao tempo de locomoção e limpeza, nossos resultados mostram que a tanto a infecção pela cepa *C. gattii* como pela cepa *C. neoformans* reduziu o tempo de imobilidade e o tempo de limpeza no DPI 7 (**Fig. 10c, e**). Em relação ao DPI 14 apenas o tempo de imobilidade foi reduzido (**Fig. 10d, f**). Ainda, redução nas frequências de levantar e limpeza foram observadas para todos os grupos apenas no DPI 7 (**Figs. 10i, k**). Não foram observadas diferenças significativas para os demais parâmetros avaliados (**Figs. 10g, h, j, l**).

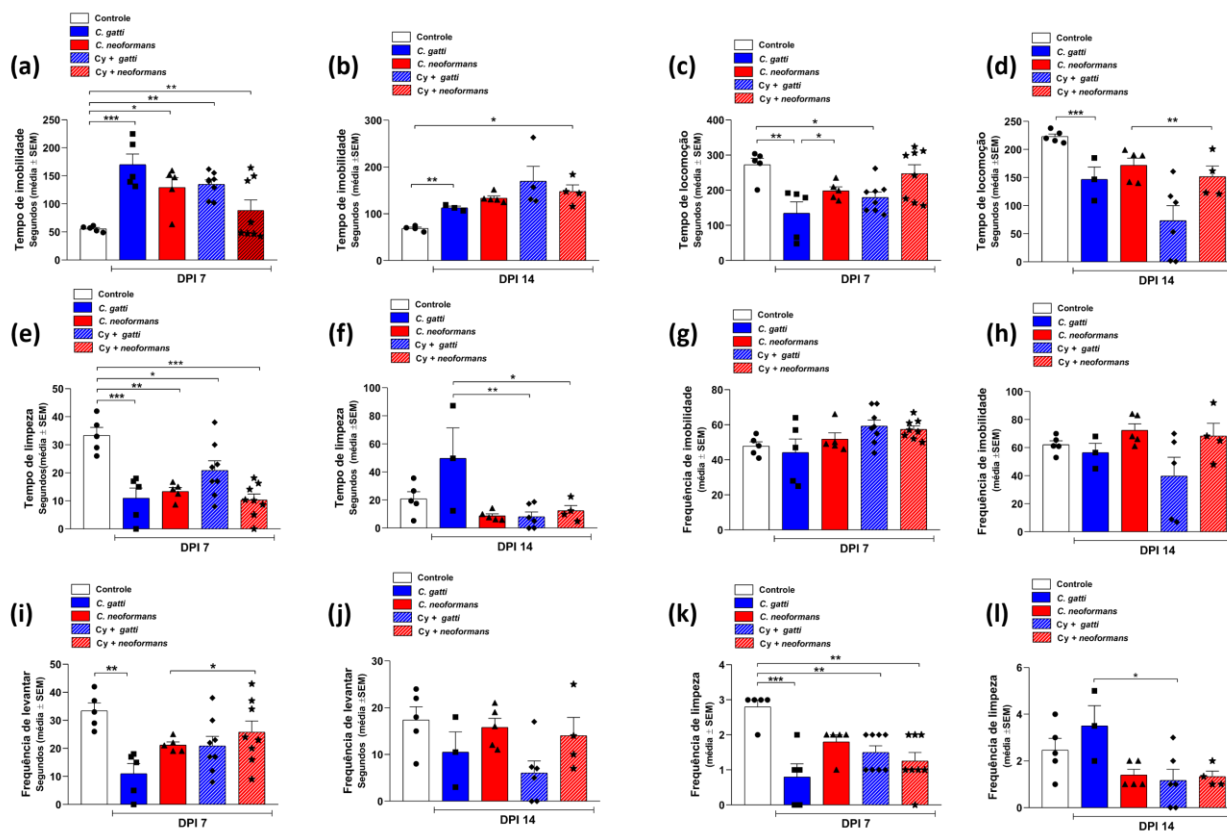


Figura 10. Efeito da criptococose na atividade locomotora. A atividade locomotora dos animais foi avaliada utilizando o Campo aberto como teste comportamental. Os parâmetros avaliados foram o Tempo de imobilidade (a, b), Tempo de locomoção (c, d) Tempo de limpeza (e, f), Frequência de imobilidade (g, h), a Frequência de levantar (i, j) e a Frequência de limpeza (k, l). Os resultados representam a média \pm SEM das análises semanais do escore de 5-7 animais independentes. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Em relação ao comportamento tipo doentio, os resultados obtidos pelo teste de suspensão pela cauda sugerem que o tempo de infecção é determinante. Redução significativa no tempo de latência para primeira imobilidade foi observado em todos os grupos avaliados tanto no DPI 7 (Fig. 11a) como no DPI 14 (Fig. 11b) para ambas as cepas utilizadas. Entretanto, não foi observado diferenças entre os animais imunocompetentes e imunossuprimidos, apenas uma redução do tempo para todos os grupos no DPI 14 em relação à média de segundos dos grupos do DPI 7. Por outro lado, aumento no tempo e na frequência de imobilidade foram observados apenas no DPI 14 (Fig. 11d, f), não sendo observados diferenças significativas no DPI 7 (Fig. 11c, e).

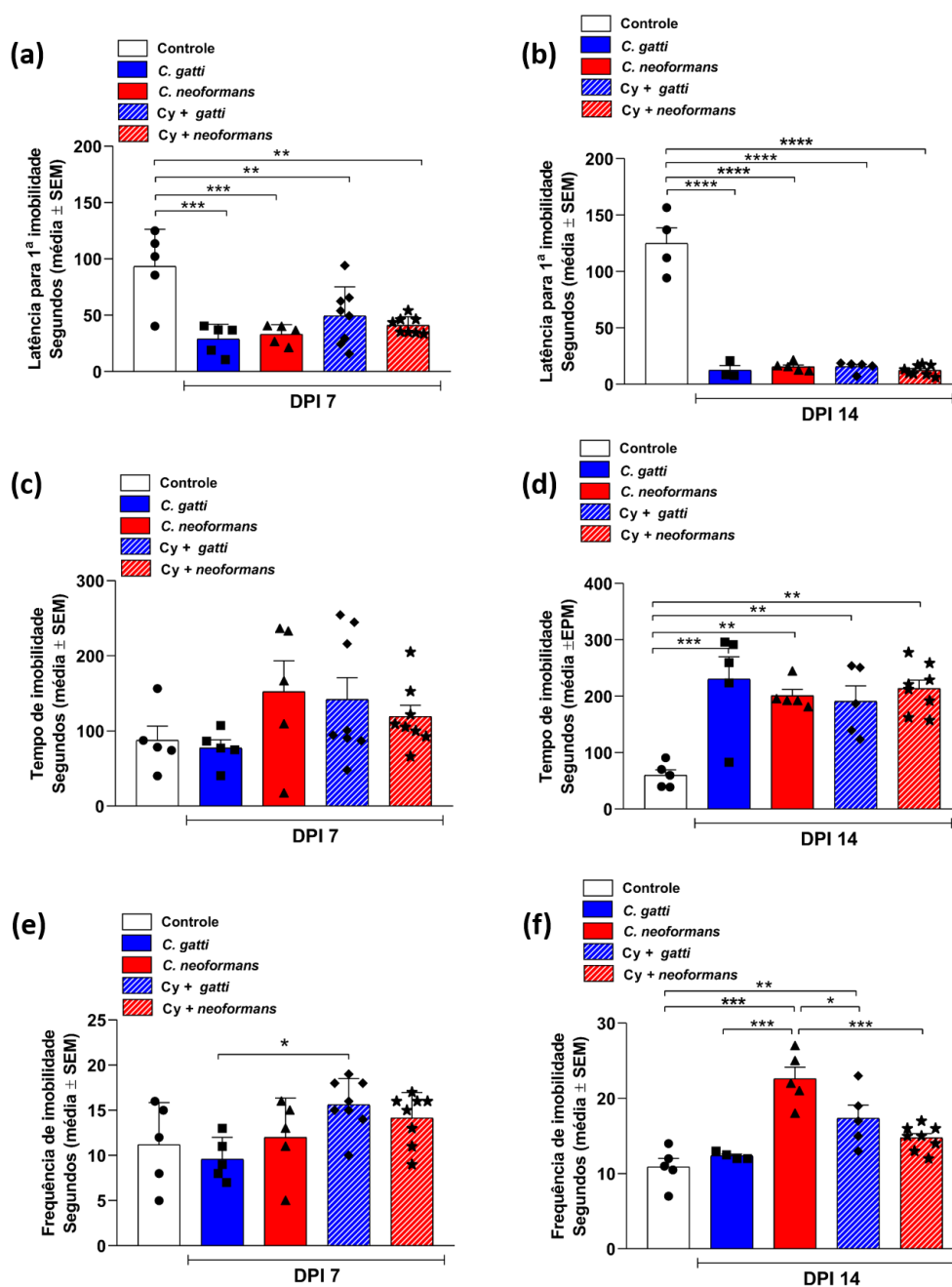


Figura 11. Efeito da criptococose no comportamento tipo doentio. O comportamento tipo doentio dos animais foi avaliado utilizando a Suspensão pela Cauda como teste comportamental. Os parâmetros avaliados foram a Latência para Imobilidade (a, b), Tempo de Imobilidade (c, d) e a Frequência de Imobilidade (e, f). Os resultados representam a média ± SEM das análises semanais do escore de 5-7 animais independentes. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Durante o acompanhamento da evolução semanal dos animais infectados pela cepa *C. gattii* referentes ao período experimental DPI 14 alguns animais acabaram morreram antes do DPI 14 devido a rápida evolução da infecção. Assim após a comprovação da rápida evolução dos animais infectados pela cepa *C. gattii* após o decimo segundo dia pós infecção, optamos por realizar as análises referentes ao DPI 21 apenas para os animais infectados pela cepa *C. neoformans*. Portanto, os resultados apresentados nas **Figs. 12, 13 e 14** são referentes ao período experimental DPI 21. Nossos resultados revelaram resultados significativos apenas para defecação (**Fig. 12i**), não sendo observados diferenças significativas para os demais parâmetros avaliados para o desenvolvimento (**Fig. 12a-o**), na atividade locomotora (**Fig. 13a-f**) e comportamento doentio (**Fig. 14a-c**).

