



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PAULA CESAR LEONELLO

**AVALIAÇÃO DA FUNGEMIA, RESPOSTA IMUNE  
CELULAR/HUMORAL E CITOCINAS NA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS COM ISOLADO  
CLÍNICO *Candida parapsilosis* (Cp 1)**

PAULA CESAR LEONELLO

**AVALIAÇÃO DA FUNGEMIA, RESPOSTA IMUNE  
CELULAR/HUMORAL E CITOCINAS NA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS COM ISOLADO  
CLÍNICO *Candida parapsilosis* (Cp 1)**

Dissertação apresentada ao Programa de Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano.

Londrina  
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

L583a Leonello, Paula Cesar.

Avaliação da fungemia, resposta imune celular/humoral e citocinas na infecção experimental de camundongos com isolado clínico *Candida parapsilosis* (Cp 1) / Paula Cesar Leonello. – Londrina, 2010.  
48 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Citocinas – Teses. 2. Resposta imune – Teses. 3. *Candida parapsilosis* – Teses. 4. Fungos patogênicos – Teses. 5. Teste imunoenzimático – Teses.  
I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616.993

PAULA CESAR LEONELLO

**AVALIAÇÃO DA FUNGEMIA, RESPOSTA IMUNE  
CELULAR/HUMORAL E CITOCINAS NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL  
DE CAMUNDONGOS COM ISOLADO CLÍNICO *Candida parapsilosis*  
(Cp 1)**

Dissertação apresentada ao Programa de Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Mario Augusto Ono  
UEL – Londrina – PR

---

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 18 de Fevereiro de 2010.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano e contou com o apoio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária, FINEP, SETI/PR e PROPPG/UEL.

Aos meus pais, Roberto e Sonia, pela vida, amor, dedicação e incentivo;

À meu esposo Ricardo, pelo amor, compreensão e apoio.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e protetor, que sempre me protege e me ilumina em todos os passos da minha vida, por Ele ser tão bom comigo;

À minha família, meu *tudo* na vida, pelo amor eterno e incondicional. Pelo carinho e pela preocupação; pelo colo e pelas broncas; pela educação e pela disciplina; pelos princípios morais, pelas alegrias, pela compreensão; por sempre estar ao meu lado, por sempre me apoiar, sempre me guardar, me ensinar, não importa o esforço e o sacrifício;

À minha orientadora, Professora Doutora Eiko Nakagawa Itano, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos, incentivos e pela amizade;

Aos professores doutores Mário Augusto Ono e Elisa Yoko Hirooka, por aceitarem prontamente participar da banca de defesa e pelas contribuições para este trabalho e pela dedicação, e ainda a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivete Conchon Costa pela contribuição na banca de qualificação.

Aos técnicos e amigos Mári Sumigawa Kaminami e Nilson de Jesus Carlos, pela amizade, disposição, por tudo o que me ensinaram e por todo o apoio sempre que precisei;

A todos do Laboratório de Imunologia Aplicada: Audrey de Souza Marquez, Carina Harumi Takahama, Carla Cristine Crude dos Santos, Carlos Eduardo de Oliveira Lima, Cauê Zortéa Fernandes Costa, Fabiana Felipin Rigobello, Franciele Ayumi Semêncio Chiyoda, Francisco José de Abreu Oliveira, Juliana Elisa Lima, Lilian Cristina Raia De Dio, Maria Cláudia Noronha Dutra de Menezes, Nadia Hizuru Kamiji, Tânia Maris Pedrini Soares da Costa, Thiago Yuiti Castillho Massuda, Wander Rogerio Pavanelli e Wilson Candido Junior. Àqueles que não somente me ajudaram no trabalho de alguma forma, mas que também se tornaram amigos. Especialmente às colegas e amigas: Fernanda Akemi Nakanishi, Kátia Key Oshiro e Rosália Hernandes Fernandes-Vivan, que têm minha sincera amizade.

À minha querida amiga Luciene Airy Nagashima, que me acompanhou inteiramente neste trabalho, sempre com disposição para me ajudar, seja em qual hora fosse, e que sempre me incentivou e me apoiou.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, pelo suporte e ajuda. Em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Ehara Watanabe, pelo carinho, apoio e atenção.

As professoras doutoras Ângela Maria Ferreira Falleiros e Sheila Michele Levy do departamento de histologia, pelos ensinamentos e ajuda com o histopatológico.

A todos os professores e funcionários do Centro de Ciências Biológicas que, de alguma forma, ajudaram na minha formação e por todo o apoio, em especial aos funcionários Jesus Antônio Vargas (Zui) e Pedro S. R. Dionizio Filho;

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela oportunidade de realizar o curso e pela infra-estrutura;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa e por tratar a pesquisa de forma séria e profissional;

**ENFIM, A TODOS QUE DIRETA OU  
INDIRETAMENTE CONTRIBUÍRAM PARA A  
REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.**

LEONELLO, Paula Cesar. **Avaliação da fungemia, resposta imune celular/humoral e citocinas na infecção experimental de camundongos com isolado clínico *Candida parapsilosis* (Cp 1)**. 2010. 48f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

Em pacientes imunocomprometidos é comum a infecção concomitante por diversos patógenos. O presente trabalho identificou um isolado fúngico como *Candida parapsilosis* proveniente de paciente com histoplasmose. Considerando que estudos sobre a virulência e a patogenicidade experimental desta espécie são poucos, o objetivo do trabalho foi caracterizar o fungo, inicialmente confirmando como *C. parapsilosis* por biologia molecular (PCR) e avaliar a fungemia pela contagem de unidade formadora de colônia (CFU) no baço, fígado e cérebro, as respostas imune celular e humoral específicas, nível de citocinas plasmáticas (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10) e no macerado do cérebro (IL-17) no decorrer de infecção experimental em camundongos Swiss. Adicionalmente foi realizada a análise de nível plasmático de anticorpos anti-mielina, considerando os dados preliminares de alterações comportamentais em camundongos infectados pelo referido isolado. A identificação do fungo foi realizada por PCR utilizando primer ITS-5 e ITS-4, seguida de outro PCR com os primers: ITS-5, ITS-4, ITS-2 e ITS-3. Esse fungo, confirmado como *C. parapsilosis*, foi inoculado em camundongos por via endovenosa ( $1 \times 10^8$  leveduras/animal) e divididos em grupos de 7, 14, 28 e 56 dias de infecção. Como controle, inoculou-se PBS estéril. A resposta imune celular foi avaliada por teste intradérmico (DTH) e a resposta imune humoral por ELISA, utilizando como antígeno preparado livres de células (CFAg) de *C. parapsilosis*. Os resultados obtidos demonstraram aumento significativo de CFU apenas no grupo de camundongos com 7 dias de infecção em relação aos demais grupos ( $p < 0.05$ ) e aumento de resposta de DTH no grupo de 56 dias em relação ao controle ( $p < 0.05$ ) e nível elevado de IgG total anti-CFAg nos grupos de 28 e 56 dias em relação aos demais ( $p < 0.05$ ). Foi observado aumento no nível de citocina INF- $\gamma$  no plasma em grupo de 28 e 56 dias pós-infecção em relação aos demais grupos ( $p < 0.05$ ) e níveis similares de demais citocinas entre os grupos ( $p > 0.05$ ). Após 28 e 56 dias de infecção, foi confirmada a alteração comportamental. Todavia a contagem do CFU no cérebro foi significativamente maior somente no grupo de 7 dias, sendo negativo após 14 dias de infecção, mas com presença de lesões teciduais no cérebro dos grupos de camundongos com 28 e 56 dias pós-infecção. Não foram observadas alterações no nível plasmático de IgG anti-mielina. Concluímos pelos resultados que o referido isolado por si só apresenta baixa virulência e que a resposta imune induzida possivelmente controle a infecção. Todavia as respostas imunes específicas devem participar nas lesões do cérebro, alterando o comportamento dos camundongos infectados, o que requer estudos adicionais.

**Palavras-chave:** *Candida parapsilosis*. Resposta imune. Citocinas.

LEONELLO, Paula Cesar. **Analysis of fungemia, cellular/humoral immune response and cytokines in experimental infection of mice with *Candida parapsilosis* clinical isolate**. 2010. 48f. Dissertation (Masters in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2010.

## ABSTRACT

In immunocompromised patients, the concomitant infection of various microorganisms is common. This work introduces a fungal isolate identified as *Candida parapsilosis* in a patient with histoplasmosis. Whereas studies on the virulence and pathogenicity trial of this kind are few, the goal of the study was to characterize the fungus, initially confirmed as *C. parapsilosis* by molecular biology (PCR) and then evaluating the fungemia by colony forming unit (CFU) in spleen and liver, the cellular and humoral specific immune responses, level of plasmatic cytokines (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-10) in the course of experimental infection in mice. In addition the brain CFU and histopathology lesions analysis, as well as local IL-17 and plasma levels of IgG anti-myelin, were included considering the preliminary data of behavioral changes in infected mice by the actual isolate. The identification of the fungus was performed by PCR using primer ITS-5 and ITS-4, followed by another PCR with primers: ITS-5, ITS-4, ITS-2 and ITS-3. This fungus, confirmed as *C. parapsilosis*, was inoculated into mice intravenously ( $1 \times 10^8$  yeast/animal) and divided into groups of 7, 14, 28 and 56 days of infection. As control, it was inoculated sterile PBS. The cellular immune response was assessed by intradermal test (DTH) and humoral immune response by ELISA, using as antigen cell-free antigens (CFAg) of *C. parapsilosis*. The results showed a significant increase of CFU only in the group of mice with 7 days of infection compared to other groups ( $p < 0.05$ ) and increased DTH response in the 56 days group compared to control ( $p < 0.05$ ) and high level of anti-CFAg IgG in 28 and 56 days groups compared to the others ( $p < 0.05$ ). After 28 and 56 days of infection, it was confirmed a behavioral change. However, brain CFU was significantly higher only in the 7 days group, and being negative after 28 days of infection, but with presence of brains tissue lesions in mice groups with 28 and 56 days post-infection. There were no alterations in plasmatic anti-myelin IgG level. From the results, we conclude that this isolated itself has low virulence and that the immune induced response may control the infection. However the specific immune responses may be involved in the brain lesions, altering the behavior of the infected mice, which requires further study.

**Keywords:** *Candida parapsilosis*. Immune response. Cytokines.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Análise quantitativa da fungemia pela contagem de unidade formadora de colônia (CFU) do baço e fígado .....   | 25 |
| <b>Figura 2</b> – Análise quantitativa da fungemia pela contagem de unidade formadora de colônia (CFU) do cérebro dos animais com 7, 14, 28 e 56 dias de infecção e animais controle..... | 25 |
| <b>Figura 3</b> – Resultado de teste de hipersensibilidade tardia (DTH) no decorrer de infecção de camundongos swiss com <i>C. parapsilosis</i> .....                                     | 26 |
| <b>Figura 4</b> – Análise dos níveis de IgG anti-CFA de <i>C. parapsilosis</i> presentes no plasma dos camundongos.....   | 27 |
| <b>Figura 5</b> – Análise histopatológica do baço dos animais infectados com 7, 14, 28 e 56 dias de infecção.....   | 29 |
| <b>Figura 6</b> – Análise histopatológica do fígado dos animais infectados com 7, 14, 28 e 56 dias de infecção.....   | 30 |
| <b>Figura 7</b> – Análise quantitativa das citocinas (IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ e INF- $\gamma$ ) presentes no plasma dos camundongos infectados e grupo controle.....                   | 32 |
| <b>Figura 8</b> – Alteração comportamental de camundongo Swiss infectados com <i>C. parapsilosis</i> por via endovenosa.....  | 33 |
| <b>Figura 9</b> – Análise histopatológica do cérebro dos animais infectados com 7, 14, 28, 56 dias de infecção e animal controle .....  | 34 |
| <b>Figura 10</b> – Nível de IgG anti-mielina humana em plasmas de camundongos infectados com <i>C. parapsilosis</i> .....   | 36 |
| <b>Figura 11</b> – Dosagem de níveis de IL-17 em amostra de cérebro dos animais.....  | 37 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> – Alterações histopatológicas em baço e fígado de camundongos Swiss infectados com <i>Candida parapsilosis</i> ..... | 28 |
| <b>Tabela 2</b> – Alterações histopatológicas em cérebro de camundongos Swiss infectados com <i>Candida parapsilosis</i> .....       | 34 |

