

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**O papel do inflamassoma na infecção induzida pelas formas
saprófitas do fungo *Fonsecaea pedrosoi***

RAFFAEL JÚNIO ARAÚJO DE CASTRO

Brasília - DF

Fevereiro/2016

RAFFAEL JÚNIO ARAÚJO DE CASTRO

**O papel do inflamassoma na infecção induzida pelas formas
saprofíticas do fungo *Fonsecaea pedrosoi***

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da
Universidade de Brasília, como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do Título de Mestre em
Patologia Molecular.**

Orientadora: Prof.^a Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília - DF

Fevereiro/2016

Agradecimentos

À minha família, em especial, minha mãe, meu pai e meu irmão, pelo amor e apoio incondicional.

À minha orientadora, Anamélia L. Bocca, pelo direcionamento acadêmico por todos esses anos e pela confiança depositada em mim.

Ao professor Aldo H. Tavares, pelas conversas de tamanha importância para o delineamento deste trabalho.

À Luana Camargo, pelo carinho e presença mesmo nos momentos mais turbulentos.

Àqueles que se mostraram mais do que colegas de curso, mas amigos para a vida: Yuri Ferreira, Lucas Silva, Rojeanne América, Juliana de Oliveira, Yasmin Lima, Tayane Campos, Jéssica dos Anjos, Agnelo de Souza, Hadassa Moreira, Lucas Mousinho, Paula Alvim, Caroline de Oliveira, Marta Lorena, Heitor Campos e Miguel Andrade.

A outros importantes amigos que conheci por intermédio da UnB, Pedro Bürgel e Fernando Sá.

À todos os amigos fora deste ciclo, principalmente, aos amigos de infância com quem ainda convivo e compartilho momentos de descontração e nostalgia, Luiz Eduardo e Luís Antônio.

À todos os membros e ex-membros do LIA, em especial, ao Isaque Medeiros, pelo apoio imensurável neste trabalho e no meu aprendizado no laboratório. À Ana Camila, que me iniciou no laboratório e me auxiliou nos meus primeiros passos. Ao Márcio Jerônimo, Luiza Leonhardt, e Angelina Moreschi, tanto pelo auxílio na bancada quanto pela amizade. Ao Pedro Saavedra, Samyra Caxito, Karina Simon e Paulo Jr. pelo companheirismo dentro e fora do laboratório. Agradeço também aos novos integrantes, em especial à professora Larissa Matos. Aos alunos de iniciação científica, Guilherme Silva, Pedro Henrique, Dawanne Silva e Gabriela Spolti.

Aos integrantes do Bioquinut e do Lab3, sempre muito solícitos.

Aos alunos do laboratório LIM1, em especial, aos meus grandes amigos Rafael Corrêa e Raquel Almeida. À professora Kelly Magalhães, por contribuir com os animais nocautes, de grande importância neste estudo.

Aos professores que compõem a banca, pela disposição e interesse em avaliar este trabalho.

Ao técnico Chico, pela amizade e a pronta disposição em ajudar.

Ao CNPq e FAPDF pelo apoio financeiro.

Sumário

Índice de Figuras	VII
Lista de Abreviaturas.....	IX
Resumo	XII
<i>Abstract</i>	XIII
I. Introdução	1
1. Cromoblastomicose	1
2. Polimorfismo fúngico e <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	4
3. Fatores de virulência e melanina.....	8
4. Imunidade antifúngica	13
5. Mecanismos de ativação e o papel dos inflamassomas.....	17
II. Objetivos.....	23
1. Objetivo geral.....	23
2. Objetivos específicos.....	23
III. Materiais e Métodos	24
1. Animais	24
2. Cultura celular.....	24
3. Fungo	25
4. Extração de melanina secretada e da melanina de parede	27
5. Ensaio de interação <i>in vitro</i>	28
6. Ensaio de capacidade fungicida <i>in vitro</i>	29
7. Quantificação de óxido nítrico.....	29
8. Dosagem de citocinas.....	30
9. Ensaio de infecção <i>in vivo</i> e análise da evolução da doença.....	30
10. Análises estatísticas	31
IV. Resultados	32
1. O <i>F. pedrosoi</i> induz a ativação do inflamassoma.....	32

2. Alterações na morfologia do conídio não contribuem para a ativação do inflamassoma.....	34
3. A sinalização via NF- κ B, independentemente de MyD88, leva à ativação do inflamassoma por <i>F. pedrosoi</i>	35
4. A secreção de IL-1 β induzida por <i>F. pedrosoi</i> é dependente de NLRP3, caspase-1, e influenciada pela caspase-8	37
5. O efluxo de potássio, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a liberação de catepsina B estão envolvidos na ativação do inflamassoma NLRP3 por <i>F. pedrosoi</i>	39
6. A viabilidade de <i>F. pedrosoi</i> não interfere na indução da secreção de IL-1 β 41	
7. A melanina contribui para a ativação do inflamassoma.....	43
8. A ativação do inflamassoma <i>in vitro</i> não contribui para a morte de <i>F. pedrosoi</i>	46
9. As proteínas caspase-1/11 e NLRP3, componentes do inflamassoma, contribuem no controle da CBM experimental murina.....	49
10. <i>F. pedrosoi</i> induz a secreção de IL-1 β em linhagem de células humanas.....	52
V. Discussão	53
VI. Conclusões	62
VII. Referências Bibliográficas	63

Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição geográfica mundial da cromoblastomicose de acordo com casos registrados.....	1
Figura 2. Micromorfologia das formas de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	6
Figura 3. Macro e ultramicrografia do <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	7
Figura 4. Esquema comparativo das vias de síntese da melanina l-dopa e DHN.....	12
Figura 5. Estrutura do inflamassoma NLRP3 e os mecanismos de sinalização propostos para sua ativação.....	19
Figura 6. Ativação do inflamassoma por fungos patogênicos.	22
Figura 7. O <i>F. pedrosoi</i> induz a ativação do inflamassoma.....	33
Figura 8. O conídio do <i>F. pedrosoi</i> atinge o estágio de intumescimento celular.....	34
Figura 9. Alterações na morfologia do conídio não contribuem para a ativação do inflamassoma.....	35
Figura 10. A sinalização via NF- κ B, independentemente de MyD88, leva à ativação do inflamassoma por <i>F. pedrosoi</i>	36
Figura 11. A secreção de IL-1 β induzida por <i>F. pedrosoi</i> é dependente de caspase-1 e influenciada pela caspase-8.....	38
Figura 12. A secreção de IL-1 β induzida por <i>F. pedrosoi</i> é dependente de NLRP3 e caspase-1.....	39
Figura 13. O efluxo de potássio, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a liberação de catepsina B estão envolvidos na ativação do inflamassoma NLRP3 por <i>F. pedrosoi</i>	41
Figura 14. A viabilidade de <i>F. pedrosoi</i> não interfere na indução da secreção de IL-1 β	42
Figura 15. A depleção parcial da melanina de parede prejudica a indução da secreção de IL-1 β	44
Figura 16. A melanina contribui para a ativação do inflamassoma.....	45
Figura 17. A ativação do inflamassoma <i>in vitro</i> não contribui para a morte de <i>F. pedrosoi</i>	47
Figura 18. Níveis de NO ₂ do ensaio de capacidade fungicida <i>in vitro</i>	48
Figura 19. Cinética de infecção <i>in vivo</i> com conídios do <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	50