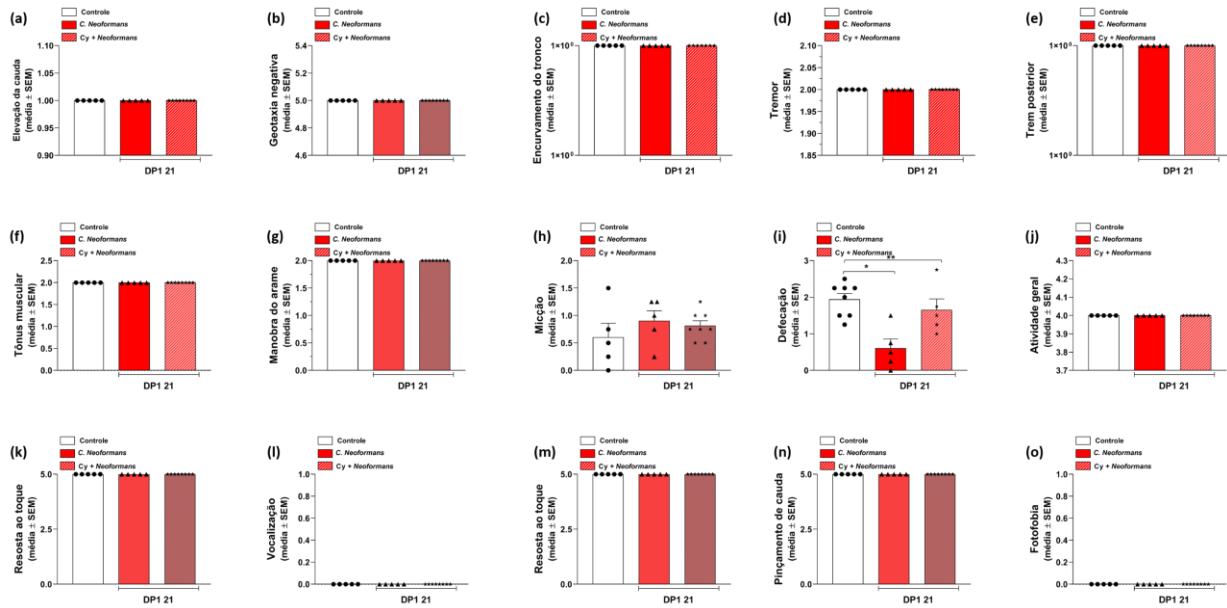


Figura 12. Efeito da criptococose no desenvolvimento dos animais infectados pela cepa *C. neoformans* no DPI 21. O desenvolvimento foi avaliado utilizando o protocolo SHIRPA semanalmente no DPI 21. Para avaliação do Comportamento motor foram empregadas as seguintes 5 categorias funcionais: Elevação da cauda (a), Geotaxia Negativa (b), Encurvamento do tronco (c), Tremor (d) e Trem posterior (e). A força e tônus muscular empregando 2 categorias funcionais sendo o Tônus muscular (f) e a Manobra do Arame (g). A atividade do Sistema Nervoso Autônomo 2 categorias; a micção (h) e defecação (i). Para o Estado Neuropsiquiátrico 5 categorias: Atividade geral (j), Escape ao toque (k), Vocalização (l), Resposta ao toque (m), Pinçamento da cauda (n) e Fotofobia (o). Os resultados representam a média ± SEM das análises semanais do escore de 5-9 animais independentes. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

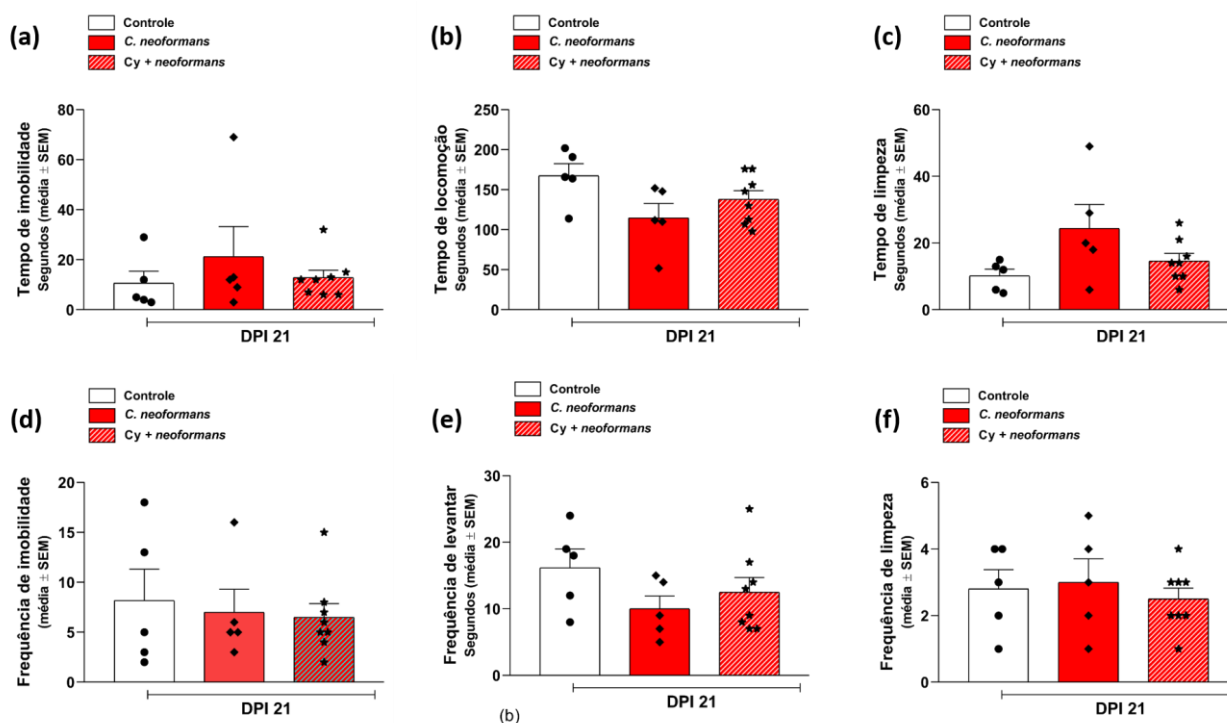


Figura 13. Efeito da criptococose na atividade locomotora dos animais infectados pela cepa *C. neoformans* no DPI21. A atividade locomotora dos animais foi avaliada utilizando o Campo aberto como teste comportamental. Os parâmetros avaliados foram o Tempo de imobilidade (a), Tempo de locomoção (b) Tempo de limpeza (c), Frequência de imobilidade (d), a Frequência de levantar (e) e a Frequência de limpeza (f). Os resultados representam a média \pm SEM das análises semanais do escore de 5-7 animais independentes. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

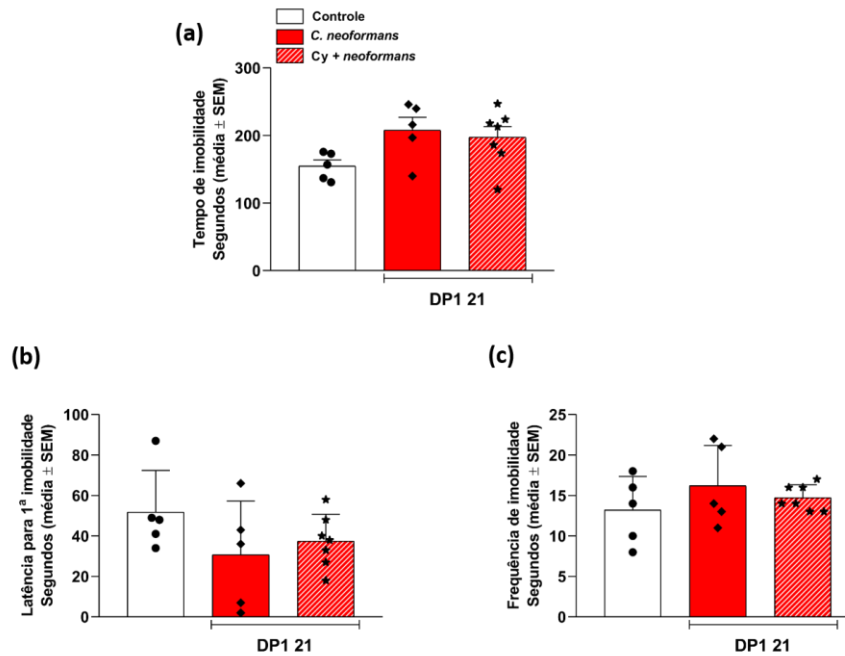


Figura 14. Efeito da criptococose no comportamento tipo doentio dos animais infectados pela cepa *C. neoformans* no DPI21. O comportamento tipo doentio dos animais foi avaliado utilizando a Suspensão pela Cauda como teste comportamental. Os parâmetros avaliados foram o a Tempo de Imobilidade (a), Latência para primeira imobilidade (b) e Frequência de imobilidade (c). Os resultados representam a média \pm SEM das análises semanais do escore de 5-9 animais independentes. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

5.4. Caracterização da concentração circulante de citocinas inflamatórias durante a evolução da criptococose

Sabendo que as citocinas inflamatórias são importantes mediadoras da resposta imune, nesta etapa do projeto, foi determinado a concentração circulante no soro dos camundongos após 7, 14 e 21 pós infecção. Em relação ao DPI 7, quando analisamos a concentração das citocinas inflamatórias, são reveladas diferenças significativas no grupo Cy + *neoformans*, sendo possível detectar aumento na concentração da Il-23 (Fig. 16c) e a diminuição da concentração da Il-12p40 (Fig. 15f), não sendo observadas diferenças significativas para as demais citocinas (Fig. 15a-b; d-e e g-h). Por outro lado, no DPI 14 foi observado tanto a infecção pela cepa *C. gattii* como pela cepa *C. neoformans* reduziu a concentração circulante apenas da Il-23 sem diferença entre os grupos imunocompetente e imunossuprimido (Fig. 16b, c). Adicionalmente, a avaliação das amostras de soro dos animais do período experimental DPI 21, infectados pela cepa *C. neoformans* mostraram que a imunossupressão promoveu apenas redução da concentração circulante da citocina Cxcl1 (Fig. 17a) e aumento da concentração da Il-18 (Fig. 17b).