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |   |
|---------------|---|
| Ags           | Antígenos                                 |
| AIDS          | <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> |
| CFA           | <i>Cell-free Antigens</i>                 |
| CFU           | <i>Colony-forming Unit</i>                |
| DAB           | Diaminobenzidina                          |
| D.O.          | Densidade Óptica                          |
| ELISA         | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>  |
| EUA           | Estados Unidos da América                 |
| °C            | Graus Celsius                             |
| HE            | Hematoxilina-Eosina                       |
| IFN- $\gamma$ | Interferon gama                           |
| IgG           | Imunoglobulina G                          |
| IL-4          | Interleucina 4                            |
| IL-6          | Interleucina 6                            |
| IL-10         | Interleucina 10                           |
| IL-12         | Interleucina 12                           |
| IL-17         | Interleucina 17                           |
| i.v.          | Intravenosa                               |
| $\mu$ g       | Micrograma                                |
| $\mu$ L       | Microlitro                                |
| nm            | Nanômetro                                 |
| OPD           | Orto-Feniletlenodiamino Diidrocloroeto    |
| PBS           | Tampão Fosfato Salina                     |
| PCR           | Reação da Cadeia da Polimerase            |
| PMSF          | <i>Phenylmethanesulfonyl Fluoride</i>     |
| RNA           | Ácido Ribonucléico                        |
| SNC           | Sistema Nervoso Central                   |
| Th1           | Linfócito T auxiliar ou <i>helper 1</i>   |
| Th2           | Linfócito T auxiliar ou <i>helper 2</i>   |
| TGF- $\beta$  | <i>Transforming Growth Factor beta</i>    |
| TNF- $\alpha$ | Fator de Necrose Tumoral alfa             |
| UEL           | Universidade Estadual de Londrina         |

## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 14 |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 18 |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL .....  | 18 |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 18 |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 19 |
| 3.1      | MICROORGANISMO .....  | 19 |
| 3.2      | ANIMAIS .....   | 19 |
| 3.3      | OBTENÇÃO DE CELL FREE ANTIGEN (CFA) .....   | 19 |
| 3.4      | INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS SWISS .....  | 20 |
| 3.5      | UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (CFU) .....  | 20 |
| 3.6      | REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE CUTÂNEA TARDIA (DTH) .....                                   | 20 |
| 3.7      | ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS .....  | 20 |
| 3.8      | ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGG TOTAL ANTI-CFA DE C.<br>PARAPSILOSIS .....        | 21 |
| 3.9      | ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGG ANTI-MIELINA NO PLASMA .....                      | 22 |
| 3.10     | DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS EM AMOSTRAS DE PLASMA DE<br>CAMUNDONGOS .....          | 22 |
| 3.11     | DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE IL-17 EM AMOSTRAS DE MACERADO DE<br>CÉREBRO DE CAMUNDONGOS ..... | 22 |
| 3.12     | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 23 |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | 24 |
| 4.1      | IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADO CLÍNICO .....  | 24 |
| 4.2      | UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (CFU) .....  | 24 |
| 4.3      | REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE CUTÂNEA TARDIA (DTH) .....                                   | 25 |
| 4.4      | ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGG TOTAL ANTI-CFA DE C.<br>PARAPSILOSIS .....        | 26 |
| 4.5      | ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO BAÇO E FÍGADO .....  | 27 |
| 4.6      | DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS EM AMOSTRAS DE PLASMA DE<br>CAMUNDONGOS .....          | 31 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.7      | ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO CÉREBRO.....   | 32        |
| 4.8      | ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGG ANTI-MIELINA NO PLASMA .....                  | 35        |
| 4.9      | DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE IL-17 EM AMOSTRAS DE CÉREBRO NO<br>DECORRER DA INFECÇÃO..... | 36        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>   | <b>42</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>43</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento do número de pacientes susceptíveis em função de imunodepressão, nas últimas décadas tem ocorrido um aumento das infecções sistêmicas hospitalares; destacando-se as infecções fúngicas (PFALLER, 1996; FRIDKIN; JARVIS, 1996; KAO et al., 1999).

Dentre essas infecções fúngicas, a mais frequente é a candidíase, causada pelo fungo *Candida ssp.*, patógeno oportunista frequentemente isolado das superfícies mucosas de indivíduos normais, mas que pode levar ao desenvolvimento de lesões superficiais até infecções disseminadas (ALVARES, 2007).

Em 1963, eram conhecidas como causadoras de doenças em humanos, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* (*C. albicans* var *stellatoidea*) e *C. guilliermondii*. Atualmente, são conhecidas cerca de dezessete espécies de *Candida* causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos (DIGNANI et al., 2003).

*C. albicans* ainda é a espécie mais isolada, entretanto é cada vez mais frequente o isolamento de espécies *Candida* não-*albicans*, que estão sendo consideradas patógenos emergentes de grande importância (LUNEL, 1999; KAO et al., 1999; KRUMHOLTZ; BARNES, 2002). Dentre as espécies consideradas emergentes destaca-se *C. parapsilosis* (LEVY et al., 1998; LEVIN et al., 1998).

*C. parapsilosis* apresenta-se como um importante patógeno hospitalar, sendo responsável por 7% a 15% das candidemias na maioria das publicações nos EUA e Europa (PFALLER, 1996; VOSS et al., 1996).

Estudos experimentais sobre a virulência e a patogenicidade desta espécie são poucos (BISTONI et al., 1984; CASSONE et al., 1995). Pouco se sabe a respeito de *C. parapsilosis*, apesar de ser uma espécie comumente isolada das mãos dos trabalhadores saudáveis dos hospitais e estar relacionada com a disseminação exógena de candidíase em recém nascidos internados em UTI neonatal (BONASSOLI, 2004).

*C. parapsilosis* foi isolada pela primeira vez por Ashford a partir de fezes de um paciente com diarreia em Porto Rico, em 1928.

Quando cultivadas em ágar Sabouraud dextrose, apresenta colônias brancas, cremosas, brilhantes, lisas e/ou enrugadas. Quando comparada a *C. albicans* e *C. tropicalis*, que podem existir em múltiplas formas morfológicas, *C.*

*parapsilosis* não forma hifas verdadeiras e existe em qualquer fase de levedura ou pseudohifas. (TROFA et al., 2008).

Algumas características gerais são que *C. parapsilosis* prolifera-se em soluções contendo glicose, tem grande capacidade de produzir biofilme e frequentemente coloniza a pele (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Há uma associação bem documentada entre infecção por *C. parapsilosis* e a presença de um dispositivo intravascular (WEEMS et al., 1992; GIRMENIA et al., 1996; LEVY et al., 1998).

Experimentalmente, a virulência de *C. parapsilosis* é menor que *C. albicans* e outras espécies de *C. não-albicans*, devido à sua menor aderência a células epiteliais (ABI SAID et al., 1998). Por outro lado, *C. parapsilosis* tem capacidade de aderir de forma mais eficiente em material estranho (WEEMS et al., 1992). Infecções por *C. parapsilosis* é comumente associada à nutrição parenteral, catéteres intravenosos, dispositivos ou próteses implantadas (COLEMAN et al., 1998).

Estas características explicam a associação com cateteres e também a mortalidade significativamente menor quando comparado com outras espécies de *C. não-albicans* (GIRMENIA et al., 1996; LEVY et al., 1998; KRCMERY, 1998; VISCOLI et al., 1999; KRCMERY, 1999).

Biofilmes são facilmente formados por *C. parapsilosis* quando as células crescem em meio contendo alta concentrações de glicose e lipídios, que está associado com aumento da prevalência de infecções da corrente sanguínea em pacientes que recebem nutrição parenteral (NOSEK et al., 2009).

Em contraste com *C. albicans*, a formação do bio-filme de *C. parapsilosis* é mais fino, menos estruturado, não apresenta hifas verdadeiras, e consistem exclusivamente de agregado de blastosporos (KUHN et al., 2002).

Em relação a sua susceptibilidade a antifungicos, *C. parapsilosis* é relativamente sensível à maioria dos antifúngicos sistêmicos, incluindo cetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B e 5-FC (REX et al., 1995).

Em comparação com outras espécies de *Candida*, *C. parapsilosis* tem uma ampla distribuição na natureza. Ao contrário da *C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* não é um patógeno humano obrigatório, tendo sido isolada a partir de fontes não-humanos, como animais domésticos, insetos, solo e ambientes marinhos (FELL; MEYER, 1967; WEEMS, 1992).

Em pacientes imunocomprometidos é comum a infecção concomitante por diversos patógenos (NETO et al., 1995), existem casos de infecção concomitante com *Histoplasma capsulatum* (DIÓGENES et al., 1990; PEREIRA et al., 2002). No presente trabalho foi isolado um fungo de paciente com histoplasmose, micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum var. capsulatum*, sendo esse isolado identificado por biologia molecular como *C. parapsilosis*.

Embora o fungo *C. parapsilosis* seja considerado tipicamente um comensal da pele humana sendo a sua patogenicidade limitada ao tegumento intacto, e ser frequentemente considerado menos virulento do que *C. albicans* (TROFA et al., 2008) existem casos de infecções de rins, pulmão, coração, articulações, ossos e sistema nervoso central (LACAZ et al., 2002), sendo que as formas clínicas mais severas têm sido associadas com pacientes imunocomprometidos, neutropênicos e transplantados (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

A candidíase sistêmica em camundongos se assemelha à doença humana. Envolvimento no cérebro e renal é comum em infecções disseminada por *Candida* em humanos (PARKER, 1976; ODDS, 1988), e também em camundongos, estes órgãos são um foco primário de infecção (LOURIA, 1985; PAPADIMITRIOU; ASHMAN, 1986).

O envolvimento de sistema nervoso central ocorre frequentemente em prematuros que desenvolvem candidemia. Entretanto, segundo dados obtidos em necropsia, pacientes que desenvolveram sepse por *Candida* que evoluem a óbito, apresentam lesões fúngicas no sistema nervoso central (SNC) em até 20% dos casos (DIGNANI et al., 2003; FILLER et al, 2003).

A imunidade protetora a *Candida* envolve respostas imunes inata e adaptativa. A presença de uma imunidade inata ativa, tais como a capacidade das células fagocíticas para inibir crescimento de fungos, é necessária para a indução de células CD4<sup>+</sup> Th1 (MENCACCI et al., 1998).

No entanto, um sistema imunológico inato ativado nem sempre é suficiente, por si, para eliminar a infecção. Assim, uma integração adequada entre o sistema imune inato e o adaptativo é necessário para o controle eficiente das infecções por *Candida* (ROMANI, 2000).

As citocinas tem demonstrado uma papel importante na modulação

da resposta imune a infecção por *Candida* (ASHMAN; PAPADIMITRIOU, 1995; ROMANI, 2000).

Estudos em camundongos mostraram que o desenvolvimento da respostas Th1 exige ações de diversas citocinas, como o IFN- $\gamma$  (ROMANI et al., 1992; CENCI et al., 1998), TGF- $\beta$  (SPACCAPELO et al., 1995), IL-6 (ROMANI et al., 1992), TNF- $\alpha$  (MENCACCI et al., 1998), e IL-12 (ROMANI et al., 1994), a ausência de citocinas Th2, como IL-4 e IL-10, que inibem o desenvolvimento de respostas Th1 (TONNETTI et al., 1995).

Assim, considerando a possibilidade do fungo causar uma infecção sistêmica e considerando a existência de poucos estudos sobre a sua virulência e especialmente nenhum conhecimento sobre o isolado, no presente trabalho foi proposto induzir infecção sistêmica por isolado de *C. parapsilosis* em camundongos e, avaliar a fungemia de órgãos, a resposta imune celular e humoral e, nível de citocinas no decorrer da infecção de camundongos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

No presente trabalho foi proposto induzir infecção sistêmica por isolado fúngico *C. parapsilosis* em camundongos, avaliar a fungemia em órgãos, a resposta imune celular e humoral e nível de citocinas no decorrer da infecção de camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar isolado clínico de *Candida* de paciente com histoplasmose;
- Obter *Cell free antigen* (CFA) do fungo *C. parapsilosis*;
- Detectar níveis de IgG total anti-CFA no plasma de camundongos infectados experimentalmente com *C. parapsilosis*;
- Analisar fungemia, resposta imune humoral e celular específicas na infecção experimental murina;
- Detectar anticorpos anti-mielina no plasma na infecção experimental murina;
- Detectar nível de citocinas dos camundongos na infecção experimental murina;
- Analisar o histopatológico dos órgãos (baço, fígado e cérebro).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MICRORGANISMO

Foi utilizado isolado *Cp1*, fungo *C. parapsilosis* de paciente com histoplasmose, atendido no Hospital Universitário de Londrina - HU/UEL e identificado inicialmente por cultivo em meio seletivo, Chromagar Candida (CA221, Paris, França), seguida de confirmação por reação da cadeia da polimerase (PCR), utilizando como primeiro primer ITS-5 e ITS-4 e segundo primer ITS-5, ITS-4, ITS-2 e ITS-3, em dois PCRs consecutivos e análise por sequenciamento (Applied Biosystems) na Universidade de Chiba, Chiba, Japão.

