

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/07/2020.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Marcelo D'Alessandre Sanches

**Infecção experimental por *Candida* spp.
e tropismo para o sistema nervoso central**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Cilmary Suemi Kurokawa
Coorientadora: Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva

**Botucatu
2018**

Marcelo D'Alessandre Sanches

Infecção experimental por *Candida* spp.
e tropismo para o sistema nervoso central

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Cilmary Suemi Kurokawa
Coorientadora: Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Sanches, Marcelo D'Alessandre.

Infecção experimental por *Candida* spp. e tropismo para o sistema nervoso central / Marcelo D'Alessandre Sanches. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Cilmary Suemi Kurokawa

Coorientador: Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva

Capes: 40101096

1. Candidíase. 2. Imunossupressão. 3. Infecção. 4. Resposta imune. 5. Sistema nervoso central - Infecções. 6. Estudos experimentais.

Palavras-chave: Candidíase sistêmica; Imunossupressão; Infecção experimental; Resposta imune periférica; Sistema nervoso central.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARCELO D'ALESSANDRE SANCHES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS, DA FACULDADE DE MEDICINA.

Aos 30 dias do mês de julho do ano de 2018, às 09:00 horas, no(a) Sala 17 da Central de Aulas da FM/Botucatu - Unesp, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. CILMERY SUEMI KUOKAWA - Orientador(a) do(a) Depto. de Pediatria / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI do(a) Depto. de Microbiologia e Imunologia / IB/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. ELIANA PERESI LORDELO do(a) Universidade do Oeste Paulista (Unoeste) / Presidente Prudente, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARCELO D'ALESSANDRE SANCHES, intitulada **Infecção experimental por Candida spp. e tropismo para o sistema nervoso central**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: _____ *Aprovada*. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão

Profa. Dra. CILMERY SUEMI KUOKAWA

Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI

Profa. Dra. ELIANA PERESI LORDELO

A Deus e a minha família,
dedico-lhes este trabalho como
forma de reconhecimento pela
oportunidade da realização de
um sonho.

Agradecimentos

A minha orientadora Profa. Dra. Cilmary Suemi Kurokawa, por sua confiança e orientação com apontamentos precisos e competentes no desenvolvimento deste trabalho.

A minha coorientadora Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva, por sua competência e empenho no progresso da pesquisa.

A Profa. Dra. Alexandrina Sartori, pela disponibilidade e postura colaborativa que permearam a evolução do trabalho.

A equipe do Laboratório de Vacinas e Imunomodulação, Luiza Ayumi Nishiyama Mimura, Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira, Larissa Lumi Watanabe Ishikawa, Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento, Juliana Helena dos Santos de Toledo, Patrícia Aparecida Borim, Evelyn da Silva Oliveira, Natália Munhoz Alves, Karen Henriette Pinke e Aline Parisoto Missio, por todo apoio teórico e prático para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bagagli, do Departamento de Microbiologia e Imunologia (IBB – Unesp), por gentilmente ceder as cepas de *Candida* spp..

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) e em especial a Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), que possibilitaram a conquista de mais um desafio.

Ao Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo suporte acadêmico.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) e em especial ao Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelo suporte técnico.

A Seção Técnica de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu e em especial a Bruna Quirino da Silva Jorgetto, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, por toda atenção e simpatia.

A todos os professores desta instituição, cuja intervenção em diferentes momentos propiciaram sabedoria para buscar sempre o melhor.

Aos membros titulares da Banca do Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio e Prof. Dr. Eduardo Bagagli, pela contribuição com o trabalho.

Aos membros titulares e suplentes da Banca de Defesa de Dissertação, Prof. Dr. Eduardo Bagagli, Profa. Dra. Eliana Peresi Lordelo, Profa. Dra. Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo e Profa. Dra. Vanessa Soares Lara, por aceitarem o convite e por seus ensinamentos a serem compartilhados.

Aos meus amigos de curso, em especial Cláudia Rosana Trevisani Corrêa e Daniel do Carmo de Camargo, pelos momentos de aprendizagem que passamos juntos.