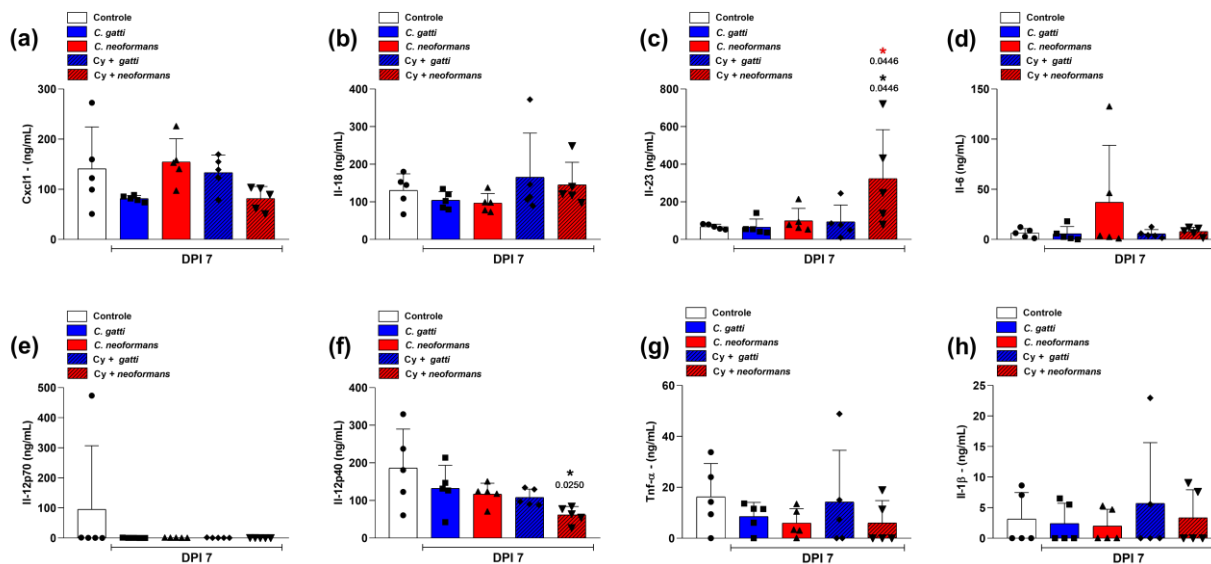


Figura 15. Dosagem das citocinas inflamatórias no soro dos camundongos infectados com *C. gattii* e *C. neoformans* no DPI 7. Gráficos representativos da concentração das citocinas inflamatórias em camundongos infectados pelas cepas criptocócicas após 7 dias de infecção. (a) Cxcl1, (b) Il-18, (c) Il-23, (d) Il-6, (e) Il-12p70, (f) Il-12p40, (g) Tnf- α , (h) Il-1 β . ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

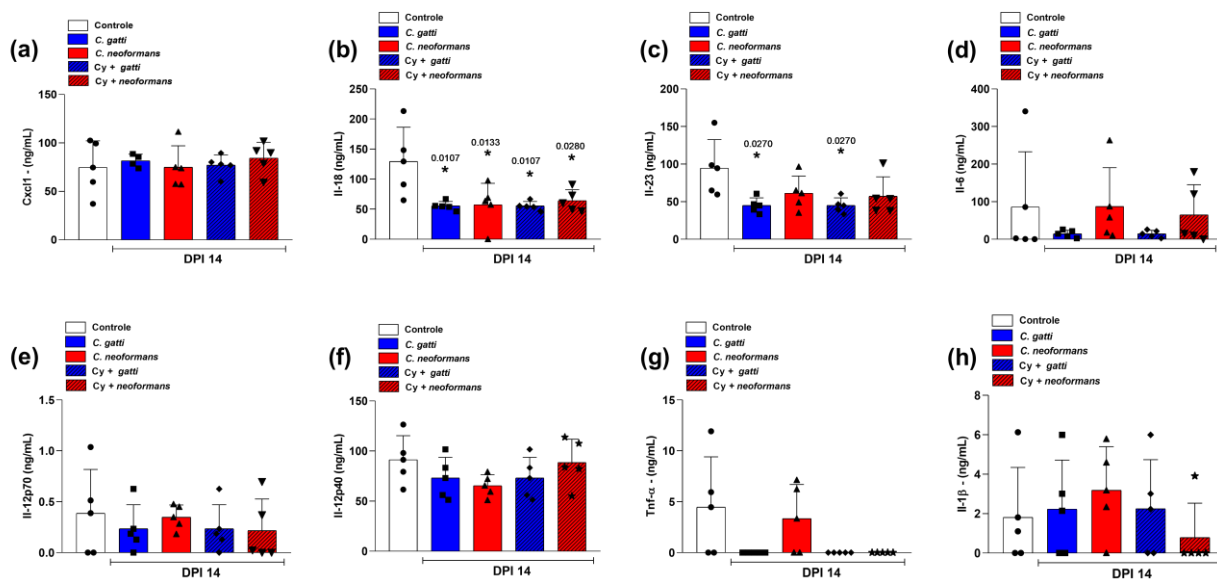


Figura 16. Dosagem das citocinas inflamatórias no soro dos camundongos infectados com *C. gattii* e *C. neoformans* no DPI 14. Gráficos representativos da concentração das citocinas inflamatórias em camundongos infectados pelas cepas criptocócicas após 7 dias de infecção. (a) Cxcl1, (b) IL-18, (c) IL-23, (d) IL-6, (e) IL-12p70, (f) IL-12p40, (g) Tnf- α e (h) IL-1 β . ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

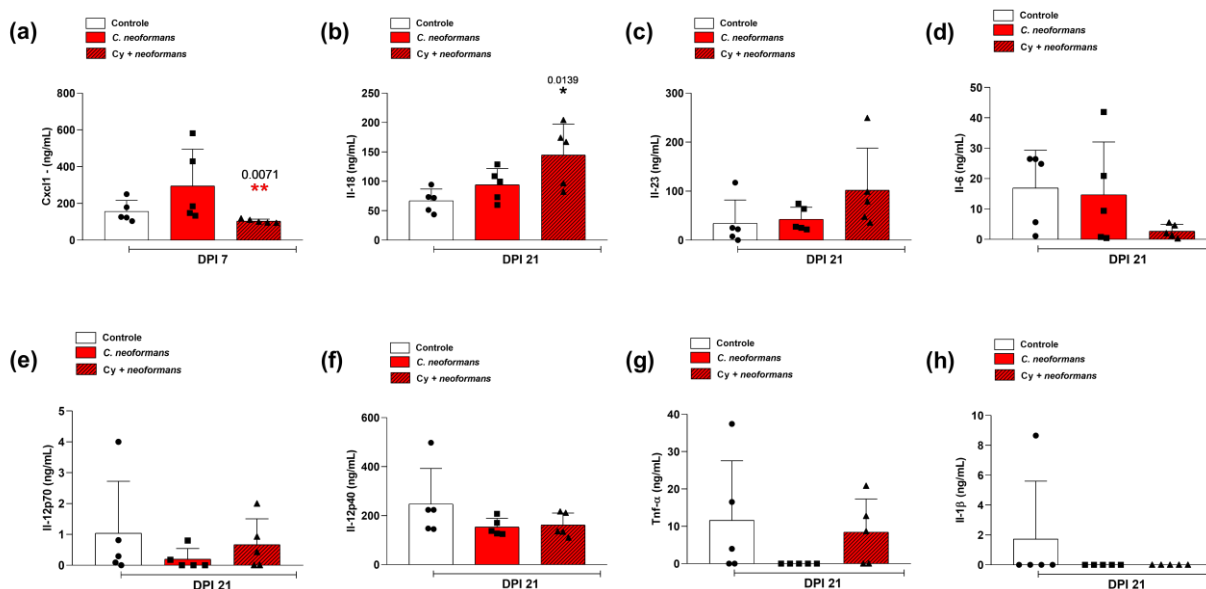


Figura 17. Dosagem das citocinas inflamatórias no soro dos camundongos infectados com a cepa *C. neoformans* no DPI 21. Gráficos representativos da concentração das citocinas inflamatórias em camundongos infectados pelas cepas criptocócicas após 21 dias de infecção. (a) Cxcl1, (b) Il-18, (c) Il-23, (d) Il-6, (e) Il-12p70, (f) Il-12p40, (g) Tnf- α e (h) Il-1 β . ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Como etapa seguinte a astrogliose foi avaliada pela imuno positividade da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no tecido encefálico. Como nossos resultados comportamentais referente ao DPI 21 não revelaram resultados significativos e a análise da concentração circulante das citocinas inflamatórias revelaram diferenças significativas de apenas duas citocinas no grupo imunossuprimido infectado, optamos por avaliar a astrogliose apenas dos períodos DPI 7 e DPI 14. Nossos resultados mostram que a infecção intranasal pelas cepas criptocócicas promoveram a astrogliose do tecido encefálico de forma semelhante entre os animais imunocompetentes e imunossuprimidos nos períodos experimentais DPI 7 (**Fig. 18a, b**) e DPI 14 (**Fig. 18a, c**). Por outro lado, as representações gráficas da comparação dos diferentes grupos com os diferentes períodos experimentais mostram que a astrogliose é tempo dependente (**Fig. 18d**).

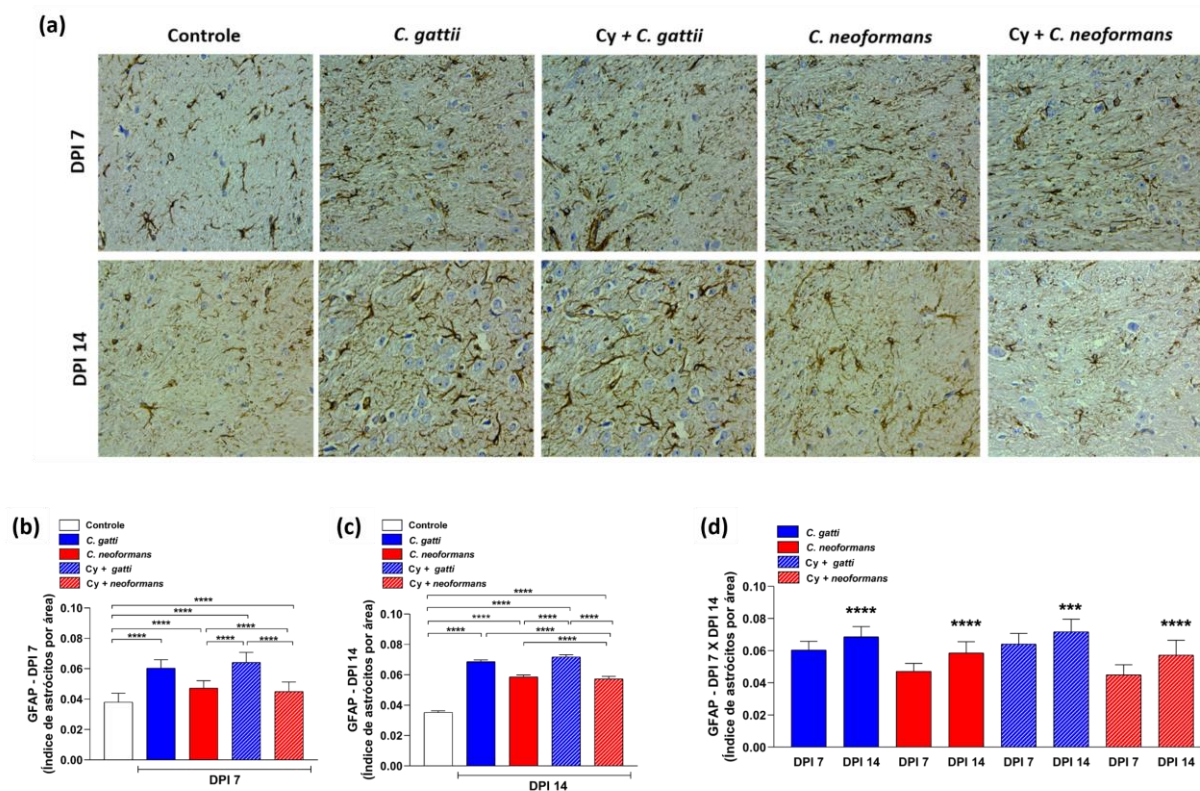


Figura 18. Análise imunohistoquímica do tecido encefálico para determinação da ativação glial em camundongos infectados pela cepa *C. gattii* e *C. neoformans*. (a) Fotomicrografias representativas da imunomarcagem para Gfap de camundongos infectados (50,000 cels fúngicas/animal) pelas cepas criptocócicas após 7 e 14 dias pós infecção. Representação gráfica das análises referentes a imunoreatividade dos animais inoculados do DPI 7 (b) e do DPI 14 (c) e da comparação entre os diferentes períodos experimentais (d). ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

5.5. Impacto da criptococose no controle transcricional dos componentes da via de síntese da tetrahydrobiopterina (BH4).

Sabendo da importância do $\text{Ifn-}\gamma$ nas defesas do hospedeiro contra microrganismos, como etapa seguinte inicialmente comparamos os valores absolutos da expressão de gene *Ifn- γ* entre os tecidos pulmonar e encefálico. Em relação aos valores absolutos, nossos resultados demonstram que ambos os tecidos possuem valores iguais de expressão (Fig. 19a). Ainda em relação a expressão relativa, foi possível constatar que infecção criptocócica modulou do gene *Ifn- γ* apenas no tecido pulmonar, sendo observado regulação negativa de sua expressão nos grupos *C. gattii* e *Cy + gattii* no DPI 7 (Fig. 19b) e regulação positiva de sua expressão no grupo *Cy + gattii* no DPI 14 (Fig. 19c). Para os demais grupos do tecido pulmonar (Fig. 19b, c) e no tecido encefálico (Fig.