#### 3.2 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos Swiss, alojados no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da UEL, com fornecimento de água e ração peletizada *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina sob nº 100/09.

#### 3.3 OBTENÇÃO DE *CELL FREE ANTIGEN* (CFA)

Após o cultivo de 24 horas do fungo *Cp1*, a massa fúngica foi removida e suspensa em solução salina tamponada com fosfato (PBS), adicionado timerosal e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), homogeneizada em aparelho vórtex (5 ciclos de 2 minutos) e deixado em repouso no gelo por uma hora e trinta minutos. Após o repouso o tubo com a suspensão foi levado ao aparelho vórtex (1 ciclo de 2 minutos) e depois centrifugado em centrífuga refrigerada 4°C, a 1005 x g (*Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Germany*) por 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi centrifugado novamente a 4°C e 12870 x g por 30 minutos. Amostra de sobrenadante foi coletada e a concentração protéica do CFA obtido foi dosada pelo método Folin (LOWRY et al., 1951). A seguir, o CFA foi aliquoteado e armazenado em freezer -80 °C até a utilização.

### 3.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS SWISS

Os camundongos foram divididos em cinco grupos de 10 animais: G1 – infectado e eutanasiado no 7º dia, G2 – infectado e eutanasiados no 14º dia G3 – infectado e eutanasiado no 28º dia, G4 – infectado e eutanasiados no 56º dia e G5- Controle sem infecção e eutanasiados em 7, 14, 28 e 56 dias (2 animais cada). Os animais infectados (G1-G4) foram inoculados (i.v.) com  $1 \times 10^8$  leveduras de *C. parapsilosis*, enquanto o grupo G5 com solução salina tamponada (PBS) estéril.

### 3.5 UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (CFU)

Parte do baço, fígado e do cérebro de cada camundongo foram retirados assepticamente e macerados em PBS estéril e ajustado a 0,2 g órgão/mL. O homogenato foi diluído 1:10, sendo 30 uL de cada diluição submetido à determinação do CFU em placas de petri em Agar Saboraud. As placas foram incubadas em estufa de 35°C por 4 dias para determinação do número de unidades formadoras de colônia (CFU) de *C. parapsilosis*.

### 3.6 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE CUTÂNEA TARDIA (DTH)

Para determinar o DTH, de 18 a 24 h antes da eutanásia, os camundongos receberam uma inoculação subcutânea com 50 µl na concentração de 7,5 µg de CFA de *C. parapsilosis* no coxim da pata traseira esquerda. Como controle, foi inoculado PBS estéril nas patas traseira direita. A extensão do infiltrado inflamatório foi avaliado através de medida do raio da pata utilizando especímetro (Mitotoyo, draper 0-25 mm Micrometer, Tokyo, Japan) e a porcentagem relativa de aumento da pata foi calculada pela fórmula  $A = \pi \cdot d^2 / 4$  (onde A= área de um círculo plano;  $\pi = 3,14$ ; d= medida obtida no especímetro) e avaliada comparando-se com o controle.

### 3.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS

Após eutanásia, parte do baço, fígado e do cérebro foi removido e fixado em solução de formalina tamponada (0,05M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,05M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , água

destilada e 10% de formol 37%, pH 7.0) por no mínimo 24 h e submetidos à desidratação em álcool 70% por 30 min, álcool 90% por 30 min, álcool absoluto por 30 min e 3 passagens de 15 min por xilol. A seguir, foram submetidos a 3 inclusões de 30 min em parafina. Secções de 5 mm foram fixadas em lâminas de microscopia e sucessivamente hidratadas em xilol, álcool e xilol, álcool absoluto, álcool 90 e álcool 70% (5 min em cada solução). A coloração foi feita com hematoxilina (15 s) e eosina (30 s) e lavagem em água corrente por 10 min. Os cortes corados foram então desidratados em álcool e xilol e as lamínulas fixadas com bálsamo. Essa coloração foi realizada para análise morfológica do tecido. Algumas secções de 5 mm, fixadas em lâminas de microscopia, foram coradas também pela técnica de Grocott (methenamina) para detecção de fungos ou parte de fungos. Após hidratação em água, as lâminas foram oxidadas em ácido crômico 5%, por 1 h, e lavadas em água corrente por 10 min. Depois de tratadas em bissulfito de sódio 1%, durante 1 min, as lâminas foram novamente lavadas e incubadas em solução de nitrato de prata (5% nitrato de prata, 3% hexamine), à 60 °C. Após nova lavagem, as lâminas foram tratadas com 0,1% de cloreto de ouro, por 5 min. Os resíduos não oxidados foram removidos com 2% de tiosulfato de sódio, por 2 min, e a coloração de fundo realizada com Light Green stain. Foi utilizado também a técnica de coloração Picrosírius, para evidenciar o colágeno e avaliação do grau de fibrose tecidual, onde secções de 5 mm foram desparafinadas e os cortes foram hidratados e deixados em uma solução de ácido fosfomolibdico por 1 min, após incubado por 90 min com solução de picrosírius (Direct red Sigma®), após corado com ácido clorídrico por 2 min, depois desidratadas e clarificadas e montadas. As lâminas foram avaliadas em microscopia óptica, a 4x10, 10x10 e 100x10 de aumento.

### 3.8 ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGG TOTAL ANTI-CFA DE *C. PARAPSILOSIS*

As placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µl/orifício, contendo 25 µg/mL de CFA de *C. parapsilosis* diluído em tampão carbonato-bicarbonato, e incubada por 1 hora a 37°C e overnight a 4°C, seguido de bloqueio e lavagens. Para detecção de IgG total, foi adicionado 100 ul/orifício das amostras de plasma dos camundongos diluídas 1:10 e conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo 1:4000 (A8924, Sigma, St. Louis, MO, USA). A revelação foi feita com OPD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µL/orifício) e a reação, bloqueada com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. A

leitura foi feita em aparelho Multiskan EX (Uniscience – Labsystems, Helsinki, Finland) em 492 nm.

### 3.9 ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IgG ANTI-MIELINA NO PLASMA

As placas de ELISA foram sensibilizadas com mielina humana, 50µg diluído em tampão carbonato-bicarbonato, incubada por 1 hora a 37°C e overnight a 4°C, seguido de bloqueio e lavagens. Para detecção de IgG anti-mielina, foi adicionado 100 ul/orifício das amostras de plasma puro dos camundongos, seguida de 1 hora e 30min de incubação a 37°C, seguido de lavagens e adição do conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo 1:4000 (A8924, Sigma, St. Louis, MO, USA), incubado por 1 hora a 37°C. A revelação foi feita com OPD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µL/orifício) e a reação, bloqueada com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. A leitura foi feita em aparelho Multiskan EX (Uniscience – Labsystems, Helsinki, Finland) em 492 nm.

### 3.10 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS EM AMOSTRAS DE PLASMA DE CAMUNDONGOS

Para análise de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, e TNF- $\alpha$  foram utilizados “kits” de ELISA comercial (Biosource INVITROGEN) e o nível de citocinas foi calculado baseando-se na curva padrão de concentração conhecida de citocinas, de acordo com instruções do fabricante.

### 3.11 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE IL-17 EM AMOSTRAS DE MACERADO DE CÉREBRO DE CAMUNDONGOS

O cérebro foi retirado assepticamente e macerado em PBS estéril e congelado a -80°C. Antes de análise da citocina, a amostra foi descongelada e centrifugada a 4°C e 12000 rpm por 5 min. Para análise de IL-17 foi utilizado kit de ELISA comercial (Biosource INVITROGEN) e o nível de citocinas foi calculado baseando-se na curva padrão de concentração conhecida de citocinas, de acordo com instruções do fabricante.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise de variância (ANOVA) teste de Tukey-Kramer. Os valores foram descritos pela média  $\pm$  desvio padrão, e os resultados, considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADO CLÍNICO

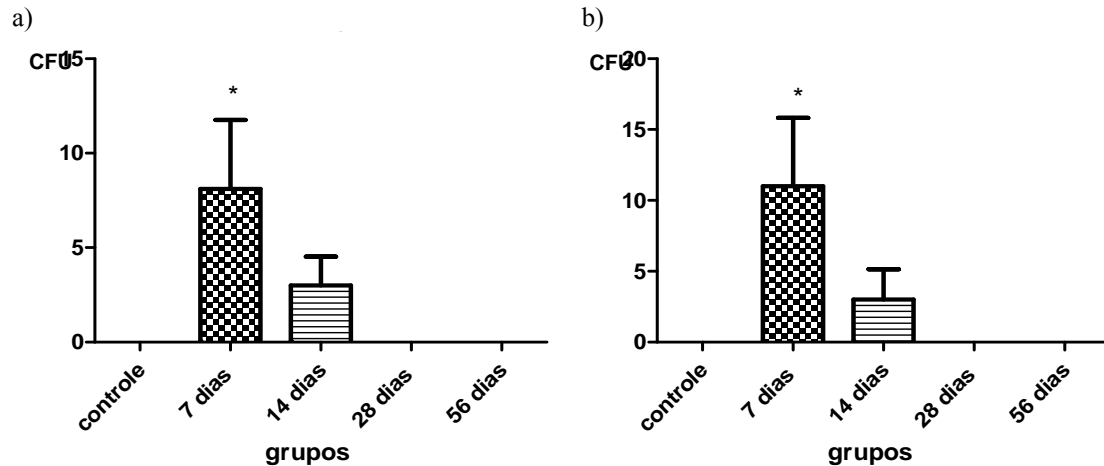
O fungo isolado foi inicialmente identificado como *C. parapsilosis* por meio de cultivo em meio seletivo e confirmado por PCR. Após realização da técnica de PCR e sequenciamento resultando na sequência de identificação: TGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA TTACAGAATGAAAAGTGCTTAAGTGCATTTTTCTTACACATGTGTTTTTCTTTTT TGAAAACCTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGCCTGCCAGAGATTAACTCA ACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAAACTTTCAACAACGG ATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATG AATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT ATTCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTT GGTGTTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAAT GGATAGGTTTTTCCACTCATTGGTACAACTCCAAAACCTTCTTCAAATTCGAC CTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAACGGAGGAA, que apresenta 99% de homologia com o microrganismo como *C. parapsilosis*, retirado do banco de dados NCBI blast.

### 4.2 UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (CFU)

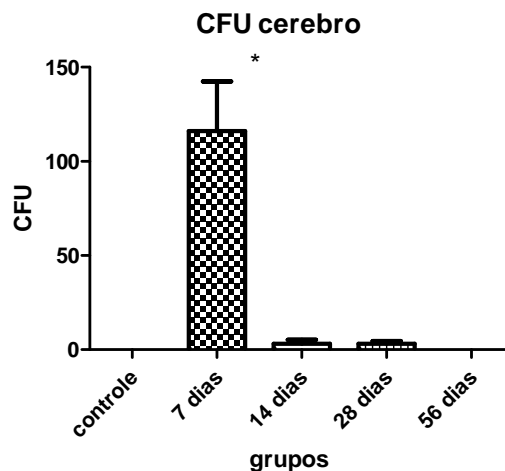
Os números de CFUs recuperados do baço foram: 7 dias de infecção =  $8,000 \pm 11,57$ ; 14 dias de infecção =  $3,000 \pm 4,830$ ; 28 dias de infecção não detectado (ND); 56 dias de infecção ND e controle ND (Figura 1a). Os números de CFU recuperados do fígado foram: 7 dias de infecção =  $11,000 \pm 15,04$ ; 14 dias de infecção =  $3,000 \pm 6,749$ ; 28 dias de infecção ND; e 56 dias de infecção ND e controle ND. Baço 7 dias de infecção x 14, 28, 56 dias e controle negativo =  $p < 0.05$ . Fígado 7 dias de infecção x 14, 28, 56 dias e controle negativo =  $p < 0.05$  (Figura 1b).