- Figura 20.** Cinética de infecção *in vivo* com propágulos do *Fonsecaea pedrosoi*.....51
- Figura 21.** *F. pedrosoi* induz a secreção de IL-1 β em linhagem de células humanas.....52

Lista de Abreviaturas

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µg – Micrometros

µl – Microlitro

µM – Micromolar

AIM2 – Ausente no Melanoma 2

ANOVA – Análise de Variância

ASC – Proteína do tipo speck associada a apoptose contendo um domínio CARD

ATCC – Coleção de Espécimes em Cultura da América

ATP – Adenosina Trifosfato

Bad1 – adesina 1 de *Blastomyces*

BD – Meio Batata Dextrose

BMDCs – Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea

BMDMs – Macrófagos Derivados da Medula Óssea

CARD – Domínio Recrutador de Caspases

CBM – Cromoblastomicose

Cbp1 – proteína ligante de cálcio 1

CFU – Unidade Formadora de Colônias

CLRs – Receptores do tipo Lectina C

CO₂ – Dióxido de Carbono

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Dano

DHN – 1,8-dihidroxinaftaleno

DNA – Ácido Dextrorribonucléico

ELISA – Ensaio de Ligação Imunoenzimático

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

IL-1 β – Interleucina-1 beta

iNOS – Óxido Nítrico-Sintase induzida

IPAF – Fator Ativador da Protease ICE

L-dopa – L-3,4-dihidroxifenilalanina

LPS – Lipopolissacarídeos

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos 1

mg – Miligrama

ml – Mililitros

MP – Melanina de Parede

MS – Melanina Secretada

MyD88 – Myeloid differentiation primary response gene 88

NAD – Receptores do tipo NOD

NADPH oxidase– Nicotinamida adeninaducleotídeo fosfato oxidases

NaNO₂ – Nitrito de Sódio

NF- κ B – Fator Nuclear kappa B

NLRC – Proteínas do Tipo NOD que contêm CARD

NLRP – Receptor do Tipo NOD que contêm Pirina

NLRs – Receptores de Tipo NOD

nm – Nanômetros

NO – Óxido Nítrico

NO₂⁻ – Nitrito

NOD – Domínio de Oligomerização de Nucleotídeos

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS – Tampão Fosfato-salino

PFA – Paraformaldeído

pH – Potencial Hidrogeniônico

PRRs – Receptores de Reconhecimento de Padrões

PYD – Domínio Pirina

RNA – Ácido Ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

rpm – Rotações por Minuto

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute

SD – Meio Sabouraud Dextrose

SDA – Meio Ágar Sabouraud Dextrose

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

Syk – Tirosina-quinase Esplênica

Th – Linfócitos T Auxiliares

THP-1 – Linhagem Celular de Monócito Humano

TLRs – Receptores do Tipo Toll

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

UFC – Unidade Formadora de Colônia

x g – Força Centrífuga Relativa

Resumo

O *Fonsecaea pedrosoi* é um fungo dimórfico e o principal agente etiológico da cromoblastomicose, infecção crônica da pele e tecidos subcutâneos iniciada pela inoculação transcutânea das formas saprofíticas do fungo. No hospedeiro, essas células transformam-se em células muriformes, tida como a forma parasítica do fungo e grandes produtoras de melanina, considerada um importante fator de virulência. Estudos recentes têm proposto que a cronicidade da cromoblastomicose decorre de falhas, tanto no reconhecimento inato do fungo, levando à baixa produção de citocinas pró-inflamatórias, quanto na montagem de uma resposta imune adequada para a contenção da infecção. Nesse contexto, considerando o inflamassoma como um importante sistema de reconhecimento inato que compõe respostas imunes antifúngicas, este trabalho foi conduzido visando avaliar a ativação do inflamassoma por *F. pedrosoi*, bem como o seu papel na infecção induzida pelas formas saprofíticas do fungo. Foi observado, inicialmente, que hifas, ao contrário de conídios, induzem a secreção de IL-1 β , provendo os 2 sinais necessários à ativação do inflamassoma, tanto em BMDMs, quanto em BMDCs. O fornecimento exógeno do primeiro ou segundo sinal não só incrementou a secreção da citocina durante a infecção com hifas, como possibilitou a secreção de IL-1 β por BMDCs infectadas com conídios. Utilizando inibidores ou células nocautes, verificou-se que a secreção de IL-1 β é dependente do receptor NLRP3, da caspase-1, e influenciada pela caspase-8. Em adição, observamos que a secreção de IL-1 β mediada pelo inflamassoma NLRP3 é dependente: da sinalização via NF- κ B independente de MyD88; dos mecanismos de efluxo de K⁺; da liberação de catepsina B; e, de forma não essencial, da geração de espécies reativas de oxigênio. Ademais, foi mostrado que a melanina presente na parede do fungo, mas não a secretada, contribui para a secreção da IL-1 β . Foi demonstrado, ainda, que a caspase-1, caspase-11 e o receptor NLRP3, não foram capazes de promover a atividade fungicida de macrófagos em ensaios de co-cultura com o fungo. Entretanto, dados dos ensaios de infecções *in vivo* sugerem que as caspases-1 e -11, assim como o NLRP3, auxiliam na contenção da infecção por propágulos fúngicos de *F. pedrosoi*. No entanto, eles são dispensáveis na resposta à infecção com o conídio, confirmando o papel desta forma fúngica na persistência do *F. pedrosoi* no hospedeiro como resultado da ativação inadequada da resposta imune e seus mecanismos efetores.

Palavras-chave: *Fonsecaea pedrosoi*, melanina, inflamassoma, IL-1 β

Abstract

Fonsecaea pedrosoi is a dimorphic fungus, and the main etiologic agent of chromoblastomycosis, a chronic infection of the skin and subcutaneous tissue initiated after transcutaneous inoculation of saprophytic forms of the fungus. Inside the host, these cells turn into muriformes cells, considered the parasitic form, which produce large amount of melanin, an important virulence factor. Recent studies have suggested that the chronicity observed in chromoblastomycosis is due to both, failure in innate recognition of the fungus, leading to low production of pro-inflammatory cytokines, and development of an inappropriate immune response unable to contain the disease. In this context, and considering the inflammasome as an important innate recognition system that comprises antifungal immune responses, this study was conducted to evaluate inflammasome activation by *F. pedrosoi*, as well as its role in the infection induced by saprophytic forms of the fungus. First, it was observed that, in contrast to conidia, hyphae induced the secretion of IL-1 β , and provides both first and second signals for inflammasome activation in BMDMs and BMDCs. Exogenous stimulation of the first or second signal not only increased IL-1 β secretion during infection with hyphae, but also enabled the secretion of IL-1 β by BMDCs infected with conidia. Using inhibitors or knockout cells, it was found that IL-1 β secretion is dependent on NLRP3, caspase-1 and influenced by caspase-8. In addition, we observed that IL-1 β secretion mediated by NLRP3 inflammasome is dependent: on a NF-kB signaling pathway independent of MyD88; on efflux of K⁺; on cathepsin B release; and, in an unessential way, on generation of reactive oxygen species. Furthermore, it was demonstrated that melanin present in fungal cell wall, but not the secreted one, contribute to IL-1 β secretion. It was further demonstrated that caspase-1, caspase-11 and NLRP3 receptor did not promote *in vitro* fungicidal activity of macrophages. However, data from *in vivo* infection studies suggest that caspase-1 and -11, as well as NLRP3, assist in the disease containment caused by infection with fungal propagules of *F. pedrosoi*. However, they are dispensable in response to infection with conidia, confirming the role of conidia in *F. pedrosoi* conidial form persistence in the host through the inappropriate activation of the immune response and its effectors mechanisms.