19d, e) nenhuma alteração significativa foi observada nos diferentes períodos experimentais avaliados, DPI 7 e DPI 14.

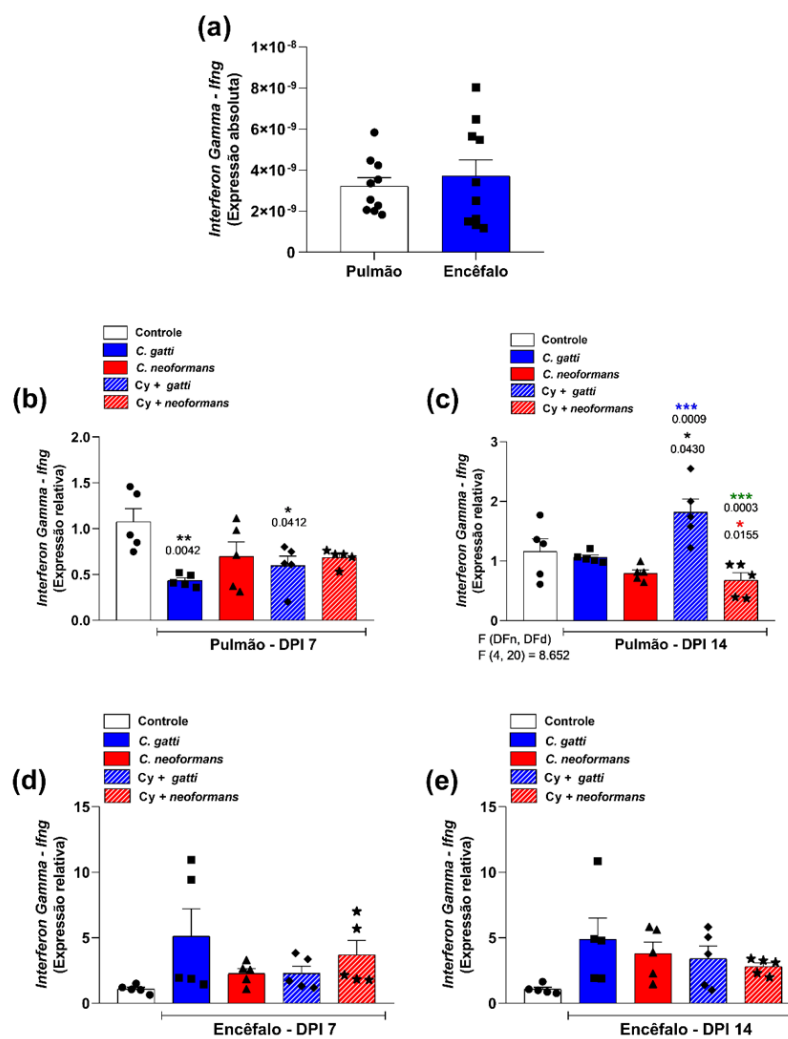


Figura 19. Efeito da infecção criptocócica no controle transcricional do gene *Ifng* nos tecidos pulmonar e encefálico. Após extração de RNA pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional absoluto do gene *Ifng* (a) e o impacto da infecção pelas cepas *C. gattii* e *C. neoformans* em animais imunocompetentes e imunossuprimidos foi avaliado nos tecidos pulmonar e encefálico nos períodos experimentais DPI 7 (b, c) e DPI 14 (d, e) por reações de qPCR. Os genes *Gapdh*, *β -actina* e *18S* foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm SEM 10 animais independentes realizados em duplicata para as análises da expressão absoluta e pela média \pm SEM de 5-7 animais realizados em duplicata para as análises relacionadas a expressão relativa. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ em relação ao grupo Controle; * $p < 0,05$ em relação ao grupo *C. gattii*; *** $p < 0,0001$ em relação ao *C. neoformans* e *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo Cy + *gattii*. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Nesta etapa foram realizadas análises moleculares tendo como objetivo determinar padrão transcricional absoluto dos genes da via de síntese de BH₄ nos tecidos pulmonar e encefálico. Como mostrado na **Fig. 20**, foi possível constatar que ambos os tecidos apresentaram padrão transcricional absoluto iguais para os diferentes genes avaliados, *Gchl* (**Fig. 20a**), *Pts* (**Fig. 20b**), *Spr* (**Fig. 20c**) e *Dhfr* (**Fig. 20d**). Além disso, a comparação entre os valores de expressão absoluta dos 4 genes avaliados no mesmo tecido revelou que *Pts* e *Dhfr* são mais expressos que os genes *Gchl* e *Spr*, não sendo observado diferença significativa entre a expressão do *Pts* versus *Dhfr* e *Gchl* versus *Spr*, em ambos os tecidos avaliados (**Fig. 21**).

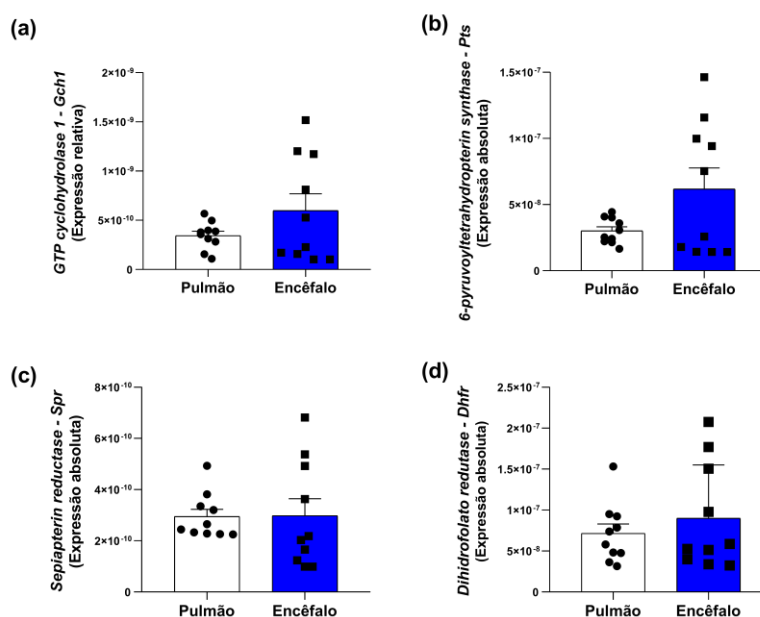


Figura 20. Padrão transcricional absoluto dos membros da via e síntese de BH₄ nos tecidos pulmonar e encefálico. Após extração de RNA pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional absoluto dos genes *Gchl* (a), *Pts* (b), *Spr* (c) e *Dhfr* (d) foi avaliado por reações de qPCR nos diferentes tecidos. Os genes *Gapdh*, *β -actina* e *18S* foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm SEM 10 animais independentes realizados em duplicata. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

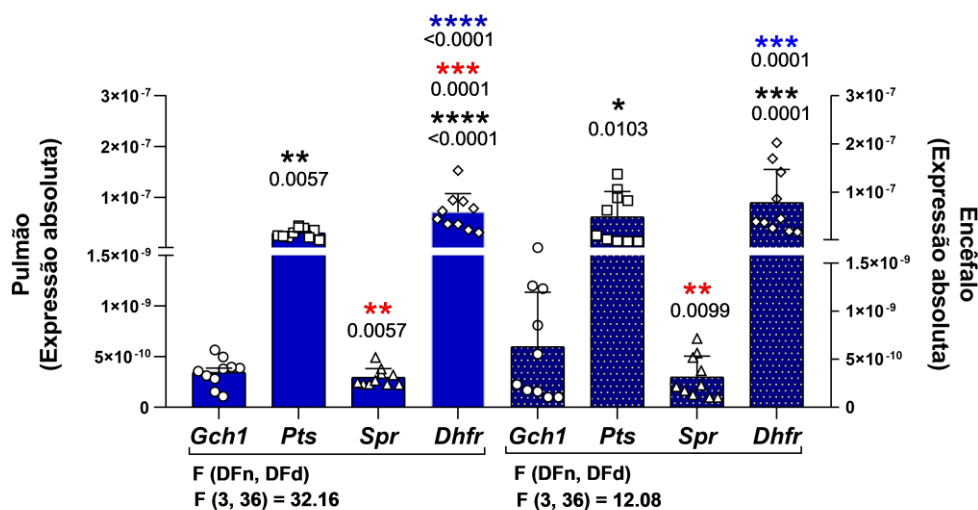


Figura 21. Comparação entre os valores de expressão absoluta dos membros da via de síntese de BH4. Representação gráfica dos valores de expressão gênica absoluta dos genes *Gch1*, *Pts*, *Spr* e *Dhfr* obtidos pela técnica de qPCR nos tecidos pulmonar e encefálico. Os genes *Gapdh*, *β-actina* e *18S* foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm SEM 10 animais independentes realizados em duplicata. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Em sequência, a expressão dos genes relacionados as vias de Síntese de novo; de reciclagem e de salvação da BH4 foram avaliados. No período experimental DPI 7 comportamentos distintos entre o tecido pulmonar e encefálico foi observado. No pulmão foi observado regulação negativa da expressão do gene *Gch1* em todos os grupos (**Fig. 22a**). Já a expressão dos genes *Pts* e *Dhfr* a regulação negativa da expressão também foi observada em todos os grupos, exceto no grupo Cy + *neoformans* que não teve diferença significativa em relação ao Controle (**Fig. 22b, d**) e para o gene *Spr* a redução observada foi apenas no grupo *C. gattii* (**Fig. 22c**).