Os números de CFUs recuperadas de cérebro demonstraram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de colônias dos camundongos com 14 ( $3,000 \pm 6,749$ ), 28 ( $3,000 \pm 4,830$ ) e 56 dias de infecção (ND) comparadas com camundongos com 7 dias de infecção ( $116,0 \pm 83,69$ ) (Figura 2).

**Figura 1** – Análise quantitativa da fungemia pela contagem de unidade formadora de colônia (CFU) em baço e fígado. Camundongos swiss infectados com *C. parapsilosis* durante 7, 14, 28 e 56 dias de infecção (n=40) e grupo controle (n=10). a) Baço: diferença estatística significativa entre 7 dias de infecção x controle, 14, 28 e 56 dias de infecção ( $p<0.05$ ). b) Fígado: diferença estatística significativa entre 7 dias de infecção x controle, 14, 28 e 56 dias de infecção ( $p<0.05$ ).



**Figura 2** – Análise quantitativa da fungemia pela contagem de unidade formadora de colônia (CFU) do cérebro dos animais com 7, 14, 28 e 56 dias de infecção (n=40) e animais controle (n=10). No CFU do cérebro nossos resultados apresentaram diferença significativa entre 7 dias de infecção comparado com os demais.

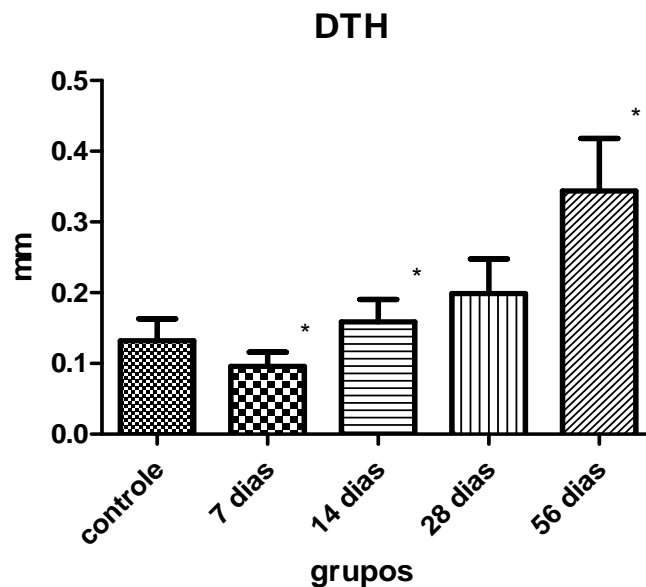


#### 4.3 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE CUTÂNEA TARDIA (DTH)

O teste de hipersensibilidade cutânea tardia utilizado para avaliar a resposta imune celular demonstrou aumento da resposta em diâmetro no decorrer da

infecção, sendo significativo após 28 e 56 dias ( $p < 0.05$ ). Os resultados (figura 3) apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre camundongos controle ( $0,132 \pm 0,086$ ) e 56 dias de infecção ( $0,343 \pm 0,210$ ), 7 dias de infecção ( $0,096 \pm 0,056$ ) comparado com 56 dias de infecção e 14 dias de infecção ( $0,159 \pm 0,099$ ) comparado com 56 dias de infecção ( $n=10$ ).

**Figura 3** – Resultado de teste de hipersensibilidade tardia (DTH) no decorrer de infecção de camundongos swiss com *C. parapsilosis*. Pós 7, 14, 28 e 56 dias de infecção e grupo controle. Diferença significativa entre controle, 7 dias e 14 dias de infecção em relação a 56 dias de infecção ( $p < 0.05$ ).

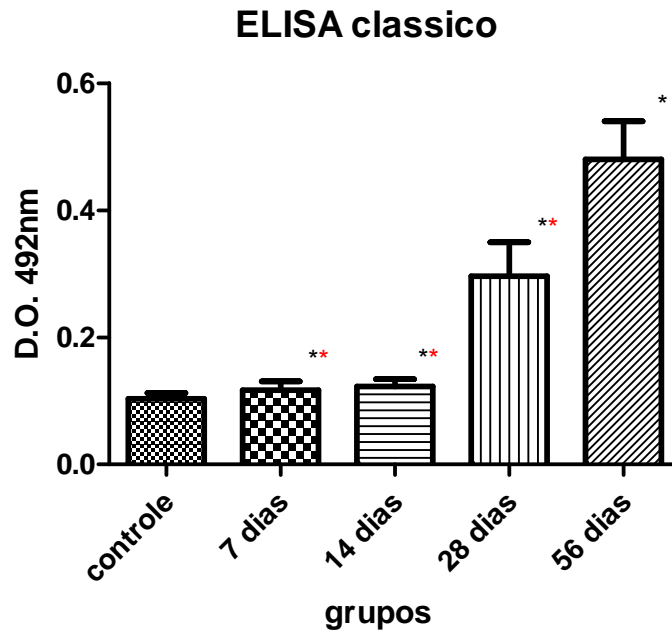


#### 4.4 ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGG TOTAL ANTI-CFA DE *C. PARAPSILOSIS*

Os resultados (figura 4) do ELISA para detecção de níveis de IgG anti-CFA de *C. parapsilosis*, foram maiores em 28 e 56 dias de infecção (56 dias de infecção:  $0,480 \pm 0,180$ ; 28 dias de infecção:  $0,296 \pm 0,168$ ), comparados com controle, 7 e 14 dias de infecção (controle:  $0,103 \pm 0,028$ ; 7 dias de infecção:  $0,117 \pm 0,043$ ; 14 dias de infecção:  $0,123 \pm 0,035$ ). Diferença significativa do controle entre 28 e 56 dias de infecção. Diferença de 7 dias de infecção entre 28 e 56 dias de

infecção. Diferença de 14 dias de infecção entre 28 e 56 dias de infecção. Diferença entre 28 dias de infecção e 56 dias de infecção ( $p < 0,05$ ) ( $n=10$ ).

**Figura 4** – Resultado de análise dos níveis de IgG anti-CFA de *C. parapsilosis* presentes no plasma dos camundongos. Grupo de camundongos swiss infectados durante 7, 14, 28 e 56 dias com *C. parapsilosis* ( $n=40$ ) e grupo controle ( $n=10$ ). Controle, 7, 14 e 28 dias de infecção x 56 dias de infecção ( $p<0.05$ ). Controle, 7 e 14 dias de infecção x 28 dias de infecção ( $p<0.05$ ).



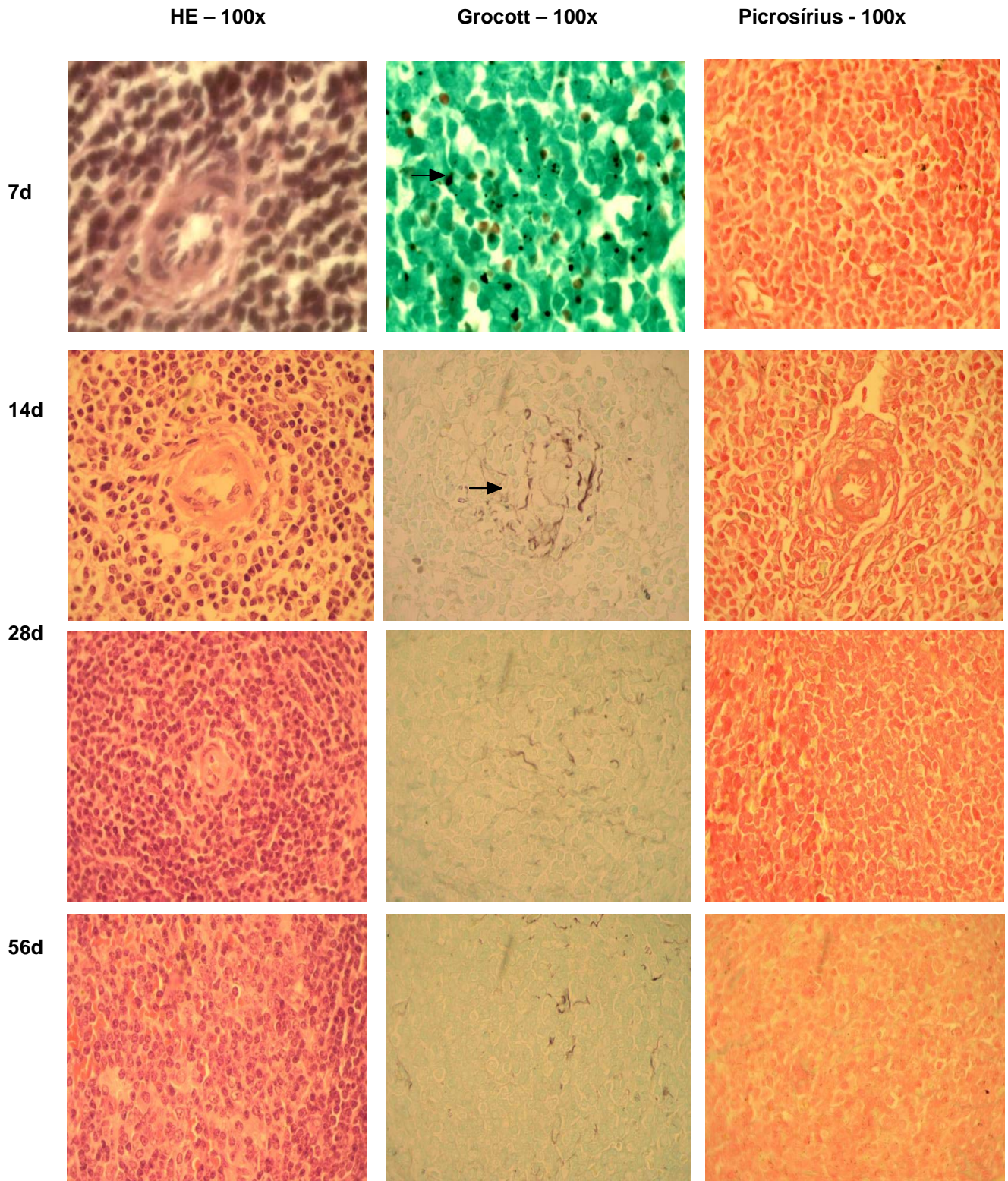
#### 4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO BAÇO E FÍGADO

Nos camundongo de 7 e 14 dias observou-se a presença de células fúngicas, com início de lesão tecidual. No baço dos camundongos com 28 dias de infecção foi observado um aumento de lesão tecidual. Nos camundongos com 56 dias de infecção a lesão tecidual foi mais evidente, apresentando resquícios de células fúngicas mortas (tabela 1). Nos controles sem infecção foi observado ausência de fungo e de lesão. Resultados histopatológico baço (figura 5) e fígado (figura 6).