Keywords: *Fonsecaea pedrosoi*, melanin, inflammasome, IL-1 β

I. Introdução

1. Cromoblastomicose

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose crônica e insidiosa, que afeta a pele e tecidos subcutâneos, causada por fungos negros. Ao lado da esporotricose e do micetoma, a CBM é uma das micoses subcutâneas de maior incidência (BONIFAZ *et. al.*, 2010). Os primeiros relatos publicados da CBM datam de 1914, por Rudolph, que descreveu seis casos da doença em trabalhadores rurais em Minas Gerais (RUDOLPH, 1914). A cromoblastomicose é uma infecção fúngica primária, e ocorre com maior frequência em indivíduos imunocompetentes (DE HOOG *et. al.*, 2004; BONIFAZ *et. al.*, 2010). A manifestação clínica é predominante em adultos na faixa etária entre 40-70 anos, havendo prevalência em gênero masculino, possivelmente devido à razões ocupacionais, visto que os homens afetados pela doença são, em sua maioria, trabalhadores rurais e, devido a isso, expostos com maior frequência à potenciais fontes de contaminação (SILVA *et. al.*, 1999; BONIFAZ *et. al.*, 2001).

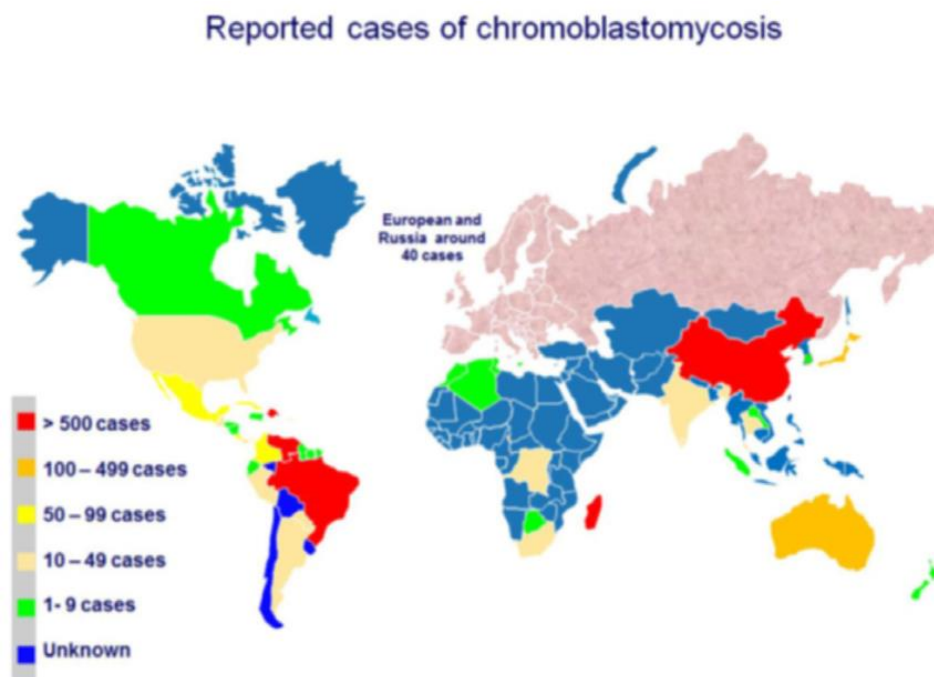


Figura 1. Distribuição geográfica mundial da cromoblastomicose de acordo com casos registrados. Retirado de (QUEIROZ-TELLES, 2015).

A CBM apresenta distribuição mundial, e ocorre com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais dos continentes americano, africano e asiático. As maiores taxas de prevalência são relatadas em Madagascar, México, República Dominicana, Venezuela, Índia, China e Brasil (LESLIE *et. al.*, 1979; ESTERRE *et. al.*, 1996; ATTAPATTU, 1997; RAJENDRAN *et. al.*, 1997; SILVA *et. al.*, 1999; PEREZ-BLANCO *et. al.*, 2006; QUEIROZ-TELLES *et. al.*, 2011; LU *et. al.*, 2013) (Figura 1). Neste último, a incidência é estimada em 3 casos por 100.000 habitantes, sendo a região amazônica considerada a principal área endêmica no território brasileiro, contando com 325 casos diagnosticados entre 1942-1997 (SILVA, 1999; QUEIROZ-TELLES, 2015). Outras áreas do país consideradas endêmicas compreendem os estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (MATTE *et. al.*, 1997; QUEIROZ-TELLES, 1997; MINOTTO *et. al.*, 2001). Entretanto, acredita-se que o número de casos de CBM são subestimados, uma vez que não se exige a notificação obrigatória da doença, sendo o levantamento de dados epidemiológicos derivado de relatos de casos e pesquisas experimentais publicadas (QUEIROZ-TELLES, 2015).

A infecção tem início após a inoculação traumática de propágulos fúngicos (fragmentos de hifas e conídios) nas camadas superficiais da epiderme, provocada por fragmentos vegetais contaminados, como espinhos e lascas de madeira (CARRION, 1950; RUBIN *et. al.*, 1991; SALGADO *et. al.*, 2004). Os sítios de infecção mais frequentes são os membros inferiores (54%), seguidos pelos membros superiores (32%). Introduzido no hospedeiro, o fungo adere-se às células epiteliais e diferencia-se em estruturas parasitárias características, denominadas células muriformes (também denominadas células escleróticas ou corpos escleróticos), as quais resistem à destruição pelos mecanismos efetores da resposta imune celular, permitindo assim o estabelecimento crônico da doença (BONIFAZ *et. al.*, 2001; GIMENES *et. al.*, 2006; QUEIROZ-TELLES, 2009).

Ainda que existam registros na literatura da disseminação sistêmica de agentes etiológicos da cromoblastomicose, majoritariamente em tecidos cerebrais, tais casos são raros e classificados como de feohifomicose (NOBREGA *et. al.*, 2003; SURASH *et. al.*, 2005; TAKEI, 2007; DE AZEVEDO *et. al.*, 2015; KHAN *et. al.*, 2015). Normalmente, a CBM se restringe ao tecido cutâneo e subcutâneo, onde as lesões – inicialmente máculas teciduais e pápulas - surgem do sítio onde ocorreu o trauma transcutâneo, após um período de incubação que pode levar anos. As lesões progridem de maneira lenta, manifestando

diferentes formas clínicas tais como nódulos, verrugas, tumores, placas e cicatrizes teciduais (CARRIÓN, 1950; QUEIROZ-TELLES, 2015). Análises histopatológicas das lesões revelam a formação de granulomas supurativos acompanhados de necrose, bem como por áreas de fibrose da derme (ESTERRE *et. al.*, 1993; CHAVAN *et. al.*, 2010; SILVA *et. al.*, 2014). Há participação de infiltrados inflamatórios ricos em granulócitos – principalmente neutrófilos, células com importante papel na destruição de células de *F. pedrosoi*. Macrófagos também são regularmente observados na lesão e se apresentam em diferentes graus de maturação e ativação no tecido, ocasionalmente formando células gigantes multinucleadas. (ESTERRE *et. al.*, 1993; ROZENTAL *et. al.*, 1996).