Ao Centro Paula Souza (CPS), pela concessão do afastamento durante todo o período de realização do Mestrado.

Ao meu amor Juliana de Araujo Cubas da Silva, agradeço como forma de reconhecimento ao carinho, paciência, compreensão, ajuda e incentivo incondicional em todos os momentos deste trabalho de pesquisa.

Aos camundongos, que de maneira involuntária doaram suas vidas para o crescimento e o enriquecimento da Ciência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que o conhecimento esteja ao alcance das pessoas.

“Humanity is exalted not because we are so far above other living creatures, but because knowing them well elevates the very concept of life.”

E. O. Wilson

Resumo

SANCHES, M. A. **Infecção experimental por *Candida* spp. e tropismo para o sistema nervoso central**. 2018. 59 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, 2018.

O gênero *Candida* inclui fungos comensais que podem causar infecções locais e sistêmicas, com envolvimento frequente de órgãos vitais, incluindo o sistema nervoso central (SNC). *Candida* spp. ocupam o quarto lugar entre as infecções que atingem o SNC. Entre os pacientes em terapia imunossupressora, a incidência de *Candida* não-*albicans* tem aumentado tanto quanto a incidência de *C. albicans*. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as alterações no SNC após infecção sistêmica por espécies de *Candida* não-*albicans* em camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. Camundongos C57BL6, fêmeas adultas, foram infectados por via venosa com leveduras de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* e imunossuprimidos com prednisolona. As três espécies de *Candida* disseminaram para o SNC de animais imunocompetentes. O efeito do tratamento com prednisolona foi avaliado pela variação do peso corporal, análise microbiológica e histopatológica do SNC, e produção de citocinas de células esplênicas nos 3 e 14 dias após infecção. A imunossupressão resultou na perda de peso corporal, em leucopenia e reduziu a produção de IL-2 no baço. No dia 14 após infecção, a carga fúngica diminuiu no SNC de camundongos imunocompetentes e aumentou nos imunossuprimidos. Intenso infiltrado inflamatório associado a um perfil de células Th1 foi observado em amostras de cérebro de camundongos imunossuprimidos e infectados com *C. krusei*, em comparação com camundongos imunocompetentes infectados. Em conjunto, esses resultados indicam que *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* também são capazes de se disseminarem para o SNC e promoverem inflamação local. Além disso, eles demonstraram que a corticoterapia aumenta a carga fúngica no SNC. É possível que a neuroinflamação desencadeada por *Candida* possa ser ainda mais deletéria quando associada a outras patologias do SNC.

Palavras-chave: candidíase sistêmica; imunossupressão; infecção experimental; resposta imune periférica; sistema nervoso central.

Abstract

SANCHES, M. A. **Experimental infection by *Candida* spp. and tropism to the central nervous system.** 2018. 59 p. Thesis (Master) – Botucatu Medical School, São Paulo State University (Unesp), Botucatu, 2018.

The genus *Candida* includes commensal fungi that can cause local and systemic infections, with frequent involvement of vital organs, include central nervous system (CNS). *Candida* spp. occupy the fourth place among infections in the CNS. Among patients on immunosuppressive therapy, the incidence of *Candida non-albicans* has increased as much as the incidence of *C. albicans*. In this context, the objective of this work was to characterize the changes in the CNS after a systemic infection by non-*albicans* *Candida* species in immunocompetent and immunosuppressed mice. Adult female C57BL/6 mice were intravenously infected with *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* yeasts and were immunosuppressed with prednisolone. All *Candida* spp. disseminated to the brain and spinal cord samples from immunocompetent animals. The effect of prednisolone treatment was evaluated by body weight variation, microbiological and histopathological analysis of the CNS, and spleen cells cytokine production on days 3 and 14 post-infection. The immunosuppression resulted in body weight loss, in leukopenia and reduced IL-2 production in the spleen. At day 14 post-infection, CNS fungal load decreased in the immunocompetent mice and increased in the immunosuppressed ones. Inflammatory infiltration associated to a Th1 cells profile was higher in brain samples of *C. krusei* immunosuppressed compared with immunocompetent infected mice. Altogether, these results indicate that *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* are also able to disseminate, reach the CNS and promote local inflammation. In addition, they clearly show that corticotherapy increases fungal load in the CNS. It is possible that the neuroinflammation triggered by *Candida* can be even more deleterious in other CNS pathologies.