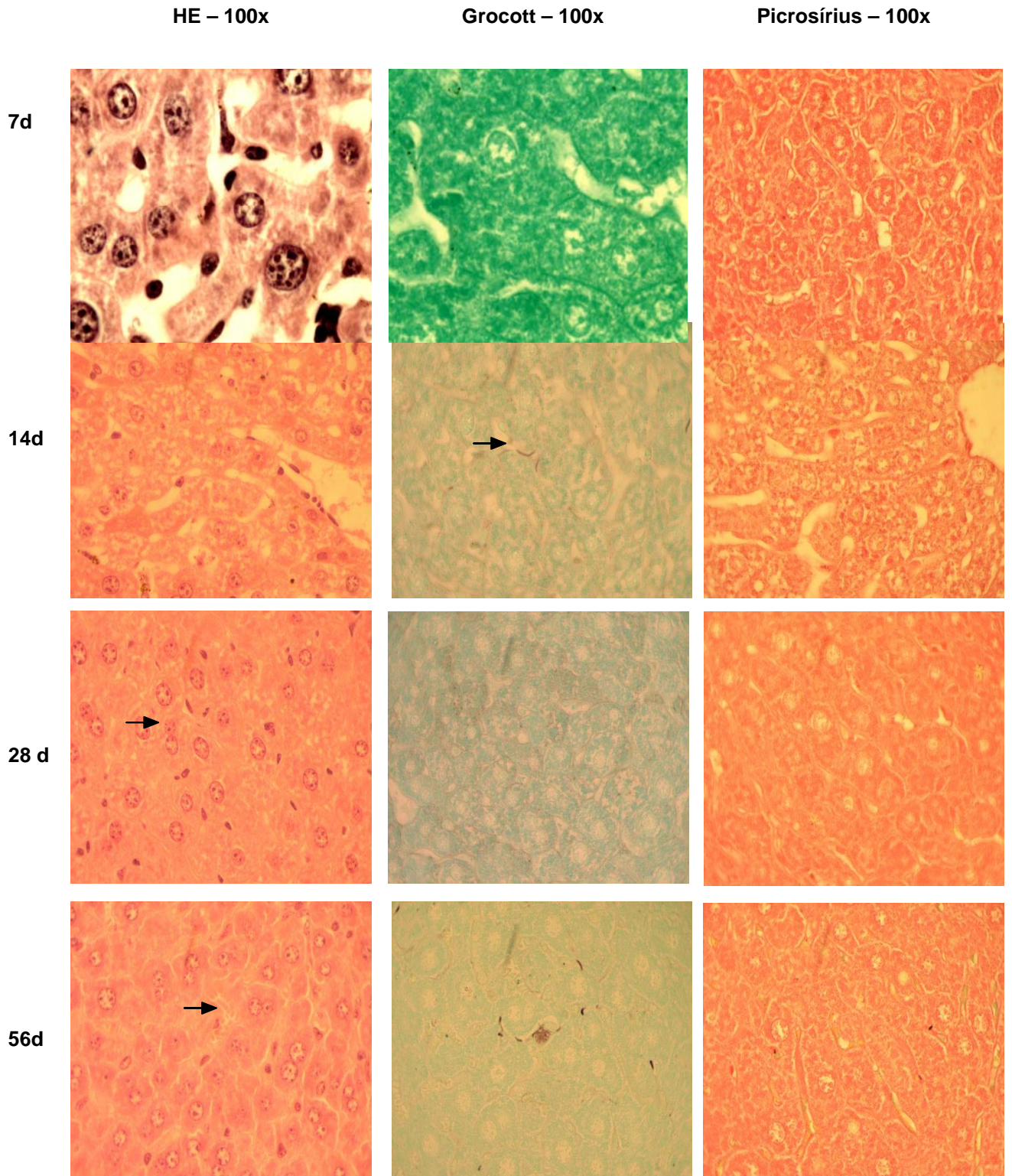
**Tabela 1** – Alterações histopatológicas em baço e fígado de camundongos Swiss infectados com *Candida parapsilosis*.

| grupos         | Alterações  |  |
|----------------|---|--|
|                | Baço  | Fígado   |
| <b>7 dias</b>  | Presença de leveduras (seta), início de alterações; | Sem alterações teciduais, presença de leveduras; |
| <b>14 dias</b> | Desorganização tecidual, presença de hifas(seta) ;  | Presença de hifas (seta), tecido desorganizado;  |
| <b>28 dias</b> | Aumento do numero de células do baço;               | Aumento no numero de hepatócitos (seta);         |
| <b>56 dias</b> | Resquícios de células fúngicas.                     | Hepatócitos com aspecto de esponja (seta).       |

**Figura 5** – Análise histopatológica do baço dos animais infectados com 7, 14, 28 e 56 dias de infecção.



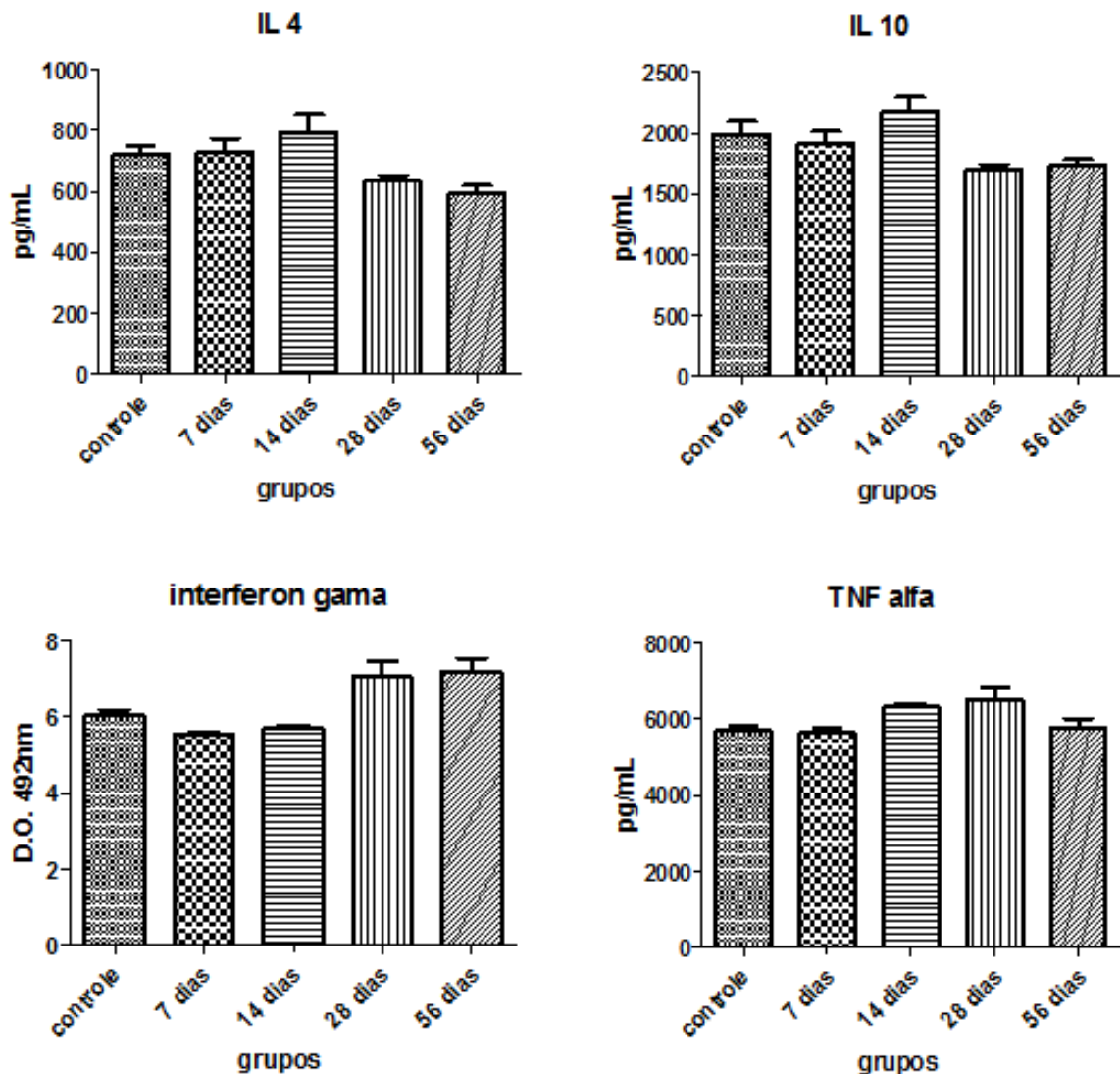
**Figura 6** – Análise histopatológica do fígado dos animais infectados com 7, 14 e 56 dias de infecção.



#### 4.6 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS EM AMOSTRAS DE PLASMA DE CAMUNDONGOS

Os resultados demonstraram um aumento de níveis de INF- $\gamma$  com 28 e 56 dias de infecção (28 dias de infecção:  $7,062 \pm 0,989$ ; 56 dias de infecção:  $7,214 \pm 0,753$ ), o mesmo ocorrendo com os níveis de TNF- $\alpha$  com 28 dias de infecção ( $653,9 \pm 765,0$ ). Os resultados mostraram que os níveis de IL-4 tiveram um aumento com 14 dias de infecção ( $796,3 \pm 134,9$ ) e uma diminuição desses níveis com 28 e 56 dias de infecção (28 dias de infecção:  $633,7 \pm 42,86$ ; 56 dias de infecção:  $591,5 \pm 72,38$ ). Os níveis de IL-10 seguiram os padrões de IL-4, apresentando um leve aumento dos níveis de IL-10 com 14 dias de infecção ( $2174 \pm 286,6$ ) e uma diminuição significativa desses níveis com 28 e 56 dias de infecção (28 dias de infecção:  $1697 \pm 89,73$ ; 56 dias de infecção:  $1729 \pm 128,6$ ). O perfil de citocinas no plasma dos animais demonstraram um leve aumento significativo de citocinas do tipo Th2 com 14 dias de infecção ( $p < 0,05$ ). Com 28 e 56 dias de infecção teve uma diminuição dos níveis de citocinas Th2 e um aumento significativo de citocinas Th1 comparado com os demais grupos ( $p < 0,05$ ). Resultados foram expressos em pg/ml (Figura 7).

**Figura 7** – Análise quantitativa das citocinas (IL-4, IL-10, TNF-alfa e INF-gama) presentes no plasma dos camundongos infectados (n=40) e grupo controle (n= 10). a) IL-4: diferença significativa ( $p<0.05$ ) entre 14 dias de infecção e 28 dias de infecção; e entre 14 dias de infecção e 56 dias de infecção. b) IL-10: diferença significativa ( $p<0.05$ ) entre 14 dias de infecção e 28 dias de infecção; e entre 14 dias de infecção e 56 dias de infecção. c) INF- $\gamma$ : diferença significativa entre controle e 28 dias de infecção; controle e 56 dias de infecção; 7 dias de infecção entre 28 e 56 dias de infecção; 14 dias de infecção entre 28 e 56 dias de infecção. d) TNF- $\alpha$ : diferença significativa entre 7 dias de infecção e 28 dias de infecção.

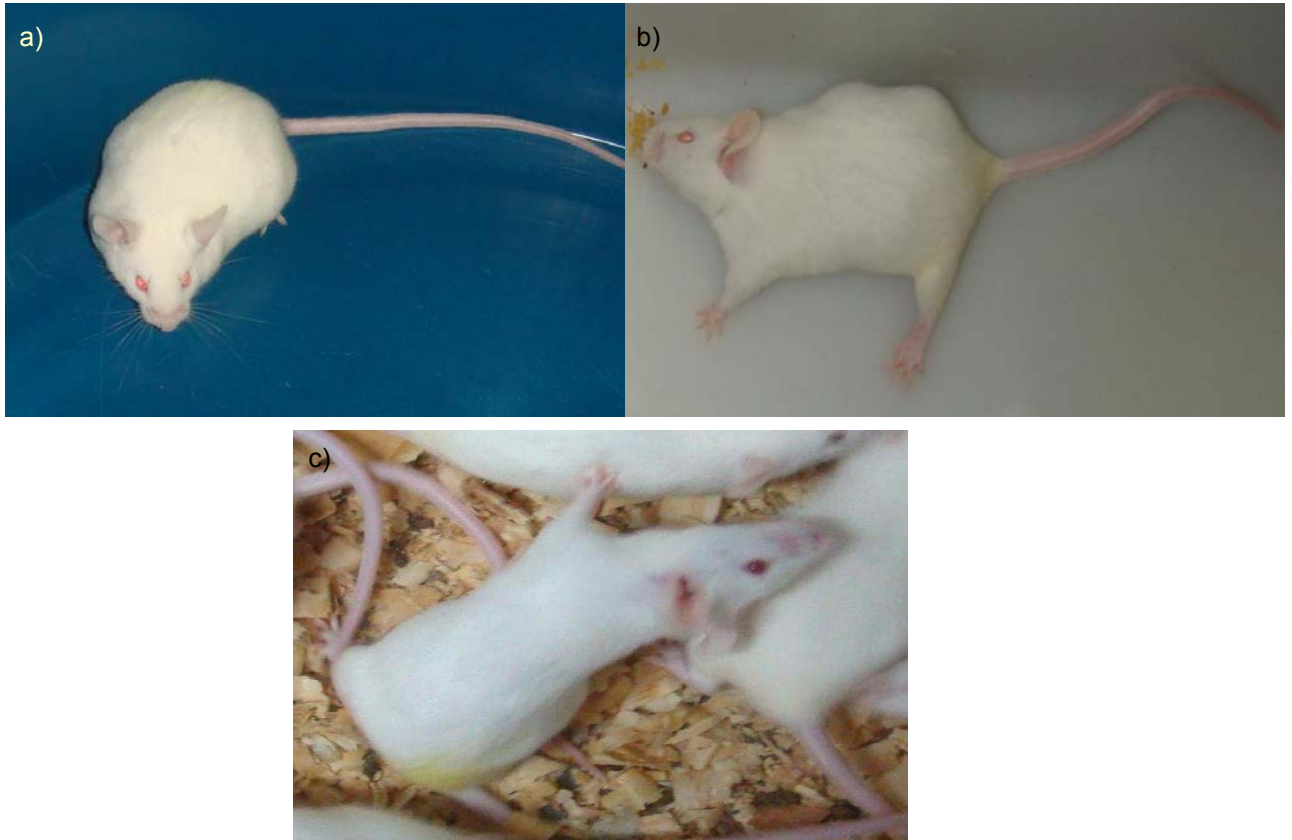


#### 4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO CÉREBRO

Considerando que os animais com 28 e 56 dias de infecção apresentaram alteração comportamental, sugerindo algum distúrbio neurológico

(Figuras 8b e 8c), foi realizada análise histopatológica do cérebro observando-se nos camundongo de 7 e 14 dias a presença de células fúngicas com formação de hifas septadas, com início de lesão tecidual em 7 dias e maior alteração de vasos e tecido em 14 dias. Nos camundongos com 28 dias de infecção também foi observado alterações. Nos camundongos com 56 dias de infecção as alterações começam a diminuir, é encontrado resquícios de células fúngicas mortas (tabela 2). O resultado de CFU apresentou negatividade aos 28 dias pós-infecção, porém, na análise histopatológica foi possível observar a presença de alguns fungos. Considerando que aos 56 dias não foi observada a presença de fungos íntegros, possivelmente os mesmos não estavam mais viáveis aos 28 dias. Nos controles sem infecção foi observado ausência de fungo e de lesão. Resultados histopatológico (figura 9).