Embora não letal, a doença é muitas vezes debilitante e incapacitante (em razão da deformidade do membro afetado pelas lesões), sendo frequentemente acompanhada de sintomas como dor e prurido. Além disso, na medida em que a severidade aumenta, podem ocorrer complicações como ulceração, infecção bacteriana secundária e linfedema. Em casos raros, as lesões podem sofrer transformação neoplásica e levar ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas (BONIFAZ *et. al.*, 2001; LUPI *et. al.*, 2005). O tratamento da cromblastomicose inclui a administração prolongada de antifúngicos sistêmicos (e.g., anfotericina, itraconazol e terbinafina) sob monoterapia, combinados entre si, ou utilizados em associação com tratamentos físicos e cirúrgicos. No entanto, a doença é de difícil tratamento, apresenta baixa taxa de cura e índices de recorrência em até 80% dos pacientes (QUEIROZ-TELLES *et. al.*, 2009; QUEIROZ-TELLES *et. al.*, 2013).

A cromblastomicose possui seus principais agentes etiológicos distribuídos entre os gêneros *Fonsecaea*, *Cladosporium*, *Phialophora* e *Rhinocladiella*. Infecções por *Fonsecaea pedrosoi* constituem maioria dos casos da doença no Brasil e no mundo (70-90%), ocorrendo principalmente em regiões tropicais de clima úmido. Em contraste, *Cladophialophora carrionii*, segundo agente mais comum, predomina em regiões de clima semiárido. Outros agentes etiológicos da CBM, identificados com menor frequência, incluem *Fonsecaea monophora*, *Phialophora verrucosa* e *Rhinocladiella aquaspersa* (BORELLI, 1972; MCGINNIS, 1983; SUTTON & RINALDI, 2003; LUPI *et. al.*, 2005; MARTINEZ & TOVAR, 2007; NAJAFZADEH *et. al.*, 2011).

2. Polimorfismo fúngico e *Fonsecaea pedrosoi*

Dentre um total de quase 300 mil espécies de fungos já identificadas (enquanto são estimados incríveis valores de 3.5 a 5.1 milhões de espécies existentes), apenas cerca de 150 a 200 são consideradas patogênicas humanas (KERRIDGE, 1993; CHAKRABARTI, 2005; O'BRIEN *et. al.*, 2005). Estudos fornecem crescentes evidências de que a patogenicidade desses microrganismos está associada com a alteração da sua morfologia do ambiente para o hospedeiro (GAUTHIER & KLEIN, 2008). Todos os fungos, sejam eles potencialmente patogênicos ou não ao homem, podem apresentar duas morfologias básicas – esférica e tubular. Por essa lógica, qualquer fungo se enquadraria no grupo de fungos dimórficos (GOW, 1994). Entretanto, o termo “dimorfismo celular” é tradicionalmente designado aos fungos capazes de crescerem como hifas ou leveduras, como os fungos patogênicos *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* entre outros (GAUTHIER, 2015). No entanto, muitos dos fungos dimórficos podem apresentar não somente duas morfologias, como três ou mais (normalmente esporos, hifas e leveduras) (GOW, 1994).

Terminologias à parte, sabe-se que a capacidade do fungo em transitar entre diferentes morfologias tem grande impacto em sua virulência, haja vista que tal transformação morfológica é normalmente acompanhada por alterações características na sua composição de parede, lipídios de membrana, sinalização intracelular e expressão gênica que de alguma maneira contribuem para sua permanência no hospedeiro. Os fungos *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* quando deletados do gene *drk1*, importante no controle de genes essenciais da fase leveduriforme, não se transformam em leveduras. Como consequência, esses fungos nocauteados apresentam níveis reduzidos do fator de virulência α -1,3-glucana, associado ao encobrimento de componentes de parede imunoestimulatórios, assim como apresentam expressão diminuída de duas proteínas essenciais à patogênese de *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*, a Bad1 (adesina 1 de *Blastomyces*) e Cbp1 (proteína ligante de cálcio 1), respectivamente (GAUTHIER, 2015; GAUTHIER & KLEIN, 2008).

Por outro lado, a transformação oposta, de levedura para hifa, parece ser particularmente importante para a infecção por *C. albicans*. Foi demonstrado que as diferentes formas desse fungo induzem distintos perfis de resposta imune. Assim, enquanto a interação dos fagócitos com leveduras induzia a produção de IL-12, citocina

importante na polarização de uma resposta Th1, a filamentação do fungo modulava para a indução de um perfil oposto, Th2, marcado pela presença de altos níveis de IL-10 e IL-4 e baixa produção de IFN- γ , citocina fundamental na promoção de uma resposta imune protetora frente à candidíase (ROMANI *et. al.*, 1997; CHIARI *et. al.*, 2000; D'OSTIANI, 2000; VAN DER GRAAF *et. al.*, 2005). *A. fumigatus*, embora não seja considerado um fungo dimórfico em razão de seu crescimento vegetativo ocorrer exclusivamente na forma micelial, requer, assim como *C. albicans*, a formação de hifas para obter sucesso na infecção do hospedeiro. Diferentemente de *C. albicans*, que já compõe a microbiota do hospedeiro em sua forma leveduriforme comensal, *A. fumigatus* invade o hospedeiro por meio da inalação de esporos ambientais que, ao atingirem o espaço alveolar, podem germinar e formar hifas, responsáveis pela disseminação do fungo no hospedeiro (ZANDER *et. al.*, 2007). Interessantemente, essas duas espécies compartilham, graças à sua capacidade de filamentação, um mecanismo para dificultar sua fagocitose (e posterior eliminação), que é dificultada devido ao grande tamanho atingido por essas células. Além disso, a formação de hifas a partir da célula precursora (esporos ou leveduras), ainda no interior dos fagócitos, promove o escape do fungo por meio da ruptura destes (COLLETTE & LORENZ, 2011).

Outro fungo cuja virulência é dependente da transição entre variados morfotipos é o fungo *F. pedrosoi* que, juntamente aos demais agentes causadores da CBM, é um ascomiceto polimórfico pertencente à família Herpotrichiellaceae (KRZYŚCIAK *et. al.*, 2014). O papel das formas de *F. pedrosoi* na infecção e no estabelecimento da doença ainda é pouco esclarecido, especialmente em se tratando das formas saprofíticas, conídios e hifas (Figuras 2 e 3) (SALGADO, 2010). Essas duas formas são encontradas no ambiente e, ao adentrar o hospedeiro, passam por um processo de transformação em células muriformes, que são células intensamente melanizadas medindo 4-12 μ m de diâmetro, arredondadas, de crescimento meristemático, semelhantes às leveduras, e que são creditadas como as responsáveis pela cronicidade da CBM (Figuras 2 e 3) (BONIFAZ *et. al.*, 2001; SANTOS *et. al.*, 2007).