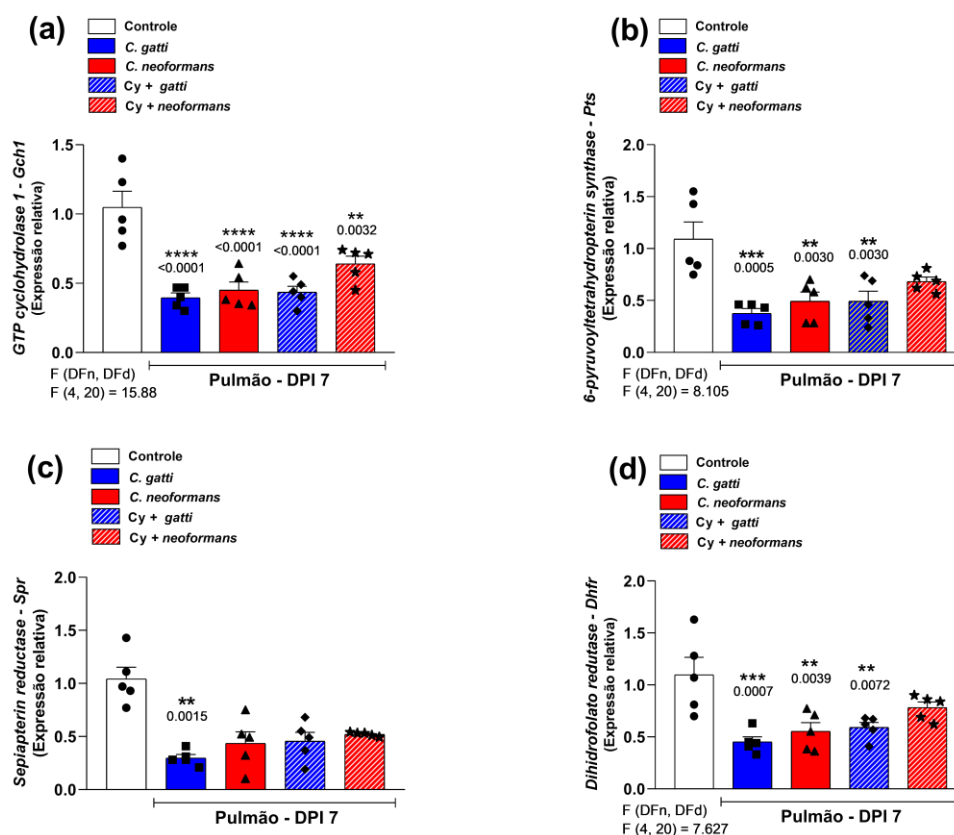


Figura 22. Efeito da infecção criptocócica no controle transcricional dos componentes da via de síntese da BH4 no tecido pulmonar no período experimental DPI 7. Gráficos representativos da expressão relativa dos genes (a) *Gch1*, (b) *Pts*, (c) *Spr* e (d) *Dhfr* no pulmão após 7 dias da infecção pelas cepas *C. gattii* e *C. neoformans*. A expressão relativa foi determinada após extração de RNA pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol por reações de qPCR utilizando os genes *Gapdh*, *β-actina* e *18S* como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm SEM 5 animais independentes realizados em duplicata. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Por outro lado, os resultados obtidos pelas análises no período DPI 7 revelaram que apenas o grupo Cy + *gattii* apresentou diferenças significativas, sendo observado apenas regulação negativa da expressão dos genes *Pts* (Fig. 23b) e *Spr* (Fig. 23c), para os outros dois nenhuma alteração foi observada [Fig. 23a (*Gch1*) e 23d (*Dhfr*)].

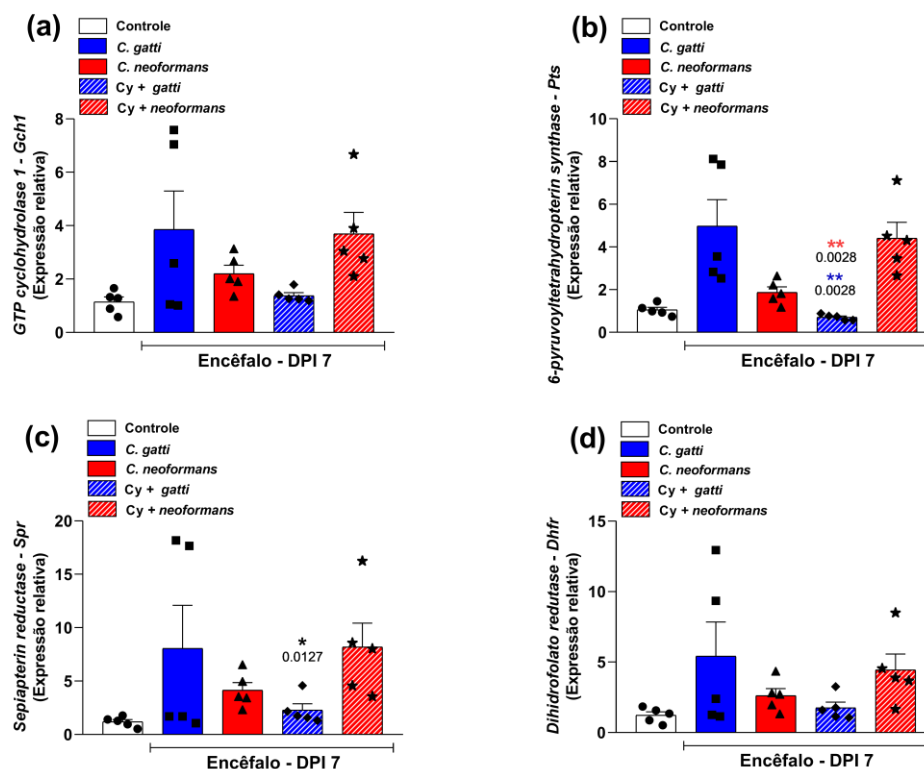


Figura 23. Efeito da infecção criptocócica no controle transcricional dos componentes da via de síntese da BH4 no tecido encefálico no período experimental DPI 7. Gráficos representativos da expressão relativa dos genes (a) *Gch1*, (b) *Pts*, (c) *Spr* e (d) *Dhfr* no encéfalo após 7 dias da infecção pelas cepas *C. gattii* e *C. neoformans*. A expressão relativa foi determinada após extração de RNA pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol por reações de qPCR utilizando os genes *Gapdh*, β -actina e *18S* como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm SEM 5 animais independentes realizados em duplicata. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Diferindo dos resultados apresentados para o tecido pulmonar no DPI 7, os resultados obtidos no período experimental DPI 14 revelaram que a infecção dos animais imunossuprimidos pela cepa *C. gattii* regulou positivamente e a infecção pela cepa *C. neoformans* regulou negativamente a expressão dos genes *Pts* e *Spr* (Fig. 25b e c). Nenhuma outra diferença foi observada no tecido pulmonar (Fig. 24a, d). Adicionalmente, no encéfalo, apenas o grupo dos animais imunocompetentes inoculados pela cepa *C. gattii* regulou positivamente a expressão do gene *Gch1* (Fig. 25a). Cabe ressaltar que todos os demais resultados mostram uma tendência em regular positivamente a expressão, contudo devido a variabilidade intragrupo na resposta, a análise não apontou diferença significativa (Fig. 25b-d).

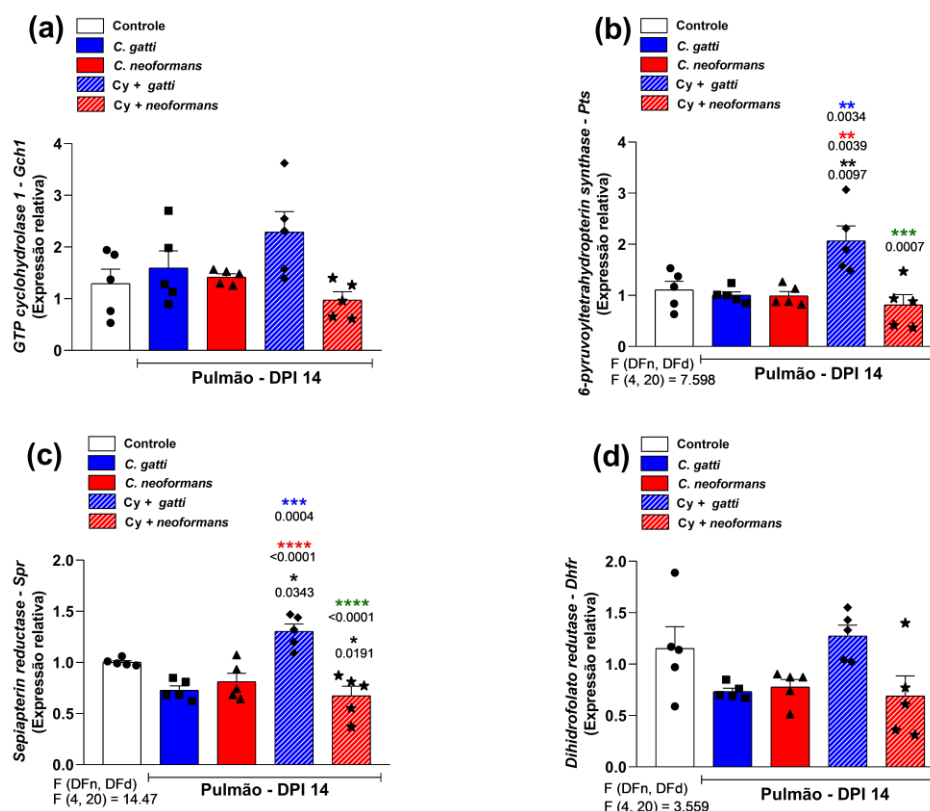


Figura 24. Efeito da infecção criptocócica no controle transcricional dos componentes da via de síntese da BH4 no tecido pulmonar no período experimental DPI 14. Gráficos representativos da expressão relativa dos genes (a) *Gch1*, (b) *Pts*, (c) *Spr* e (d) *Dhfr* no pulmão após 14 dias da infecção pelas cepas *C. gatti* e *C. neoformans*. A expressão relativa foi determinada após extração de RNA pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol por reações de qPCR utilizando os genes *Gapdh*, β -actina e *18S* como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm SEM 5 animais realizados em duplicata. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