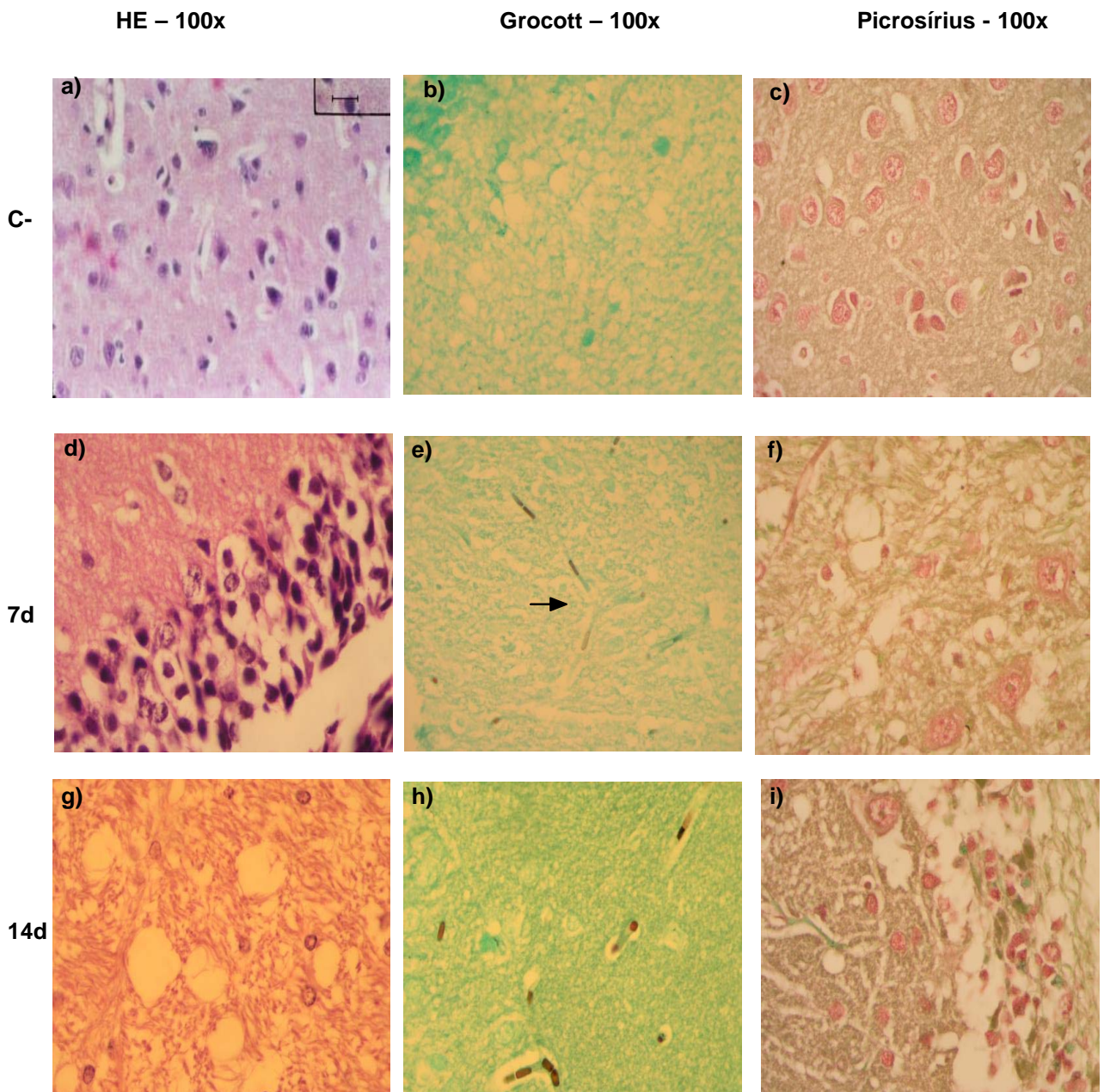
**Figura 8** – Alteração comportamental de camundongo Swiss infectados com *C. parapsilosis* por via endovenosa. a) controle negativo, sem infecção por *C. parapsilosis*. b) Camundongo Swiss com 28 dias de infecção com *C. parapsilosis* apresentando alteração comportamental, c) com 56 dias de infecção com *Candida parapsilosis*. Apresentando alteração comportamental e controle sem alteração comportamental.

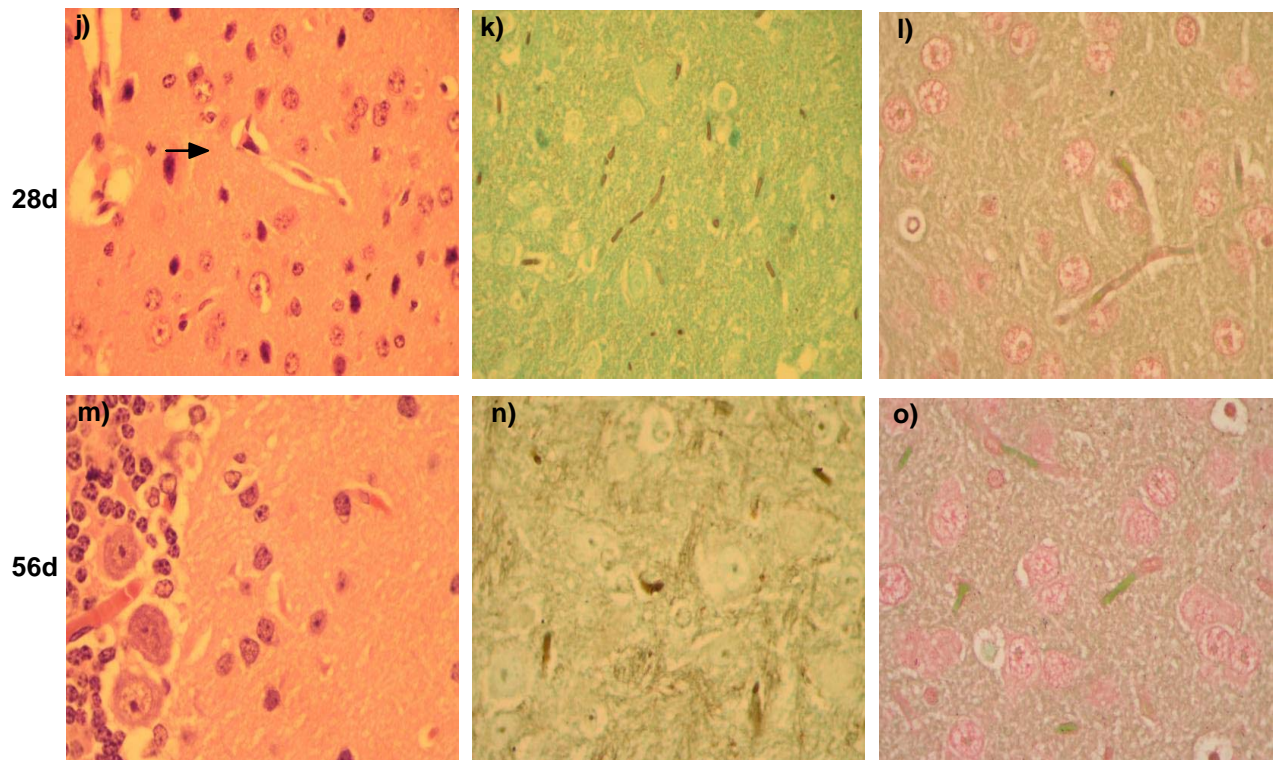


**Tabela 2** – Alterações histopatológicas em cérebro de camundongos Swiss infectados com *Candida parapsilosis*.

| grupos         | Alterações  |
|----------------|---|
| <b>7 dias</b>  | Início de desorganização tecidual; presença de leveduras e hifas do fungo (seta).   |
| <b>14 dias</b> | Desorganização tecidual acentuada; presença de hifas; alteração de vasos (vasculite); aumento do conjuntivo q reveste (meninges). |
| <b>28 dias</b> | Presença de hifas e início de resquícios de células fúngicas mortas; necrose (seta) ;   |
| <b>56 dias</b> | Presença de hifas e resquícios de células fúngicas mortas (seta); tecido em processo de cicatrização.                             |

**Figura 9** – Análise histopatológica do cérebro dos animais infectados com 7, 14, 28, 56 dias de infecção e animal controle.

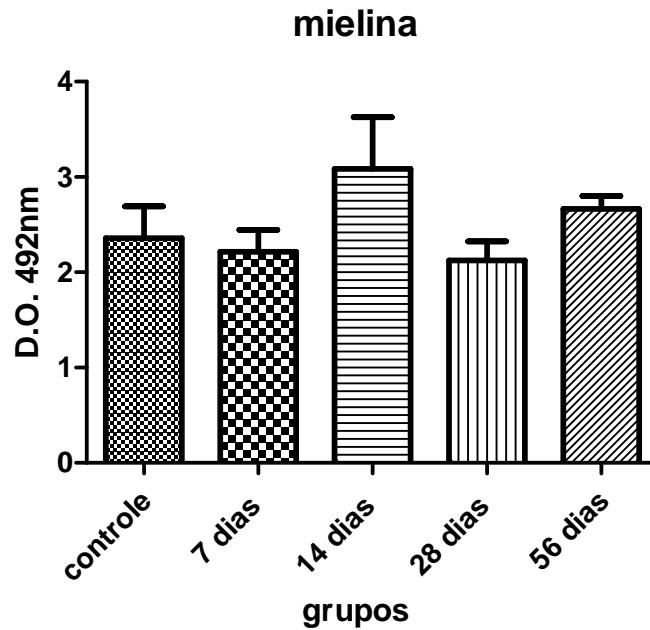




#### 4.8 ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE NÍVEL DE IGG ANTI-MIELINA NO PLASMA

Os resultados obtidos não demonstraram diferenças significativas entre todos os grupos analisados ( $p > 0.05$ ), animais controle ( $2,358 \pm 0,7482$ ) e infectados com 7 ( $2,216 \pm 0,5593$ ), 14 ( $3,086 \pm 1,330$ ), 28 ( $2,126 \pm 0,4915$ ) e 56 dias de infecção ( $2,664 \pm 0,3384$ ) (Figura 10).

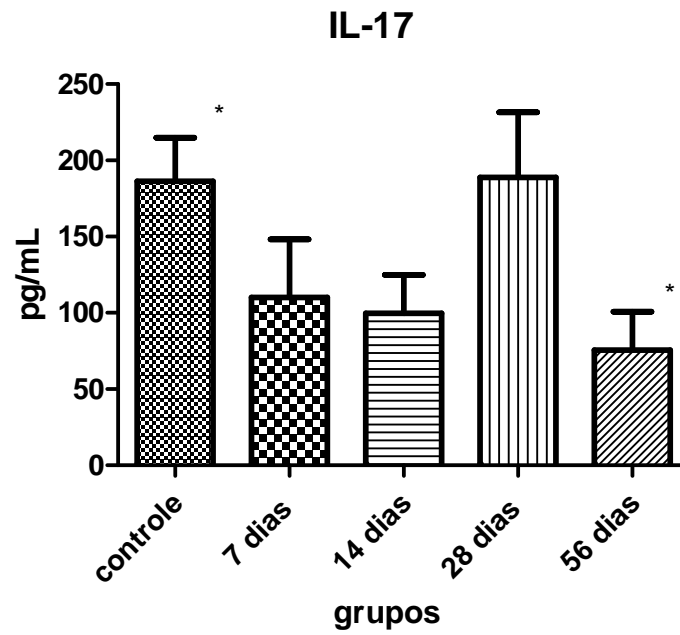
**Figura 10** – Nível de IgG anti-mielina humana em plasmas de camundongos infectados com *C. parapsilosis*. Resultado de ELISA em DO a 492nm em grupo de animais controle, 7, 14, 28 e 56 dias de infecção. Resultados não apresentam diferença significativa ( $p>0.05$ ).