As células muriformes são onipresentes entre os hospedeiros da CBM, onde são encontradas dentro de células gigantes multinucleadas ou em microabscessos situados na interface do tecido epitelial e derme (ESTERRE & RICHARD-BLUM, 2002; ESTERRE & QUEIROZ-TELLES, 2006; QUEIROZ-TELLES *et. al.*, 2009; SALGADO, 2010). Diversamente, hifas normalmente são localizadas próximas às camadas mais superficiais

da lesão, onde estão associadas a um papel de auto-inoculação do fungo no hospedeiro, assim como ao seu retorno à natureza, o que sugere que estas hifas sejam formadas pela reversão de células muriformes para a forma saprofítica (BAYLES, 1986; ROSEN & OVERHOLT, 1996; LEE *et. al.*, 1998; BONIFAZ *et. al.*, 2001). Embora as células muriformes sejam consideradas as formas parasíticas/patogênicas na CBM, a patogenia das hifas é mais evidente no contexto da feohifomicose, doença frequentemente marcada pela disseminação de hifas de alguns agentes que causam a cromoblastomicose, e que normalmente apresenta um desfecho grave para o hospedeiro, devido ao acometimento de tecidos cerebrais (NOBREGA *et. al.*, 2003; SURASH *et. al.*, 2005; TAKEI, 2007; KHAN *et. al.*, 2015). Além disso, assim como as células muriformes, e diferentemente de conídios, hifas apresentam intensa atividade de ecto-fosfatases, enzimas que supõe-se serem importantes para a nutrição, proliferação, adesão, virulência e infecção por fungos (KNEIPP *et. al.*, 2003, 2004; FREITAS-MESQUITA & MEYER-FERNANDES, 2014).

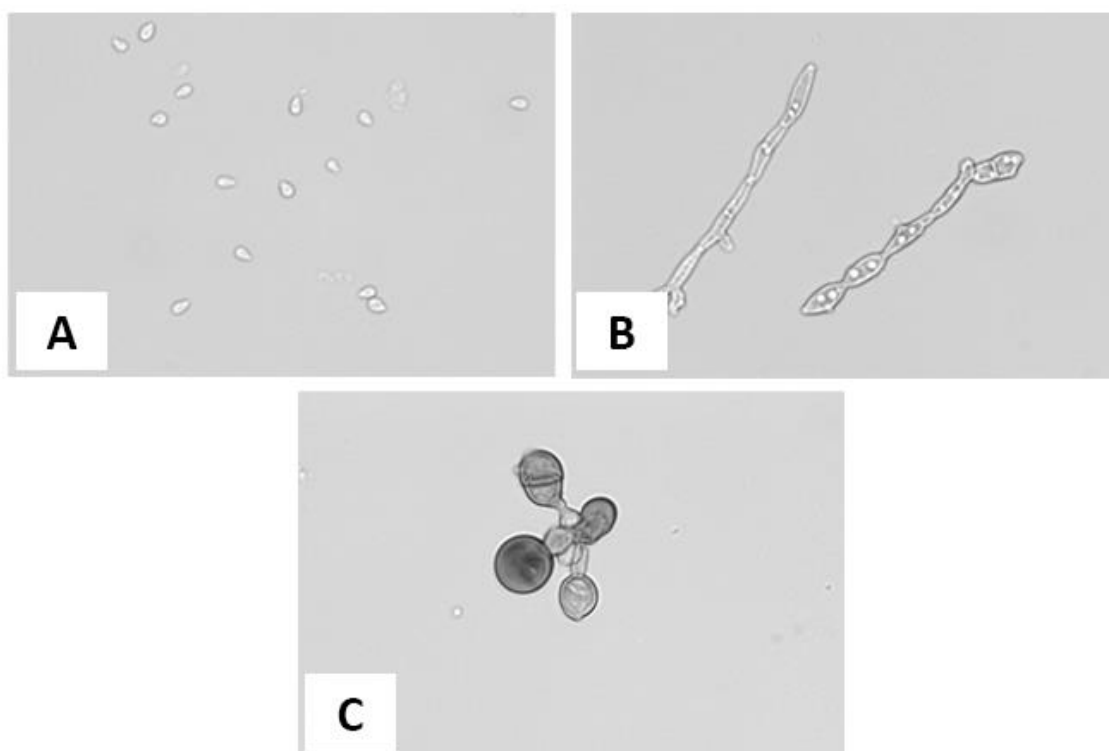


Figura 2. Micromorfologia das formas de *Fonsecaea pedrosoi*. Formas saprofíticas - conídios e fragmentos de hifas (A e B) - e parasitárias, células muriformes (C), de *Fonsecaea pedrosoi* sob magnificação de 400x.