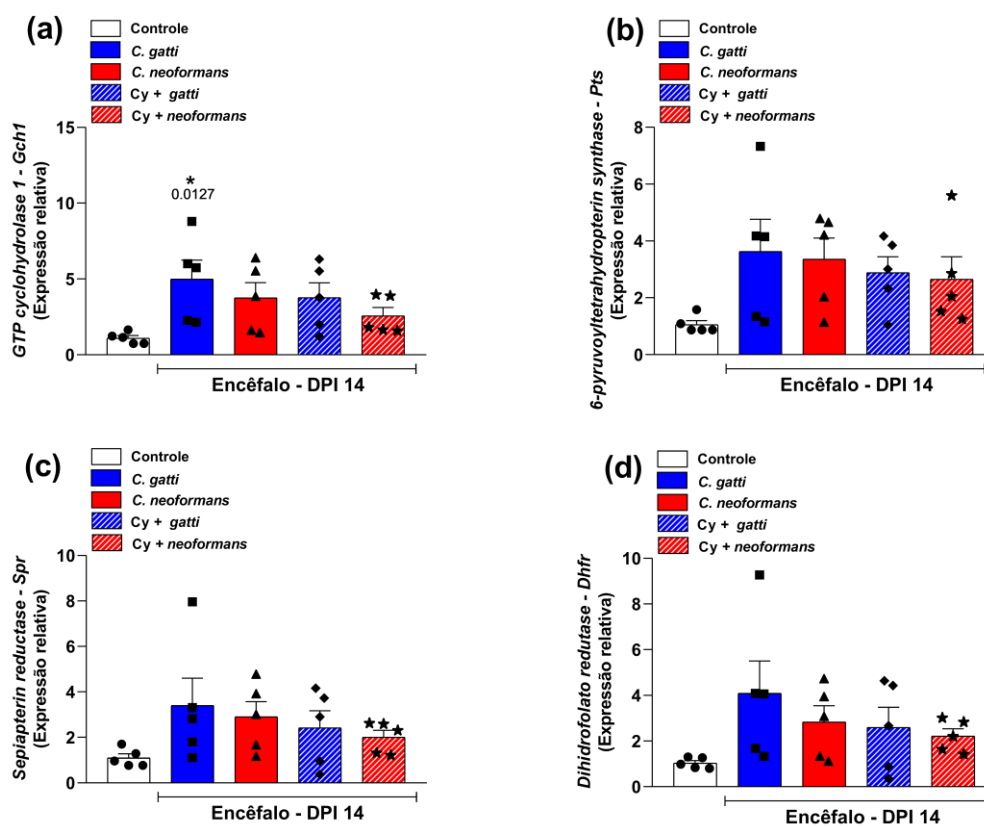


Figura 25. Efeito da infecção criptocócica no controle transcricional dos componentes da via de síntese da BH4 no tecido encefálico no período experimental DPI 14. Gráficos representativos da expressão relativa dos genes (a) *Gch1*, (b) *Pts*, (c) *Spr* e (d) *Dhfr* no encéfalo após 14 dias da infecção pelas cepas *C. gatti* e *C. neoformans*. A expressão relativa foi determinada após extração de RNA pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol por reações de qPCR utilizando os genes *Gapdh*, *β-actina* e *18S* como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média \pm SEM 5 animais independentes realizados em duplicata. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

6. DISCUSSÃO

A criptococose é uma doença fúngica infecciosa que tem sido amplamente estudada devido à sua relevância epidemiológica na saúde pública, especialmente pela alta morbidade e mortalidade associadas a essa infecção invasiva (Kakizaki; Melhem, 2023). A infecção ocorre principalmente pela inalação de propágulos infecciosos, como células de levedura mal encapsuladas ou basidiósporos, provenientes de reservatórios ambientais, levando à deposição e colonização dos alvéolos pulmonares (Kakizaki; Melhem, 2023). Geralmente, a infecção pulmonar primária é assintomática ou apresenta sintomas mínimos (Shao et al., 2005).

Em diversas situações, observa-se o desenvolvimento de uma infecção latente, com leveduras dormentes nos linfonodos torácicos ou na forma de um granuloma pulmonar, que pode permanecer em um indivíduo assintomático por anos (Christianson; Engber; Andes, 2003). Em nosso estudo, avaliamos as variações de peso e as alterações comportamentais relacionadas à evolução da infecção intranasal em animais inoculados com as cepas [JEC21 (*C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo B) e R265 (*C. neoformans* var. *gattii* sorotipo D)] semanalmente, durante períodos de 7, 14 e 21 dias após a infecção, utilizando o protocolo SHIRPA.

O comprometimento do ganho de massa corporal observado nos animais ao longo da evolução da criptococose mostrou estar diretamente relacionado ao tempo de progressão da doença, sem ser severamente afetado pelo estado imunocomprometido dos animais. No entanto, uma observação importante deste estudo foi que a infecção causada pela cepa *C. gattii* se revelou mais virulenta do que a infecção pela cepa *C. neoformans*, o que impediu a permanência dos animais infectados por mais de 14 dias. Esses achados estão em consonância com a literatura e sugerem um comprometimento pulmonar mais acentuado em animais infectados com o *C. gattii*, como evidenciado por Ngamskulrunroj et al. (2012). Eles observaram que a infecção pulmonar provocada pela cepa *C. gattii* pode resultar em um impacto significativo na fisiologia pulmonar (Ngamskulrunroj et al., 2012).

Quando o *Cryptococcus* atinge os pulmões, ele pode interferir nas trocas gasosas, levando à hipoxemia e à diminuição dos níveis de oxigênio no cérebro (Kietzmann et al., 2021). Além disso, a evolução da infecção pulmonar pode agravar o quadro clínico, resultando em perda de apetite e redução de peso (Kronstad et al., 2012). Embora nosso estudo não tenha incluído dados de oximetria ou medições de pH arterial ou venoso, é razoável supor que a diminuição do peso corporal possa ser consequência da destruição da estrutura brônquio-alveolar, conforme

evidenciado pela análise histopatológica do tecido pulmonar. Embora ambas as cepas causem a mesma doença, dados de modelos animais e estudos epidemiológicos indicam que a infecção pela cepa *C. gattii* afeta principalmente os pulmões, enquanto a infecção pela cepa *C. neoformans* geralmente começa nos pulmões e, a partir dessa infecção inicial, pode se espalhar para outros órgãos, frequentemente atingindo o sistema nervoso central. (Ngamskulrunroj et al., 2012) (Normile; Bryan; Del Poeta, 2020). Nesse contexto, os resultados da análise da disseminação da infecção fúngica não se alinham completamente com a literatura existente. Em nosso estudo, observamos crescimento de colônias fúngicas em todos os órgãos analisados, sem evidências de que a cepa *C. gattii* tivesse preferência pelo pulmão ou que a cepa *C. neoformans* se concentrasse no encéfalo. No entanto, as análises histopatológicas confirmaram a presença do microrganismo no tecido pulmonar dos animais infectados pela cepa *C. gattii*.

Um ponto que merece destaque é que em nosso estudo não foi observada a preferência do patógeno *C. gattii* por indivíduos imunocompetentes, nem do *C. neoformans* por indivíduos imunossuprimidos, como demonstrado por VOELZ et al., 2010. Esses aspectos devem ser melhor investigados em estudos futuros, pois há relatos na literatura indicando que em indivíduos imunossuprimidos, a infecção fúngica pode se estabelecer e se espalhar pela corrente sanguínea, agravando a evolução da doença (Howard-Jones et al., 2022; Chang et al., 2015; Pavlov et al., 2004), algo que não conseguimos observar em nossos resultados.

Pesquisas anteriores sugerem que a quantidade do inóculo, a condição do hospedeiro e o tipo de cepa podem influenciar a gravidade da doença e aumentar a morbidade (Mariarz et al., 2016; Rohatgi et al., 2015). Portanto, para verificar se a condição do hospedeiro e/ou o tipo de cepa poderiam levar a uma sintomatologia mais severa, os animais foram monitorados ao longo de todo o período de evolução da infecção, por meio de testes comportamentais e neurológicos que avaliaram as funções motoras, sensoriais e neurológicas. Entre todos os parâmetros avaliados, a geotaxia negativa por *tail suspension* (comportamento motor) e a fotofobia (estado neuropsiquiátrico) foram os comportamentos que mais chamaram nossa atenção, já que a atividade geral dos animais não pôde ser confirmada pelo protocolo SHIRPA e apesar das diferenças fisiológicas entre animais e humanos, o SHIRPA pode oferecer insights sobre algumas funções neurológicas e comportamentais, ajudando a compreender melhor as condições que afetam o sistema nervoso. Este protocolo é uma ferramenta quantitativa baseada em escores, o que torna a

análise dependente do examinador, mas fornece uma estrutura para uma avaliação fenotípica geral que é adequada para uma ampla gama de aplicações (Rogers et al., 1997).

Nos nossos resultados, observamos uma piora inicial nos testes comportamentais relacionados à atividade geral dos animais, seguida por uma melhora subsequente. No entanto, com base na análise conjunta do bloco de resultados obtidos pela aplicação do protocolo SHIRPA, podemos hipotetizar que a suspensão pela cauda pode ter contribuído para a perda de peso corporal, uma vez que pode ter influenciado o desenvolvimento motor e/ou a função e atividade vestibular, resultando em uma menor ingestão alimentar. Um fato semelhante já foi demonstrado por Ruhela et al. (2019), que relacionaram a perda de peso corporal dos animais com a redução nas atividades que exigiam motricidade, como a suspensão pela cauda e a força motora (Ruhela et al., 2019).

Entre os órgãos que podem ser afetados pelos fungos do gênero *Cryptococcus* em estágios avançados da infecção disseminada, o SNC é o mais comum, levando à meningite criptocócica e podendo resultar na forma neurológica avançada, conhecida como Neurocriptococose. Assim como na doença pulmonar, que pode se manifestar inicialmente com sintomas inespecíficos, como febre, calafrios, tosse, mal-estar, suores noturnos, dispneia, perda de peso e hemoptise, no SNC também surgem sintomas insidiosos e não específicos, como dores de cabeça, febres e/ou alterações no estado mental. A meningoencefalite é a forma clínica mais frequentemente diagnosticada, ocorrendo em mais de 80% dos casos, seja de forma isolada ou associada ao comprometimento pulmonar (Gushiken; Saharia; Baddley, 2021). Não foi evidenciada a presença dos microrganismos na análise histológica nos diferentes períodos avaliados. Contudo, nossos resultados mostram que tanto os animais imunocompetentes como os imunossuprimidos infectados por ambas as cepas apresentaram comportamento tipo doentio e depressivo.

Tendo em vista o fato de que a presença dos microrganismos não foram confirmadas pelas análises histológicas e que os comportamento doentio e tipo ansioso foram confirmados em nosso estudo, acreditamos que as alterações comportamentais estejam relacionadas ao quadro de neuroinflamação, a qual pode ser confirmada pela ativação glial do tecido encefálico dos animais infectados, uma vez que existem estudos que demonstraram que a ativação microglial decorrentes de uma inflamação sistêmica podem levar ao estado de neuroinflamação, a qual pode afetar o comportamento dos indivíduos (Fung et. al., 2017; Yirmiya *et. al.*, 2015). Há relatos de que tanto as agressões ao SNC causadas por traumas quanto por infecções sistêmicas podem levar à astrogliose, que pode impactar seu funcionamento. É importante destacar que a elevação glial,

evidenciada pela maior reatividade da marcação para GFAP nos grupos infectados, pode estar diretamente relacionada às lesões e ao quadro inflamatório resultantes da disseminação do microrganismo pelo SNC (Kim et al., 2018). Além disso, há evidências de que os imunossupressores podem aumentar o risco de infecções ao afetarem o sistema imunológico. Isso se relaciona aos seus alvos, como citocinas, mediadores imuno solúveis, receptores de membranas celulares, entre outros (Valdoleiros et al., 2015).