Key words: systemic candidiasis; immunosuppression; experimental infection; peripheral immune response; central nervous system.

Lista de abreviaturas e siglas

Aids	acquired immune deficiency syndrome
Als	agglutinin-like sequence
BBB	blood-brain barrier
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CEUA	comissão de ética no uso de animais
DCs	dendritic cells
et al.	colaboradores
gp	glycoprotein
HBMECs	human brain microvascular endothelial cells
HIV	human immunodeficiency virus
HK- <i>Candida</i>	heat-killed <i>Candida</i>
IL	interleukin
NF- κ B	nuclear factor kappa-beta
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
q-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
SNC	sistema nervoso central
spp.	species
Th	T helper
TLRs	toll-like receptors
Treg	regulatory T
UFC	unidades formadoras de colônias
UTI	unidade de tratamento intensivo

Sumário

CAPÍTULO I	11
1 REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1 Aspectos gerais do gênero <i>Candida</i>	12
1.2 Distribuição geográfica e epidemiologia	16
1.3 Infecções caudas por espécies de <i>Candida não-albicans</i>	18
1.4 Efeito de imunossuppressores associados com <i>Candida</i>	20
1.5 Relação entre <i>Candida</i> e SNC	21
1.6 Justificativa	24
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
2.2.1 Protocolo experimental I	26
2.2.2 Protocolo experimental II	27
3 REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO II	39
4 ARTIGO CIENTÍFICO	40
CONCLUSÕES	56
ANEXO	58
ANEXO A – CERTIFICADO Nº 1206/2017-CEUA	59

Acknowledgments

Special thanks to Professor Eduardo Bagagli (UNESP, Botucatu, SP, Brazil) for kindly donating the *Candida* strains. The authors have no conflicts of interest to declare that are directly relevant to the content of this article.

References

- ALONSO, R.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, A. N.; PISA, D.; CARRASCO, L. Multiple sclerosis and mixed microbial infections. Direct identification of fungi and bacteria in nervous tissue. **Neurobiology of Disease**, v. 117, p. 42-61. 2018.
- BENITO-LEÓN, J. et al. Association between multiple sclerosis and *Candida* species: evidence from a case-control study. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, n. 29, p. 1139-1145. june. 2010.
- BRATTSAND, R.; LINDEN, M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 10, suppl 2, p. 81-90. 1996.
- BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. **Trends In Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 333-338. august. 1999.
- CHASTAIN, E. M.; MILLER, S. D. Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. **Immunol. Rev.**, v. 245, p. 227-238. 2012.
- DOUGHERTY, T. F. Adrenal Cortical Control of Lymphatic Tissue Mass. In: F. STOULMN (ed.), *The Kinetics of Cellular Proliferation*, pp. 264-274. **New York**: Grune & Stratton, 1959.
- EGGIMANN, P. et al. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 3, p. 685-702. november. 2003.
- EPP, L. M.; MRAVEC, B. Chronic polysystemic candidiasis as a possible contributor to onset of idiopathic Parkinson's disease. **Bratisl Lek Listy.**, v. 107, n. 6-7, p. 227-230, 2006.
- FAIX, R. G.; CHAPMAN, R. L. Central Nervous System Candidiasis in the High-risk Neonate. **Seminars in Perinatology**, v. 27, n. 5, p. 384-392. october. 2003.
- FRAGA-SILVA, T. F. C. et al. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Development Is Aggravated by *Candida albicans* Infection. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, n. 635052, p. 1-11. january. 2015.
- GÓRALSKA, K.; BLASZKOWSKA, J.; DZIKOWIEC, M. Neuroinfections caused by fungi. **Infection**, doi. 10.1007/s15010-018-1152-2. 2018.
- GRUVER-YATES, A. L.; CIDLOWSKI, J. A. Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on