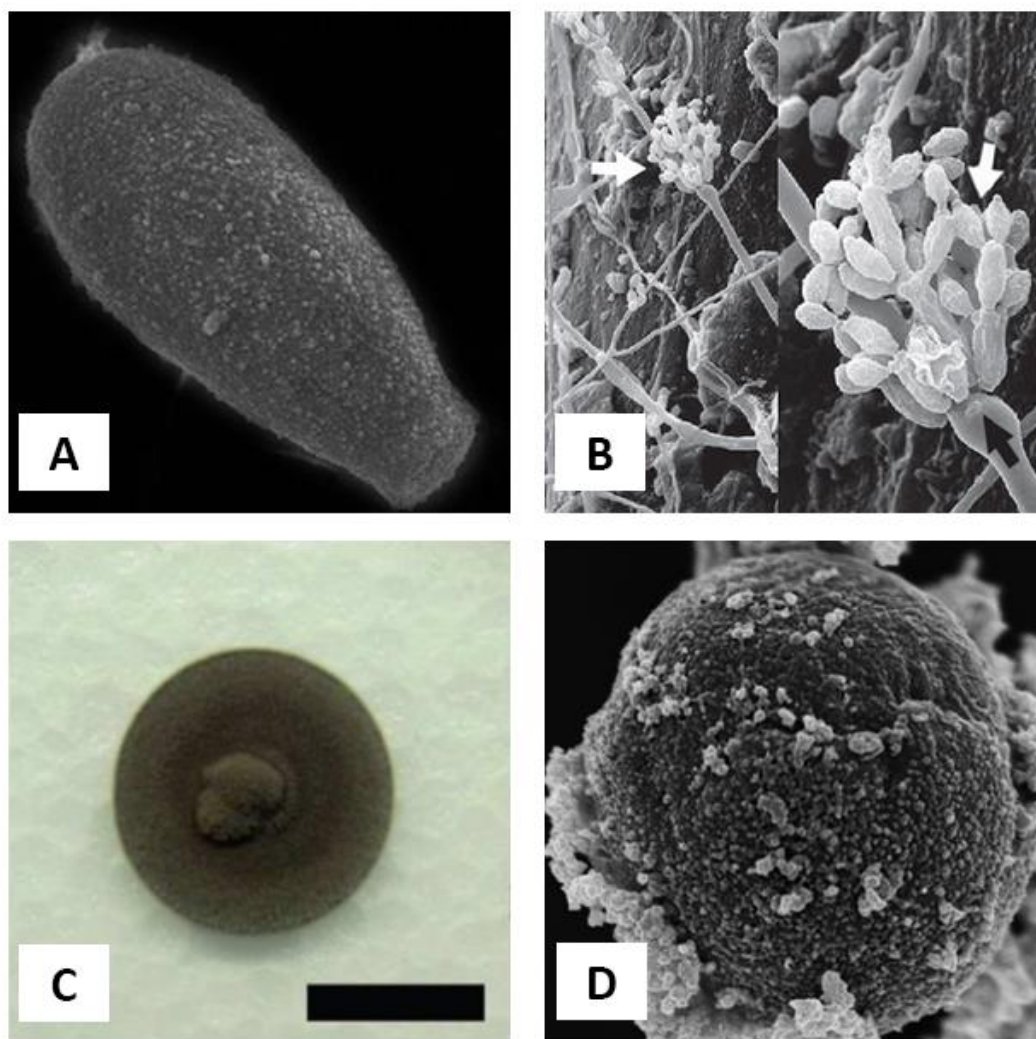


Figura 3. Macro e ultramicrografia do *Fonsecaea pedrosoi*. Ultramicrografia de varredura de conídios isolados (A) ou associados a hifas em espinho de *Mimosa pudica* (B); e células muriformes (D). Aspectos macroscópicos da cultura do fungo (C), que exibe coloração que exibe coloração negra e aspecto cotonoso. Modificado de (SALGADO *et. al.*, 2004; FRANZEN *et. al.*, 2006).

3. Fatores de virulência e melanina

A susceptibilidade do hospedeiro às infecções fúngicas não depende exclusivamente da condição fisiológica e imunológica do mesmo, e isso se torna mais evidente quando considerada a existência de patógenos primários, capazes de causar a doença em indivíduos que apresentem qualquer status imunológico (isto é, imunocompetentes ou imunocomprometidos). Na interação parasita-hospedeiro, a sobrevivência desse primeiro no segundo é influenciada pela expressão coordenada de fatores de virulência (mecanismos, ações ou produção de certos componentes) que habilitam o microrganismo a adentrar, replicar e permanecer no hospedeiro (CROSS, 2008). Uma ampla diversidade de fatores de virulência já foi descrita para fungos, e costumam provê-los das seguintes capacidades: (I) colonização (e.g. através da expressão de adesinas ou formação de biofilmes); (II) evasão da resposta do hospedeiro (e.g. através da transição morfológica, produção de agentes anti-oxidantes, destruição de componentes do sistema complemento ou da extrusão, quando o fungo é expulso das células sem sinalizar ao sistema imunológico); (III) imunossupressão (e.g. por meio da expressão de moléculas anti-inflamatórias); (IV) parasitismo intracelular, no caso de parasitas intracelulares (e.g. produção de agentes tamponantes ou inibidores da acidificação lisossomal); (V) obtenção de nutrientes (e.g. através da secreção de moléculas como fosfolipases que degradam lipídios auxiliando no fornecimento de carbono). (KERRIDGE, 1993; CASADEVALL & PIROFSKI, 2009; DJORDJEVIC, 2010).

O *F. pedrosoi* é um patógeno primário e, assim como outros agentes de micoses subcutâneas, necessita de apenas uma lesão na barreira anatômica como a pele para iniciar o processo infeccioso, ainda atualmente pouco compreendido (DE HOOG *et. al.*, 2004; BONIFAZ *et. al.*, 2010). Entretanto, já foram descritas até o momento uma variedade de potenciais fatores de virulência do *F. pedrosoi*, sendo que alguns são compartilhados por outros fungos patogênicos: (I) produção de ecto-fosfatases e fosfolipases, que estariam envolvidas no processo de adesão do fungo ao hospedeiro (KNEIPP *et. al.*, 2003, 2004; COLLOPY-JUNIOR, 2006); (II) crescimento em temperatura corporal humana (37 °C) (ALVIANO *et. al.*, 1992); (III) tolerância ao pH ácido (ALVIANO *et. al.*, 1992); (IV) presença de α -glucana (NÓBREGA *et. al.*, 2010); (V) capacidade de produzir e secretar melanina, bem como de depositá-la em sua parede celular (ALVIANO *et. al.*, 1991; BOCCA *et. al.*, 2006; FRANZEN *et. al.*, 2008). Uma descrição detalhada da melanina e de sua miríade de funções será exposta mais adiante.

A melanina é um pigmento ubíquo na natureza e encontrado em todos os reinos biológicos, apresentando uma ampla variedade de funções, como defesa contra o estresse ambiental protegendo da radiação ultravioleta, radiações ionizantes e agentes oxidantes (EISENMAN & CASADEVALL, 2012). Embora sua produção derive de vias metabólicas e seus componentes associados, que podem divergir entre o organismo de origem, o que se leva a considerar a melanina como um grupo amplo de substâncias, esses pigmentos compartilham determinadas propriedades: (I) são polímeros de alta massa molecular; (II) exibem alta termoestabilidade (III); e são carregadas negativamente (WHITE, 1958; EISENMAN & CASADEVALL, 2012)

A melanização é um processo bioquímico de enorme importância para os fungos, haja vista que a maioria dos fungos presentes no solo são melanizados (HUNT & FOGEL, 1983). Ademais, a produção do polímero chega a representar considerável composição do fungo, podendo atingir até 30 % do seu peso seco, como nos esporos de *Agaricus bisporus* (RAST & HOLLESTEIN, 1977). A melanina é um polímero amorfo formado pela ligação cruzada entre anéis fenólicos (NOSANCHUK *et. al.*, 2015). Desde a identificação de sua presença em fungos, em 1960, duas vias de síntese da melanina foram descritas nestes microrganismos (WHEELER & BELL, 1988; EISENMAN & CASADEVALL, 2012). Pouco encontrada em fungos (e.g. os patógenos *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Candida albicans*) a via L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) depende de enzimas lacase ou tirosinase para catalisar a formação de dopaquinona por meio da oxidação de l-dopa (que, por sua vez, pode ser obtida pela oxidação de tirosina pela ação da tirosinase). Posteriormente à formação do intermediário, sucede-se uma série de etapas enzimáticas que resultam na formação de dihidroxindoles que se polimerizam em melanina (Figura 4A). Os precursores dessa via são encontrados no hospedeiro mamífero que, por sua vez, apresenta semelhante via de biossíntese do pigmento (WANG *et. al.*, 1996; GÓMEZ *et. al.*, 2001; MORRIS-JONES *et. al.*, 2005; EISENMAN & CASADEVALL, 2012).

Outra via, predominante e mais extensivamente estudada em fungos, utiliza precursores que podem ser endogenamente obtidos por meio do metabolismo da glicose. Denominada via 1,8-dihidroxi-naftaleno (ou DHN), tem início com a oxidação dos precursores Acetil-CoA ou Malonil-CoA catalisada pela enzima poliketídeo sintase (PKS), formando o 1,3,6,8-tetrahidroxi-naftaleno (1,3,6,8-THN). Esta etapa é seguida por várias reações de redução e desidratação que findam com a formação do monômero 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN), que se auto-polimeriza promovendo a formação da melanina.