Nesse sentido, destacamos que nossos resultados sobre a determinação dos níveis de citocinas circulantes nos períodos pós-infecção (7, 14 e 21 dias) mostram um padrão de resposta diferente entre as cepas, assim como em relação ao estado imunológico. O estado de infecção aguda (DPI 7) foi caracterizado pela redução na concentração de IL-12p40 e pelo aumento da concentração de IL-23, observados apenas nos animais imunossuprimidos infectados pela cepa *C. neoformans*. Estudos têm associado a diminuição dessa citocina ao comprometimento da capacidade de resposta do sistema imunológico (Stark et al., 2005). Além disso, um estudo realizado por Bessler et al. (2001) demonstrou que a inibição da secreção de IL-12p40 causada pela dexametasona contribuiu para o aumento da ocorrência de infecções fúngicas (Bessler et al., 2001). Também foi mostrado que camundongos que tiveram a ablação de IL-12p40 apresentaram expressão aumentada de TGF- β e IL-10, além de respostas inflamatórias reduzidas (Shrivastava et al., 2016). Embora a IL-23 e a IL-17 tenham sido ligadas ao desenvolvimento de inflamação autoimune inadequada, estudos mostram que a interação dessas duas citocinas oferece uma proteção maior aos pulmões em modelos de infecção fúngica. A IL-17 é um forte recrutador de neutrófilos para os pulmões, enquanto a IL-23 desempenha um papel na regulação da homeostase desses neutrófilos (Stark et al., 2005). Portanto, acreditamos que o aumento observado na concentração circulante de IL-23 esteja associado a uma proteção mais eficaz contra a infecção fúngica durante a fase aguda da infecção pela cepa *C. neoformans*.

No período experimental DPI 14, é possível notar um cenário de adaptação ao patógeno, evidenciado pela diminuição das concentrações circulantes de IL-23 e IL-18 nos animais infectados pela cepa *C. gattii*, enquanto nos infectados pela cepa *C. neoformans*, houve apenas a redução da concentração de IL-18. Essa diminuição nas citocinas IL-23 e IL-18 indica uma queda na resposta inflamatória inata e adaptativa, sugerindo que o sistema imunológico está menos ativo, o que pode favorecer a colonização dos tecidos e facilitar a sobrevivência do fungo (Kawakami et al., 1997). Além disso, um estudo mostrou o efeito protetor da resposta inflamatória mediada por IL-18 em um

modelo de infecção fúngica pelo *P. brasiliensis* (Ketelut-Carneiro et al., 2015). Ainda em relação à infecção pela cepa *C. neoformans*, no DPI 21, observamos uma redução na concentração circulante da citocina Cxcl1 e um aumento na concentração da Il-18 apenas nos animais imunossuprimidos. Isto nos faz acreditarmos que essa possível reativação da Il-18 possa ser uma tentativa tardia de controlar o crescimento e a disseminação do patógeno, considerando que a concentração do ligante de quimiocina Cxcl1, que desempenha um papel protetor na infecção fúngica ao recrutar neutrófilos, foi reduzida. O TRAF1 (fator 1 associado ao fator de necrose tumoral) (Bai et al., 2020) também apresentou diminuição.

Embora a ação protetora da Il-18, em conjunto com o IFN-gama, tenha sido demonstrada por Kawakami *et al.* (1997), que mostrou que o tratamento com Il-18 aumentou os níveis séricos de IFN-gama, fundamental na defesa do hospedeiro contra a infecção criptocócica (Kawakami et al., 1997), ainda existem muitas lacunas sem respostas.

Para esclarecer melhor o papel do IFN-gama na evolução da infecção criptocócica, começamos caracterizando o perfil de expressão absoluta do gene *Ifn- γ* nos tecidos pulmonar e encefálico, que não apresentou diferenças significativas entre os dois. Em seguida, considerando que ambos os tecidos tinham a mesma quantidade de transcritos, avaliamos o impacto da infecção por diferentes cepas ao longo do tempo.

As variações foram notadas apenas no tecido pulmonar, especialmente nos animais infectados pela cepa *C. gattii*. Acreditamos que a diminuição da expressão observada no DPI 7 pode ser uma estratégia do fungo para suprimir a resposta imunológica do tecido pulmonar, uma vez que altos níveis de IFN- γ são produzidos no pulmão durante a resposta imune adaptativa relacionada à eliminação fúngica (Wang et al., 2023). Por outro lado, o aumento observado apenas nos animais imunossuprimidos no DPI 14 pode indicar uma tentativa do organismo de controlar a infecção fúngica por meio da ativação da resposta imune adaptativa. Ainda, tanto a IL-1 β , o TNF- α como o a IFN- γ regular transcricionalmente a enzima GTPCH, a qual é limitante da síntese de BH4 pela via de novo, um importante cofator enzimático regulador para as vias bioquímicas da catecolamina, indoleamina e óxido nítrico sintase (Crabtree; Channon, 2011).

No pulmão a biodisponibilidade do BH4 é um determinante importante da resposta vascular pulmonar, principalmente em resposta à hipóxia. Por outro lado, no encéfalo, o BH4 é um cofator essencial para reações enzimáticas importantes, incluindo a síntese de neurotransmissores como dopamina e serotonina, estando sua biodisponibilidade diretamente relacionada a produção de

NOs, como também por suas propriedades antioxidantes (Francis; Wilkins; Zhao, 2010). A caracterização do perfil transcricional absoluto dos genes relacionados à síntese de BH4 (como *Gchl*, *Spr*, *Pts*, *Dhfr*) nos tecidos pulmonar e encefálico não revelou diferenças relevantes entre a quantidade de transcritos entre os tecidos. Entretanto, foi possível observar que dos 4 genes avaliados, *Pts* e o *Dhfr* foram os genes que apresentaram maior expressão em ambos os tecidos, permitindo a hipótese de que tanto a via de novo, caracterizada pela enzima *Pts*, como a via de salvação, pelo *Dhfr* podem ser priorizadas. Esse fato pode ser importante para os tecidos pulmonar e encefálico, uma vez que mudanças na produção de BH4 podem impactar a síntese de NO, que é essencial para a função dos macrófagos e a defesa contra infecções. Isso poderia, teoricamente, afetar a resposta imunológica a infecções fúngicas como o *Cryptococcus* (Werner et al., 1990).

É importante ressaltar que a análise dos dados do período experimental DPI 7 mostrou que a infecção criptocócica, tanto em animais imunocompetentes quanto em imunossuprimidos, afetou a síntese de BH4, tanto pelas vias de novo quanto pelas vias de salvação e reciclagem, mas apenas no tecido pulmonar. Essa observação é significativa, pois o BH4 é um cofator essencial para diversos processos fisiológicos, incluindo a ativação da resposta imune e a produção de NO (Eichwald et al., 2023). A inibição de sua síntese pode criar um ambiente propício para a infecção fúngica, uma vez que já foi demonstrado que a diminuição da expressão dos genes *Gchl* e *Spr* sugere que a síntese de BH4 pode estar comprometida. Isso indica a progressão da infecção ao longo de 7 dias e o agravamento do quadro após 14 dias (Werner et al., 1990).

Por outro lado, no tecido encefálico, apenas a expressão dos genes *Pts* e *Sr* apresentou uma diminuição nos animais imunossuprimidos infectados pela cepa *C. gattii*. É importante notar que a redução na expressão do gene *Pts* pode comprometer a produção de BH4, resultando em uma menor disponibilidade de NO e, conseqüentemente, em uma resposta imunológica menos eficaz (Fanet et al., 2021). Diferentemente do que foi observado no DPI 7, no DPI 14, a expressão dos genes *Pts* e *Sr*, que anteriormente estava diminuída, agora se mostrou superexpressa. Os níveis elevados de transcrição dos genes *Pts* e *Dhfr* podem indicar uma tentativa do organismo de compensar a baixa atividade de outras enzimas da via (Eichwald et al., 2023). Assim, tanto a superexpressão quanto a subexpressão de qualquer um desses genes pode desestabilizar a via, levando potencialmente à produção insuficiente ou desequilibrada de moléculas importantes como a BH4. Portanto, o cenário ideal geralmente envolve uma expressão coordenada desses genes, em vez de uma regulação excessiva de um ou mais genes (Eichwald et al., 2023).

7. CONSTATAÇÕES

A análise conjunta dos resultados nos permitiu constatar que:

- 1) Que o comportamento doentio e a ativação glial foram os únicos parâmetros que responderam de forma tempo-dependente;
- 2) Que a disseminação fúngica apenas pela técnica de identificação clássica técnica, sendo a presença dos microorganismos confirmada pela análise histológica apenas nos tecidos pulmonares. Fato este que evidenciou a capacidade invasiva do patógeno, principalmente em animais imunossuprimidos. Esses achados destacam a importância de abordagens que integrem análises comportamentais, bioquímicas e moleculares para melhor elucidar as interações entre patógeno e seu hospedeiro durante a evolução da criptococose.
- 3) Que as alterações comportamentais e a ativação glial está diretamente relacionado ao tempo de infecção e não ao estado imunológico e/ou ao tipo de cepa utilizado.
- 4) Que a infecção modulou de forma distinta a expressão dos genes da via de síntese de BH4 nos tecidos pulmonar e encefálico, não sendo impactados pelo estado imunológico no DPI 7, sendo o tecido pulmonar mais sensível a infecção no DPI 14. Nossos achados apontam como a desregulação da via da BH4 pode levar a efeitos paradoxais: enquanto níveis adequados de BH4 favorecem a produção de NO e o controle do patógeno, um aumento excessivo pode intensificar o estresse oxidativo e o processo inflamatório, piorando os danos nos tecidos pulmonares e comprometendo o equilíbrio imunológico. Essas descobertas podem contribuir como um marco molecular para futuras estratégias terapêuticas.
- 5) Do ponto de vista clínico, os resultados sugerem que a BH4 pode ser um biomarcador e alvo terapêutico promissor para intervenções em infecções fúngicas graves, como a criptococose. O estudo contribui para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares da doença, fornecendo informações valiosas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e

diagnósticas, com potencial para impactar significativamente o manejo de pacientes, especialmente em contextos de imunossupressão.

8. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a evolução da criptococose está diretamente relacionado ao comportamento doentio e gliose, além de modular genes-chave da via de síntese da BH4 de forma distinta entre os tecidos pulmonar e encefálico.

9. REFERÊNCIAS

ABASSI, M.; BOULWARE, D. R.; RHEIN, J. Cryptococcal Meningitis: Diagnosis and Management Update. *Current Tropical Medicine Reports*, v. 2, n. 2, p. 90-99, 2015. doi: 10.1007/s40475-015-0046-y.

ALANIO, A.; DESNOS-OLLIVIER, M.; DROMER, F. Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-macrophage interactions reveal that fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in humans. *mBio*, v. 2, n. 4, p. e00158-11, 2011. doi: 10.1128/mBio.00158-11.