#### 4.9 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE IL-17 EM AMOSTRAS DE CÉREBRO NO DECORRER DA INFECÇÃO

Os resultados obtidos demonstraram diferença significativa apenas entre grupo controle ( $186,3 \pm 63,77$ ) e grupo 56 dias de infecção ( $75,51 \pm 56,50$ ). Os demais grupos não demonstraram diferenças significativas ( $p>0.05$ ), animais infectados com 7 ( $110,0 \pm 85,59$ ), 14 ( $99,68 \pm 56,18$ ) e 28 dias de infecção ( $189,0 \pm 95,48$ ) (Figura 11).

**Figura 11** – Dosagem de níveis de IL-17 em amostra de cérebro dos animais infectados com *C. parapsilosis* (n=40) e controle sem infecção (n=10). Resultados apresentam diferenças significativas apenas no grupo controle comparado com grupo com 56 dias de infecção (p> 0.05).



## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi observada fungemia significativa em baço e fígado de camundongos infectados com *C. parapsilosis* por via endovenosa somente no período de 7 dias pós-infecção e não nos períodos posteriores, sugerindo a eliminação do fungo por sistema imune. Possivelmente a eliminação do fungo no período posterior seja devido a indução de resposta imune específica, não excluindo a possibilidade também da atuação da imunidade inata na fase inicial. Esse resultado é esperado se considerarmos que se trata de espécie de microrganismo de baixa virulência, segundo Trofa (2008).

Considerando que o microrganismo apresenta vida intracelular, a principal resposta protetora deve ser a imunidade celular envolvendo a sub população de linfócitos Th1. Os nossos resultados de avaliação de resposta imune celular por teste de DTH demonstraram resposta significativa a partir de 14 dias de infecção aumentando no decorrer dos dias, apresentando a maior resposta celular no grupo de 56 dias de infecção e coincidente com o período de negatificação de CFU dos órgãos portanto concordante com a importância da resposta celular.

Embora o resultado de CFU tenha sido negativo aos 28 dias pós-infecção, na análise histopatológica foi possível observar a presença de alguns fungos, principalmente na forma de hifas-septadas. Considerando que aos 56 dias não foi observada a presença de fungos íntegros, possivelmente os mesmos não estavam mais viáveis aos 28 dias.

Avaliação de resposta imune celular demonstrou níveis plasmáticos elevados de INF- $\gamma$  nos animais com 28 e 56 dias de infecção, sugerindo a indução de resposta imune celular de padrão Th1, resposta mais relevante na proteção.

Trabalhos recentes demonstram também a importância de anticorpos nas infecções fúngicas como por *Cryptococcus neoformans* e *C. albicans* (NETO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2008). Assim foi realizada a avaliação de nível de IgG anti-CFA de *C. parapsilosis* e os resultados demonstraram aumento significativo nos grupos de 28 e 56 dias de infecção em relação aos demais grupos ( $p < 0.05$ ). Portanto embora a imunidade celular seja o principal mecanismo de defesa, os anticorpos produzidos também devem apresentar atividade complementar no controle da fungemia.

De forma interessante, no período tardio mesmo com a negatividade

de CFU no baço e fígado foi observada alteração comportamental nessa fase. Portanto foi adicionada a análise de carga fúngica e histopatológica em amostras de cérebro. Concordando com os dados de CFU de baço e fígado, foi observada também carga fúngica elevada no cérebro somente no período de 7 dias. O que sugere que o referido isolado apresenta tropismo cerebral todavia com a geração de respostas imunes específicas deve ocorrer controle de infecção no cérebro. Também concordando com as alterações comportamentais, foi observado aumento de lesões cerebrais no período tardio, sugerindo que componentes de fungos mortos e ou as respostas imunes específicas geradas participarem nesse efeito patológico tardio no cérebro.

A acessibilidade do sistema imunitário ao SNC é diferente devido à três grandes maneiras (FURTADO et al., 2009). A presença de uma barreira hemato-encefálica; a ausência de vasos linfáticos, e a ausência de parênquima as células (CROSS et al., 1990; RANSOHOFF et al., 2003; ALOISI et al., 2000).

No entanto, diversas patologias no SNC são acionados por perturbações neste equilíbrio com o acúmulo de células T e desenvolvimento de inflamação (FURTADO et al., 2009). Como resultado da inflamação, a mielina e micróglia são fagocitados por macrófagos ativados (KWIDZINSKI; BECHMANN, 2007), o que poderia também ocorrer danos devido a atuação de anticorpos autoimunes a mielina. O presente trabalho analisou nível plasmático de IgG anti-mielina e os resultados obtidos demonstraram nível similar de IgG anti-mielina nos grupos de animais infectados, independentemente de período, com o controle não infectado, sugerindo que a destruição tecidual do cérebro não se deve a indução de auto anticorpos anti-mielina.

A citocina IL-17 pode mediar a proteção contra patógenos extracelulares no recrutamento de neutrófilos, mas também pode causar imunopatologia em vários modelos de autoimunidade (WEAVER et al., 2007; GAFFEN, 2008). Várias evidência indicam que o TH-17 está envolvido no aparecimento e manutenção de encefalomielite autoimune experimental (EAE) (STEINMAN, 2007). EAE é uma doença do SNC mediada por células TCD4<sup>+</sup>, que é usado como um modelo da esclerose múltipla, uma doença inflamatória, desmielinizante do SNC humano (REBOLDI et al., 2009). Considerando que a IL-17 apresenta papel regulador da resposta imune celular e considerando a possibilidade de participação de forma indireta modulando resposta imune local contribuindo na

lesão cerebral, o presente trabalho determinou nível de IL-17 no tecido cerebral. No entanto não foi observada alteração significativa.

A citocina pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  induz a expressão de indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO) em diversos tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas (DC), e fibroblastos (CARLIN et al., 1989), sendo que essa expressão representa um importante mecanismo de resistência antimicrobiana aos parasitas (KWIDZINSKI; BECHMANN, 2007; PFEFFERKORN, 1984; SANNI et al., 1998; SILVA et al., 2002) e de bactérias (NETTELNBREKER, 1998; BEATTY et al., 1994; MACKENZIE et al., 1998). A expressão de IDO pode ocorrer no cérebro e micróglia de murinos e humanos sob o tratamento com IFN- $\gamma$  (ALBERATI-GIANI et al., 1996; HEYES et al., 1996). A indução de IDO no SNC é delicada porque vários metabólitos da via kynurenine apresentam ter efeitos neurotóxicos bem estabelecidos (SCHWARCZ et al., 1983).

IDO representa a primeira taxa de enzima limitante da via kynurenine em tecidos extra-hepáticos (KWIDZINSKI; BECHMANN, 2007) e a indução dessa via pode estar envolvido em *down modulation* de uma infecção fúngica do trato gastrointestinal com a *C. albicans* (BOZZA, 2005).

Os metabólitos dessa via kynurenine no cérebro, apresenta dois produtos de degradação do triptofano (Trp), ácido quinolínico (Quin) e ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA), que apresentam propriedades neurotóxicas. (STONE; PERKINS, 1981).

Em concentrações micromolares, o efeito citotóxico de Quin pode ser observada em culturas de células do córtex neuronal (CHIARUGI et al., 2001). O mesmo efeito é encontrado in vivo, onde injeção intracerebral de Quin induz lesões citotóxicas (SCHWARCZ et al., 1983).

O segundo metabólito neurotóxico do Trp é 3-HAA, que é instável sob condições fisiológicas. Após auto-oxidação espontânea, 3-HAA produz radicais reativos, que por sua vez, induzir estresse oxidativo e apoptose em neurônios (EASTMAN; GUILARTE, 1990; OKUDA et al., 1996; CHIARUGI et al., 2001).

Por isso, Kwidzinski e Bechmann (2007) sugerem que o trauma induzido pela ativação IDO induz dano neuronal secundário através acúmulo de metabólitos neurotóxicos.

Assim, durante a infecção, a indução de IDO pode exercer efeitos divergentes: por um lado, limita o crescimento do agente infeccioso, mas também

potencializa a resposta imune (KWIDZINSKI; BECHMANN, 2007).

Embora o nível elevado de INF tenha sido observado no plasma, uma hipótese seria que esse aumento poderia induzir a expressão de IDO e ativando a via Kynurenine, poderia causar uma neuroinflamação mediada por metabolitos neurotóxicos da degradação do triptofano (Trp), explicando o distúrbio neurológico apresentado pelos animais, o que requer estudos adicionais.

Concluimos pelos resultados obtidos que o isolado fúngico *C. parapsilosis* apresenta afinidade pelos tecidos analisados (baço, fígado e cérebro), com potencial de causar alterações comportamentais em camundongos e o mesmo agente é capaz de induzir a resposta imune celular, possivelmente Th1, além de resposta humoral no decorrer da infecção. Essa resposta imune poderia estar participando tanto na proteção, quanto causando uma resposta exacerbada e levando a uma lesão a nível de SNC, o que requer estudos adicionais.

## 6 CONCLUSÕES

- Isolado identificado como *C. parapsilosis* apresenta tropismo por tecido hepático, esplênico e cerebral de camundongos.
- A permanência do fungo apenas no período inicial de 7 e 14 dias pós infecção sugere que o isolado *C. parapsilosis* apresenta baixa virulência em camundongos swiss.
- O isolado clínico *C. parapsilosis* apresenta a capacidade de induzir resposta imune celular, possivelmente com desvio para Th1 em camundongos swiss infectados.
- No decorrer de infecção de camundongos swiss por isolado *C. parapsilosis* ocorre aumento na resposta imune celular e humoral, ocorrendo no mesmo período diminuição e negatização de fungemia, o que poderia sugerir a importância da imunidade na resistência murina à infecção.
- O isolado *C. parapsilosis* apresenta a capacidade de induzir alteração comportamental no período tardio de infecção, levando a lesões no tecido cerebral.
- Se esse distúrbio neurológico pode ser causado pelo aumento dos níveis da citocina inflamatória INF- $\gamma$ , causando a ativação da via kynurenine e neuroinflamação mediada por metabólitos neurotóxicos da degradação do triptofano, requer estudos adicionais.

## REFERÊNCIAS

- ABI SAID, D.; ANNAISSIE, E. Epidemiology of Nonalbicans *Candida* spp. *Bailliere's Clin. Infect. Dis*, 7: 1131-1133, 1998
- ALBERATI-GIANI, D.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; KOHLER, C.; CESURA, A. M. Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon-gamma in murine cloned macrophages and microglial cells. *J. Neurochem*, 66: 996-1004, 1996.
- ALOISI, F.; RIA, F.; ADORINI, L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol. Today*, 21: 141-147, 2000.
- ALVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Vulvovaginal candidiasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 43. n. 5: 319-327, 2007
- ASHFORD, B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 8: 507-538, 1928.
- BEATTY, W. L.; BELANGER, T. A.; DESAI, A. A.; MORRISON, R. P.; BYRNE, G. I. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon- mediated chlamydial persistence. *Infect. Immun*, 62: 3705-3711, 1994.
- BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A.; CENCI, E.; SBARAGLIA, G.; PERITO, S.; CASSONE, A. A comparison of experimental pathogenicity of *Candida* species in cyclophosphamide-immunodepressed mice. *Sabouraudia*, 22(5): 409-18, 1984.
- BONASSOLI, L. A. **High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts**. Monografia (Especialização em Análises Clínicas) – Universidade Estadual de Maringá, 2004.
- BOZZA, S.; FALLARINO, F.; PITZURRA, L.; ZELANTE, T.; MONTAGNOLI, C.; BELLOCHIO, S.; MOSCI, P.; VACCA, C.; PUCETTI, P.; ROMANI, L. A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. *J. Immunol*, 174: 2910-2918, 2005.
- CARLIN, J. M.; BORDEN, E. C.; SONDEL, P. M.; BYRNE, G. I. Interferon-induced indoleamine 2,3- dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J. Leukoc. Biol*, 45: 29-34, 1989.
- CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F.; PONTIERI, E.; CARRUBA, G.; GIRMENIA, C.; MARTINO, P.; FERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, M.; QUINDÓS, G.; PONTÓN, J. Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J. Infect. Dis*, 171(4): 967-75, 1995.
- CENCI, E.; MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; FE` D'OSTIANI, C.; MOSCI, P.; KOPF, M.; ROMANI, L. IFN- $\gamma$  is required for IL-12 responsiveness in mice with *Candida albicans* infection. *J. Immunol*, 161: 3543-3550, 1998.