Considerando que, diferentemente da via L-dopa, que exige um substrato exógeno (e.g. L-dopa) ao fungo, a via DHN é produzida endogenamente, é necessária a utilização de inibidores enzimáticos seletivos dessa via, para os estudos onde se investiga seu papel biológico. Destes inibidores, um muito utilizado é o triciclazol, cujo mecanismo de ação ocorre pelo bloqueio da atividade de duas redutases: (I) uma que medeia a formação de scitalone a partir do 1,3,6,8-trihidroxinaftaleno; (II) e outra, mais sensível ao inibidor, que catalisa a conversão do 1,3,8-trihidroxinaftaleno a vermelone, interferindo assim na síntese da melanina (Figura 4B). A via DHN é a via de síntese de melanina predominante em fungos e ocorre em espécies como *Aspergillus fumigatus* e *Sporothrix schenckii*, assim como é a responsável pela melanização dos fungos dematiáceos, como o *Fonsecaea pedrosoi* (TOKOUSBALIDES *et. al.*, 1979; CUNHA *et. al.*, 2005; FRANZEN *et. al.*, 2008; REVANKAR & SUTTON, 2010; EISENMAN & CASADEVALL, 2012)

Embora fungos como *C. neoformans* sejam capazes de sintetizar melanina externamente à célula fúngica, através de vesículas secretadas que possuem atividade de lacase, a síntese de melanina nos fungos costuma ocorrer em organelas citoplasmáticas especializadas denominadas melanossomos (EISENMAN & CASADEVALL, 2012). A melanogênese é iniciada com a formação de uma matriz fibrilar, que passa por um processo de espessamento e escurecimento em decorrência à formação de depósitos de melanina. Ao final do desenvolvimento do grânulo, este é transportado até sua fusão com a membrana celular, liberando seu conteúdo entre a mesma e a parede do fungo, promovendo a formação de múltiplas camadas concêntricas de melanina na parede celular (FRANZEN *et. al.*, 2008). Considerando que tais camadas não são sólidas, mas exibem um aspecto granular, provavelmente associado à deposição da melanina na forma de pacotes, como sugerido por Franzen e colaboradores (2006, 2008), presume-se que a melanina se acomode na parede por meio de ligações cruzadas com outros componentes de parede celular, como a quitina. Ademais, Zhong e colaboradores (2008) observaram a formação de ligações covalentes cruzadas entre a melanina e componentes polissacarídicos, especialmente aqueles com conteúdo de manose (FRANZEN *et. al.*, 2006, 2008; EISENMAN & CASADEVALL, 2012;).

Tamanha integração do pigmento com a parede celular e seus componentes pode estar relacionada à redução dos poros da parede celular fúngica. Mais adiante, a redução de poros proporcionada pela melanização da célula, junto às propriedades absorptivas apresentadas pela melanina, poderiam ser os mecanismos pelos quais células melanizadas de *Fonsecaea pedrosoi* apresentam maior resistência a drogas antifúngicas em

comparação ao fungo deficiente do polímero (EISENMAN *et. al.*, 2005; CUNHA, 2008). Outras funções exercidas pela melanina do *Fonsecaea pedrosoi* que a tornam um fator de virulência incluem: (I) Inibição da fagocitose (CUNHA *et. al.*, 2005); (II) mascaramento de componentes antigênicos como monohexosilceramidas, capazes de induzir a produção de anticorpos com efeito microbicida ao fungo (NIMRICHTER *et. al.*, 2004, 2005); (III) resistência à eliminação por macrófagos (CUNHA *et. al.*, 2005); (IV) proteção contra a explosão oxidativa de macrófagos, promovendo resistência frente a H₂O₂ e atuando tanto no sequestro de óxido nítrico quanto na inibição da expressão da enzima iNOS, que catalisa a formação dessa molécula gasosa (BOCCA *et. al.*, 2006; CUNHA *et. al.*, 2010; ZHANG *et. al.*, 2012).

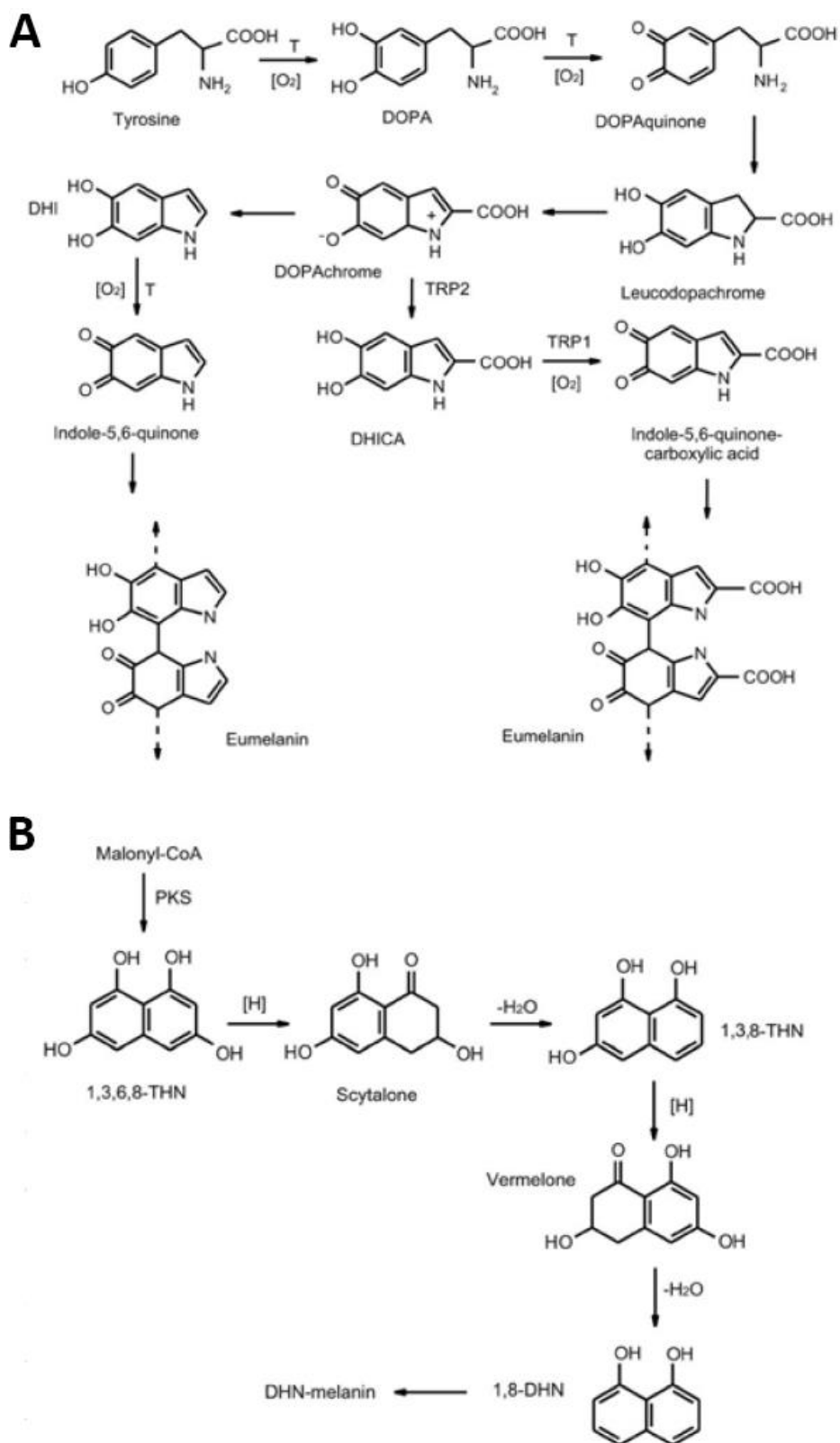


Figura 4. Esquema comparativo das vias de síntese da melanina l-dopa e DHN. Vias l-dopa (A) e DHN (B). Modificado de (PLONKA *et. al.*, 2006).