- Apoptosis: A Double-Edged Sword. **Cells**, v. p. 202-223. 2013.
- HANSON, R. G.; PETERS, M. G.; HOOFNAGLE, J. H. Effects of Immunosuppressive Therapy with Prednisolone on B and T Lymphocyte Function in Patients with Chronic Type B Hepatitis. **Hepatology**, v. 6, n. 2, p. 173-179. 1986.
- HEROLD, M. J.; MCPHERSON, K. G.; REICHARDT, H. M. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 60-72. 2006.
- HORST, H. J.; FLAD, H. D. Corticosteroid-interleukin 2 interactions: inhibition of binding of interleukin 2 to interleukin 2 receptors. **Clin Exp Immunol.**, v. 68, n. 1, p. 156-161. Apr. 1987.
- JONG, A.Y. et al. Traversal of *Candida albicans* across Human Blood-Brain Barrier In Vitro. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4536-4544. july. 2001.
- LI, H. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities and mechanism of heteropolytungstates against *Candida* species. **Scientific Reports**, v. 7, n. 16942, p.1-9. december. 2017.
- LIU, Y. et al. Mechanisms of *Candida albicans* Trafficking to the Brain. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 10, p. 1-13. october. 2011.
- MATTSON, M. P. Energy Intake and Exercise as Determinants of Brain Health and Vulnerability to Injury and Disease. **Cell Metab.**, v. 16, n. 6, p. 706-722. december. 2012.
- MURTHY, J. M. K.; SUNDARAM C. Fungal infections of the central nervous system. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 121, n. 3, p. 1383-1401. 2014.
- PANACKAL, A. A.; WILLIAMSON, P. R. Fungal Infections of the Central Nervous System. **Continuum (Minneap Minn)**, v. 21, n. 6, p. 1662-1678. december. 2015.
- PISA, D. et al. Different Brain Regions are Infected with Fungi in Alzheimer's Disease. **Scientific Reports.**, v. 5, n. 15015, p. 1-13. october. 2015.
- PISA, D. et al. Fungal infection in a patient with multiple sclerosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, may. 2011.
- PISA, D. et al. Fungal infection in cerebrospinal fluid from some patients with multiple sclerosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, n. 32, p. 795-801. january. 2013.
- RATNASEELAN, A. M.; et al. Effects of Mycotoxins on Neuropsychiatric Symptoms and Immune Processes. **Clin Ther.**, v. 40, n. 6, p. 903-917. june. 2018.
- RICHARDSON, J. P.; MOYES, D. L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 327-337. may/june. 2015.
- SALI, A.; et al. Glucocorticoid-treated mice are an inappropriate positive control for long-term preclinical studies in the *mdx* mouse. **PLoS ONE.**, v. 7:e34204. 2012.

- SAROUKOLAEI, S. A.; et al. The role of *Candida albicans* in the severity of multiple sclerosis. *Mycoses*, v. 59, n. 11, p. 697-704. 2016.
- SMITH, L.K.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. **Prog. Brain Res.**, v. 182, p. 1-30. 2010.
- TAKAKURA, N. et al. A Novel Murine Model of Oral Candidiasis with Local Symptoms Characteristic of Oral Thrush. **Microbiol. Immunol.**, v. 47, n. 5, p. 321-326. february. 2003.
- WU, P. F.; et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-*albicans Candida* species from cancer patients. **Emerg Microbes Infect.**, v. 6, n. 10: e87. Oct. 2017.
- YAMPOLSKY, C. et al. Fungal cerebral abscess in a diabetic patient successfully treated with surgery followed by prolonged antifungal therapy. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 27, n. 1, p.6-9. march. 2010.
- YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther Clin Risk Manag.**, v. 10, p. 95-105. 2014.

CONCLUSÕES

- I. As três espécies de *Candida* estudadas têm a capacidade de se disseminarem para o SNC atingindo o cérebro e a medula;
- II. Os estados de imunossupressão estão associados a uma maior disseminação de *Candida* spp. para o SNC.