CHIARUGI, A.; COZZI, A.; BALLERINI, C.; MASSACESI, L.; MORONI, F. Kynurenine 3-mono-oxygenase activity and neurotoxic kynurenine metabolites increase in the spinal cord of rats with experimental allergic encephalomyelitis. **Neuroscience**, 102: 687-695, 2001.

CHIARUGI, A.; MELI, E.; MORONI, F. Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. **J. Neurochem**, 77: 1310-1318, 2001.

COLEMAN, D. C.; RINALD, M. G.; HAYNES, K. A.; REX, J. H.; SUMMERBELL, R. C.; ANAISSIE, E. J.; LI, A.; SULLIVAN, D. J. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Med. Mycol**, 36 (1): 156-65, 1998.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções por *Candida spp.* **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 36(5): 599-607, 2003.

CROSS, A. H.; CANNELLA, B.; BROSNAN, C. F.; RAINE, C. S. Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes: I. Localization of 14C-labeled cells during acute, chronic, and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. **Lab. Invest**, 63: 162-170. 1990.

DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN, J. S.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. (Ed.). **Medical Mycology**. 1. ed. Churchill Livingstone, 2003, p. 195-239.

DIÓGENES, M. J. N.; GONÇALVES, H. M. G.; MAPURUNGA, A. C. P.; ALENCAR, K. F.; ANDRADE, F. B.; NOGUEIRA-QUEIROZ, J. A. Reações à histoplasmina e paracoccidioidina na serra de pereiro (Estado do Ceará – Brasil). **Rev. Inst. Med. Trop.**, 32(2): 116-120, 1990.

EASTMAN, C. L.; GUILARTE, T. R. The role of hydrogen peroxide in the in vitro cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine. **Neurochem. Res.**, 15: 1101-1107, 1990.

FELL, J. W.; MEYER, S. A. Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, 32: 177-193, 1967.

FILLER, S. G.; KULLBERG, B. J. Deep-seated candidal infections. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. (Ed.). **Medical Mycology**. 1. ed. Churchill Livingstone, p. 341-348, 2003.

FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, 9: 499-511, 1996.

GAFFEN, S. L. An overview of IL-17 function and signaling. **Cytokine**, 43: 402-407, 2008.

GIRMENIA, C.; MARTINO, P.; DE BERNARDIS, F. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors and differential pathogenicity of the causative strains. **Clin. Infect. Dis.**, 23: 506±514, 1996.

HEYES, M. P.; ACHIM, C. L.; WILEY, C. A.; MAJOR, E. O.; SAITO, K.; MARKEY, S. P. Human microglia convert L-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. **Biochem. J**, 320: 595–597, 1996.

KAO, A. S.; BRANDT, M. E.; PRUITT, W. R. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. **Clin. Infect. Dis.**, 29: 1164-70, 1999.

KRCMERY JR, V. Risk factors and outcome of nonalbicans candidemia: Report of 38 cases. **Acta. Chemoth**, 8: 23±28, 1998.

\_\_\_\_\_. Candidemia in cancer patients: Risk factors and outcome in 140 episodes from a single cancer institution. **Acta. Chemoth**, 5: 133±145, 1999.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J. Hosp. Infect**, 50: 243-260, 2002.

KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect. Immun**, 70: 878-888, 2002.

KWIDZINSKI, E.; BECHMANN, I. IDO expression in the brain: a double-edged sword. **J. Mol. Med.**, 85: 1351-1359, 2007.

LACAZ, C. S. et al. Tratado de micología médica. **Sarvier**, 9: 1104, 2002.

LEVIN, A. S.; COSTA, S. F.; MUSSI, N. S. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 30: 243-249, 1998.

LEVY, I.; RUBIN, L. G.; VASISHTHA, S.; TUCCI, V.; SOOD, S. K. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. **Clin. Infect. Dis.**, 26: 1086-1088, 1998.

LOURIA, D. B. Candida infections in experimental animals. In: BODEY, G. P.; FAINSTEIN, V. (Ed.). **Candidiasis**. [S. I.]: Raven Press, 1985, p. 29-51.

LUNEL, F. M. V.; MEIS, J. F. G. M.; VOSS, A. Nosocomial fungal Infections: candidemia. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 34: 213-220, 1999.

MACKENZIE, C. R.; HADDING, U.; DAUBENER, W. Interferongamma- induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. **J. Infect. Dis.**, 178: 875–878, 1998.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; BISTONI, F.; DEL SERO, G.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; FE` D'OSTIANI, C.; ROMANI, L. Specific and non-specific immunity to *Candida albicans*: a lesson from genetically modified animals. **Res. Immunol**, 149: 352-336, 1998.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; DEL SERO, G.; FE` D'OSTIANI, C.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; MONTAGNOLI, C.; BACCI, A.; BISTONI, F.; QUESNEAUX, V. F. J.; RYFFEL, B.; ROMANI, L. Defective co-stimulation and impaired Th1 development in tumor necrosis factor/lymphotoxin-a double-deficient mice infected with *Candida albicans*. **Int. Immunol**, 10: 37-48, 1998.

NCBI BLAST. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>>. Acesso em: 27 nov. 2009.

NETO, M. M.; MUGLIA, V.; BATISTA, M. E. P. N.; PISI, T. M.; SABER, L. T. S.; FERRAZ, A. S.; SUAID, H. J.; COLOGNA, A. J.; FIGUEIREDO, J. F. C. Infecção por fungos e Transplante Renal: Análise nos primeiros 500 pacientes transplantados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. **J. Bras. Nefrol**, 17(3): 162-170, 1995.

NETO, R. J. P.; GUIMARÃES, M. C.; MOYA, M. J.; OLIVEIRA, F. R.; JÚNIOR, P. L.; MARTINEZ, R. Hipogamaglobulinemia como fator de risco para infecção por *Cryptococcus neoformans*: a propósito de dois casos. **Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.**, 33(6): 603-608, 2000.

NETTELNBREKER, E.; ZEIDLER, H.; BARTELS, H.; DRESES-WERRINGLOER, U.; DAUBENER, W.; HOLTSMANN, H.; KOHLER, L. Studies of persistent infection by *Chlamydia trachomatis* serovar K in TPA-differentiated U937 cells and the role of IFN-gamma. **J. Med. Microbiol.**, 47: 141-149, 1998.

NOSEK, J.; HOLESOVA, Z.; KOSA, P.; GACSER, A.; TOMASKA, L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. **Curr. Genet.**, 55: 497-509, 2009.

ODDS, F. C. *Candida and candidosis*. **Balliere Tindall**. 2. ed. 1988.

OKUDA, S.; NISHIYAMA, N.; SAITO, H.; KATSUKI, H. Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 12553-12558, 1996.

PAPADIMITRIOU, J. M.; ASHMAN, R. B. The pathogenesis of acute systemic candidiasis in a susceptible inbred mouse strain. **J. Pathol**, 150: 257-265, 1986.

PARKER, J. C. J.; MCCLOSKEY, J. J.; SOLANKI, K. V.; GOODMAN, N. L. Candidosis: the most common postmortem cerebral mycosis in an endemic fungal area. **Surg. Neurol**, 6: 123, 1976.

PEREIRA, S. A. L.; RODRIGUES, D. B. R.; CORREIA, D.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Identificação de agentes infecciosos pulmonares em autópsias de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 35(6): 635-639, 2002.

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clin. Infect. Dis**, 22: S89-94, 1996.

- PFEFFERKORN, E. R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cell to degrade tryptophan. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 81: 908-912, 1984.
- RANSOHOFF, R. M.; KIVISAKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nat. Rev. Immunol**, 3: 569-581, 2003.
- REBOLDI, A.; COISNE, C.; BAUMJOHANN, D.; BENVENUTO, F.; BOTTINELLI, D.; LIRA, S.; UCCELLI, A.; LANZAVECCHIA, A.; ENGELHARDT, B.; SALLUSTO, F. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. **Nat. Immunol**, 10(5): 514-23, 2009.
- REX, J. H.; PFALLER, M. A.; BARRY, A. L.; NELSON, P. W.; WEBB, C. D. For the NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group: Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. **Ant. Ag. Chemoth**, 39: 40±44, 1995.
- ROMANI, L.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; SPACCAPELO, R.; GROHMANN, U.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Gamma interferon modifies CD41 subset expression in murine candidiasis. **Infect. Immun**, 60: 4950-4952, 1992.
- ROMANI, L.; MENCACCI, A.; TONNETTI, L.; SPACCAPELO, R.; CENCI, E.; WOLF, S.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Interleukin-12 but not interferon-g production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis. **Eur. J. Immunol**, 24: 909-915, 1994.
- ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; TONIATTI, C.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F.; POLI, V. Impaired neutrophil response and CD41 T helper cell 1 development in interleukin-6-deficient mice infected with *Candida albicans*. **J. Exp. Med**, 183: 1-11, 1996.
- SANNI, L. A.; THOMAS, S. R.; TATTAM, B. N.; MOORE, D. E.; CHAUDHRI, G.; STOCKER, R.; HUNT, N. H. Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and noncerebral malaria. **Am. J. Pathol**, 152: 611-619, 1998.
- SCHWARCZ, R.; WHETSELL JR, W.O.; MANGANO, R. M. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. **Science**, 219: 316-318, 1983.
- SEBGHATI, T. S.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. **Science**, 290: (5495): 1311-1312, 2000.
- SILVA, C. R. G.; MELO, K. E.; LEÃO, M. V. P.; RUIS, R.; JORGE, A. O. C. Presença de *Candida* nas mucosas vaginal e bucal e sua relação com IgA salivar. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, 30(6): 300-305, 2008.

SILVA, N. M.; RODRIGUES, C. V.; SANTORO, M. M.; REIS, L. F.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; GAZZINELLI, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation and kynurenine formation during *in vivo* infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infect. Immun.**, 70: 859-868, 2002.

SPACCAPELO, R.; ROMANI, L.; TONNETTI, L.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; TOGNELLINI, R.; REED, S. G.; PUCCHETTI, P.; BISTONI, F. TGF- $\beta$  is important in determining the *in vivo* susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. **J. Immunol**, 155: 1349-1360, 1995.

STEINMAN, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat. Med.**, 13: 139-145, 2007.

STONE, T. W.; PERKINS, M. N. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. **Eur J Pharmacol**, 72: 411-412, 1981.

TONNETTI, L.; SPACCAPELO, R.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; PUCCHETTI, P.; COFFMAN, R. L.; BISTONI, F.; ROMANI, L. Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. **Eur. J. Immunol**, 25: 1559-1565, 1995.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, 21(4):606-25, 2008.

VISCOLI, C.; GIRMENIA, C.; MARINUS, A. Candidemia in cancer patients: A prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clin. Infect. Dis**, 28: 1071±1079, 1999.

VOSS, A.; KLUYTMANS, J. A.; KOELEMAN, J. G.; SPANJAARD, L.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; VERBRUGH, H. A.; VOS, M. C.; WEERSINK, A. Y.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A.; MEIS, J. F. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch university hospitals. **Euro. J. Clin. Microb. Infec. Dis**, 15: 909-912, 1996.

WEAVER, C. T.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu. Rev. Immunol**, 25: 821-852, 2007.

WEEMS JR, J. J. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. **Clin. Infect. Dis**, 14:756-766, 1992.

\_\_\_\_\_. *Candida parapsilosis*: Epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations and antimicrobial susceptibility. **Clin. Infect. Dis**, 14: 756±766, 1992.

WHEAT, L. J.; SAROSI, G.; MCKINSEY, D.; HAMILL, R.; BRADSHAW, R.; JOHNSON, P.; LOYD, J. KAUFFMAN, C. Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis**, 30:688-695, 2000.

WHEAT, L. J.; KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Clin. Infect. Dis**, 17:1-19, 2003.