AZUMAGAWA, K.; et al. Neopterin, biopterin, and nitric oxide concentrations in the cerebrospinal fluid of children with central nervous system infections. *Brain & Development*, v. 25, n. 3, p. 200-202, 2003. doi: 10.1016/s0387-7604(02)00217-6.

BLAU, N.; SCHOEDON, G.; CURTIUS, H. C. Biosynthesis and significance of neopterin in the immune system. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*, v. 25, n. 4, p. 603-605, 1989. doi: 10.1016/0277-5379(89)90192-2.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso*. 8ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bolso.pdf. Acesso em: 1 nov. 2024.

CARRIJO, A. V.; et al. Análise clínico-epidemiológica de criptococose em indivíduos com HIV: uma revisão sistemática. *Brazilian Applied Science Review*, v. 5, n. 2, p. 802-817, 2021. doi: 10.34115/basrv5n2-014.

CASAS-ALBA, D.; et al. Cerebrospinal Fluid Neopterin in Children With Enterovirus-Related Brainstem Encephalitis. *Pediatric Neurology*, v. 96, p. 70-73, 2019. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.01.024.

CASTAGNÉ, Vincent et al. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current protocols in pharmacology*, v. 49, n. 1, p. 5.8. 1-5.8. 14, 2010.

CHANG, C. C.; SORRELL, T. C.; CHEN, S. C. Pulmonary Cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med*, v. 36, n. 5, p. 681-691, 2015. doi: 10.1055/s-0035-1562895.

CHEN, S. C.-A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. Cryptococcus gattii infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 4, p. 980-1024, 2014. doi: 10.1128/CMR.00126-13.

CHRISTIANSON, J. C.; ENGBER, W.; ANDES, D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Medical Mycology*, v. 41, n. 3, p. 177-188, 2003. doi: 10.1080/1369378031000137224.

DALE, R. C.; et al. Cerebrospinal fluid neopterin in paediatric neurology: a marker of active central nervous system inflammation. *Developmental Medicine and Child Neurology*, v. 51, n. 4, p. 317-323, 2009. doi: 10.1111/j.1469-8749.2008.03225. x.

DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten challenges on Cryptococcus and cryptococcosis. *Mycopathologia*, v. 173, n. 5-6, p. 303-310, 2012. doi: 10.1007/s11046-011-9473-z.

DOSSA, P. D.; VIEBIG, L. B.; CARDOSO, C. V.; KIRSTEN, T. B.; BONDAN, E. Maropitant potentiates sickness behavior and reverses astrogliosis induced by LPS. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 4, 2019. doi: 10.1016/j.bbi.2019.08.021.

EICHWALD, T.; da SILVA, L. D. B.; STAATS PIRES, A. C.; NIERO, L.; SCHNORRENBERGER, E.; FILHO, C. C.; LATINI, A. Tetrahydrobiopterin: Beyond its traditional role as a cofactor. *Antioxidants*, v. 12, n. 5, p. 1037, 2023.

FANET, H.; et al. Tetrahydrobiopterin (BH4) Pathway: From Metabolism to Neuropsychiatry. *Current Neuropharmacology*, v. 19, n. 5, p. 591-609, 2021. doi: 10.2174/1570159X18666200729103529.

FEDER, V.; et al. Cryptococcus gattii urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. *The FEBS Journal*, v. 282, n. 8, p. 1406-1418, 2015. doi: 10.1111/febs.13229.

FENG, Y.; FENG, Y.; GU, L.; MO, W.; WANG, X.; SONG, B.; HONG, M.; GENG, F.; HUANG, P.; YANG, H.; ZHU, W.; JIAO, Y.; ZHANG, Q.; DING, W. Q.; CAO, J.; ZHANG, S. Tetrahydrobiopterin metabolism attenuates ROS generation and radiosensitivity through LDHA S-

nitrosylation: novel insight into radiogenic lung injury. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 56, n. 5, p. 1107-1122, maio 2024. DOI: 10.1038/s12276-024-01208-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01208-z>. Acesso em: 01 dez. 2024. PMCID: PMC11148139.

FISHER, K. M.; et al. Cryptococcal meningitis: a review for emergency clinicians. *Internal and Emergency Medicine*, v. 16, n. 4, p. 1031-1042, 2021. doi: 10.1007/s11739-020-02619-2.

FUNG, T.; OLSON, C.; HSIAO, E. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci*, p. 145-155, 2017. doi: 10.1038/nn.4476.

GHISONI, K.; et al. Neopterin as a potential cytoprotective brain molecule. *Journal of Psychiatric Research*, v. 71, p. 134-139, 2015. doi: 10.1016/j.jpsychires.2015.10.003.

HAILEMICHAEL, W.; et al. Neopterin: A Promising Candidate Biomarker for Severe COVID-19. *Journal of Inflammation Research*, v. 14, p. 245-251, 2021. doi: 10.2147/JIR.S290264.

HOWARD-JONES, A. R.; SPARKS, R.; PHAM, D.; HALLIDAY, C.; BEARDSLEY, J.; CHEN, S. C.-A. Pulmonary Cryptococcosis. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 11, p. 1156, 2022. doi: 10.3390/jof8111156.

KAUFMAN, S. The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 50, n. 6, p. 1085-1093, 1963. doi: 10.1073/pnas.50.6.1085.

KIM, R.; HEALEY, K. L.; SEPULVEDA-ORENGO, M. T.; REISSNER, K. J. Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: From astrocytopathy to astrogliosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 87, pt. A, p. 126-146, 2018. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.10.002.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 47, n. 4, p. 203-207, 2005. doi: 10.1590/s0036-46652005000400005.

Lallo, M. A.; Hirschfeld, M. P. M. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. *Experimental parasitology*, v. 131, n. 3, p. 339-343, 2012. doi: 10.1016/j.exppara.2012.04.019.

LEITNER, K. L.; et al. Low tetrahydrobiopterin biosynthetic capacity of human monocytes is caused by exon skipping in 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *The Biochemical Journal*, v. 373, pt. 3, p. 681-688, 2003. doi: 10.1042/BJ20030269.

LIMA, R. L. A. Caracterização das alterações comportamentais promovidas pela evolução da neurocriptococose e sua correlação com a expressão encefálica do gene Gals-3. *In thesis*, 2024.

MUKAREMERA, L.; MCDONALD, T. R.; NIELSEN, J. N.; MOLENAAR, C. J.; AKAMPURIRA, A.; SCHUTZ, C.; TASEERA, K.; MUZOORA, C.; MEINTJES, G.; MEYA, D. B.; BOULWARE, D. R.; NIELSEN, K. The Mouse Inhalation Model of *Cryptococcus neoformans* Infection Recapitulates Strain Virulence in Humans and Shows that Closely Related Strains Can Possess Differential Virulence. *Infect Immun*, v. 87, n. 5, p. e00046-19, 2019. doi: 10.1128/IAI.00046-19.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG, Y.; SIONOV, E.; KWON-CHUNG, K. J. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *mBio*, v. 3, n. 3, p. e00103-12, 2012. doi: 10.1128/mBio.00103-12.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. *Cell Mol Life Sci*, v. 61, n. 18, p. 2322-2331, 2004. doi: 10.1007/s00018-004-4102-3.

PRAT, C.; et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *The Journal of Infection*, v. 52, n. 3, p. 169-177, 2006. doi: 10.1016/j.jinf.2005.05.019.

REIS-SILVA, Thiago M. et al. Stress resilience evidenced by grooming behaviour and dopamine levels in male mice selected for high and low immobility using the tail suspension test. *European Journal of Neuroscience*, v. 50, n. 6, p. 2942-2954, 2019.

ROBERTSON, E. J.; NAJJUKA, G.; ROLFES, M. A.; AKAMPURIRA, A.; JAIN, N.; ANANTHARANJIT, J.; VON HOHENBERG, M.; TASSIERI, M.; CARLSSON, A.; MEYA, D. B.; HARRISON, T. S.; FRIES, B. C.; BOULWARE, D. R.; BICANIC, T. *Cryptococcus neoformans* ex vivo capsule size is associated with intracranial pressure and host immune response in HIV-associated cryptococcal meningitis. *J Infect Dis*, v. 209, p. 74-82, 2014. doi: 10.1093/infdis/jit435.

RODRIGUES, D. H.; VILELA, M. C.; LACERDA-QUEIROZ, N.; MIRANDA, A. S.; SOUSA, L. F.; REIS, H. J.; TEIXEIRA, A. L. Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 69, n. 6, p. 938-942, 2011. doi: 10.1590/s0004-282x2011000700018.

RUHELA, R. K.; SONI, S.; SARMA, P.; PRAKASH, A.; MEDHI, B. Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Ann Neurosci*, v. 26, n. 1, p. 25-31, 2019. doi: 10.5214/ans.0972.7531.260106.

SURYAPRASAD, A.; STONE, J. H. When is it safe to stop *Pneumocystis jiroveci* pneumonia prophylaxis? Insights from three cases complicating autoimmune diseases. *Arthritis Rheum*, v. 59, p. 1034-1039, 2008.

VALDOLEIROS, S. R.; FURTADO, I.; SILVA, C.; GONÇALVES, I. C.; SANTOS-SILVA, A.; VASCONCELOS, O.; HORTA, A. A.; VASCONCELOS, A. L.; XARÁ, S.; GONÇALVES, M. J.; ABREU, M. A.; SARMENTO-CASTRO, R. Prevenção e tratamento de infecções na terapêutica de doenças autoimunes. *Acta Med Port*, v. 34, n. 6, p. 469-483, 2021.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryot Cell*, v. 9, n. 6, p. 835-846, 2010. doi: 10.1128/EC.00039-10.

WANG, H.; ZHANG, C.; CHEN, H.; GU, Z.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Q.; CHEN, W. Tetrahydrobiopterin plays a functionally significant role in lipogenesis in the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 250, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00250.

YIRMIYA, R.; RIMMERMAN, N.; RESHEF, R. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci*, v. 38, n. 10, p. 637-658, 2015. doi: 10.1016/j.tins.2015.08.001.

ZAVALA, S.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 41, n. 1, p. 69-79, 2020. doi: 10.1055/s-0039-3400280.

ANEXO



Universidade Paulista

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel prognóstico da concentração de neopterin em fluidos biológicos na evolução da Criptococose", protocolada sob o CEUA nº 7694091222 (ID 000909), sob a responsabilidade de **Rodrigo Augusto da Silva e equipe; Alex de Camargo Coque** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 08/02/2023.

We certify that the proposal "Prognostic role of neopterin concentration in biological fluids in the evolution of Cryptococcosis", utilizing 112 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 7694091222 (ID 000909), under the responsibility of **Rodrigo Augusto da Silva and team; Alex de Camargo Coque** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 02/08/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2023 a 12/2025 Área: Patologia Ambiental E Experimental

Origem: Animais provenientes de estabelecimentos comerciais

Espécie: Camundongos isogênicos sexo: Machos e Fêmeas idade: 2 a 4 semanas Quantidade: 112

Linhagem: C57BL/6 Peso: 20 a 30 g

São Paulo, 04 de abril de 2023

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