4. Imunidade antifúngica

Na interação parasita-hospedeiro, a habilidade com que o último promove sua defesa é determinante no curso e desfecho de infecções. No contexto das infecções causadas por fungos, a montagem de uma resposta imune balanceada/adequada é crucial na contenção da infecção e no estabelecimento de formas clínicas mais brandas da doença, possuindo a imunidade inata, como primeira linha de defesa e moduladora da resposta adaptativa, um papel chave na imunidade antifúngica. Embora alguns dos mecanismos inatos sejam constitutivos (barreira da pele e mucosas, defensinas e colectinas), a maioria é induzível por meio do sensoriamento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou a danos celulares produzidos durante a infecção (DAMPs), realizado por proteínas solúveis (e.g. do sistema complemento) e integradas às células do sistema imunológico, compondo os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Embora haja uma limitada variedade desses receptores – em comparação aos pertencentes à imunidade adaptativa -, em razão de serem determinados pela linhagem germinativa, eles são capazes de reconhecer uma gama de espécies fúngicas e seus componentes, tanto no espaço intra quanto extracelular. Nesse sentido, sua classificação pode ser baseada em suas localizações subcelulares: receptores localizados em compartimentos intracelulares, como os receptores do tipo NOD (NLRs, ou receptores de oligomerização de nucleotídeos com domínios ricos em leucina), que serão discutidos mais adiante; receptores de membrana e endossomais, que compreendem receptores do tipo Toll (TLRs) e de lectina do tipo C (CLRs) (TAKEUCHI & AKIRA, 2010; ROMANI, 2011; LAMKANFI & DIXIT, 2014).

A família TLR foi a primeira família a ser identificada, possuindo uma ampla diversidade de membros (somente em humanos já foram descritos 11), situados tanto em compartimentos endossomais quanto na superfície celular (BOURGEOIS & KUHLER, 2012). No tocante à imunidade contra fungos, dentre os membros desta família, os receptores TLR2, TLR4 e TLR9 apresentam papel de destaque, mediando o reconhecimento de componentes fúngicos como zimosan, fosfolipomananas, mananas oligadas e DNA fúngico. Quando ativados, sinalizam normalmente via MyD88, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, mas são incapazes de induzir fagocitose. A deficiência de receptores dessa família já foi associada a um aumento na susceptibilidade do hospedeiro à aspergilose e candidíase (ROMANI, 2004, 2011; FREEMAN & GRINSTEIN, 2014).

Outra família de PRRs, conhecida como CLR, apresenta um papel fundamental no reconhecimento e combate de infecções fúngicas. Compõe-se de alguns receptores de grande relevância na interação fungo-hospedeiro, como Mincle, DC-SIGN, receptor de manose, Dectina-1 e Dectina-2. Dectina-1 consta até o momento como o único receptor de β -glucana da família do CLR, carboidrato encontrado na parede fúngica, e é o mais intensamente estudado e caracterizado, estando o portador da deficiência genética desse receptor muito mais susceptível às doenças fúngicas, dado que sua ativação está associada à secreção de importantes quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias com ação na imunidade inata e adaptativa. Inclusive, já foi demonstrado que a atividade fungicida de neutrófilos é influenciada pelo acionamento da dectina-1. Dectina-2, mais recentemente descrito, tem se mostrado como outro receptor de grande importância, através do reconhecimento de estruturas com alto teor de manose. Similarmente à dectina-1 e outros CLR, é promotor de fagocitose e sinaliza via Syk/CARD9 para uma ativação do fator de transcrição NF- κ B e subsequente transcrição de genes importantes para a resposta imune (ROMANI, 2004, 2011; KENNEDY *et. al.*, 2007).

Nesse contexto, recentemente, Wüthrich e colaboradores (2015) demonstraram que receptores Dectina-1 e -2 atuam no reconhecimento de *F. pedrosoi*, bem como que este último participa na polarização de uma resposta Th17 que é, por outro lado, suprimida por meio do reconhecimento do fungo via Mincle. Um estudo anterior associa o engajamento deste receptor também à inibição de uma resposta Th1, por meio do bloqueio da síntese da citocina IL-12 (WEVERS *et. al.*, 2014). Sousa e colaboradores (2011) sugeriram que a falta da co-estimulação de PRRs no reconhecimento de conídios de *F. pedrosoi* é um fator chave na cronicidade da cromoblastomicose, uma vez que observaram que o fornecimento de agonistas para TLR2 (PAM₃CSK₄), TLR4 (LPS) ou TLR7 (imiquimod) permite que as células passem a apresentar uma secreção robusta da citocina pró-inflamatória TNF- α , proposta pelo autor como importante na resposta imune durante a CBM.

Dentre as células de papel crucial na resposta imune aos fungos, figuram células dendríticas, macrófagos e neutrófilos. Destas, as últimas desempenham um papel de combate mais direto ao fungo, tendo-se em vista que são hábeis produtores de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, mieloperoxidases e armadilhas extracelulares (ou NETs), mecanismos efetores que causam danos e morte das células fúngicas. Os neutrófilos estão presentes no centro de granulomas da CBM, em contato direto com o

Fonsecaea pedrosoi que, em ensaios *in vitro*, apresenta susceptibilidade aos seus mecanismos microbicidas (ESTERRE *et. al.*, 1993; ROZENTAL *et. al.*, 1996; ALVIANO *et. al.*, 2004; AMULIC *et. al.*, 2012; DONG *et. al.*, 2014). Outros fagócitos frequentemente encontrados nas lesões dessa doença são macrófagos. Diferentemente de neutrófilos, que apresentam atividade microbicida contra conídios do fungo, os macrófagos parecem promover apenas um efeito fungistático sobre essas células, retardando a formação do tubo germinativo e geração da hifa (ESTERRE *et. al.*, 1993; ROZENTAL *et. al.*, 1994, 1996). Ademais, este tipo celular apresenta papel mais direcionado a outros mecanismos da imunidade, como na secreção de citocinas pró-inflamatórias e modulação da resposta imune contra o *F. pedrosoi* (SOUSA *et. al.*, 2011).

Embora as células dendríticas sejam capazes de apresentar atividade fungicida, como demonstrado para *C. neoformans* (KELLY *et. al.*, 2005), sua importância em infecções reside na capacidade inigualável dessas células, entre outras células apresentadoras de antígenos, em processar e apresentar antígenos, bem como de migrar para órgãos linfóides e modular (via expressão de moléculas co-estimulatórias ou secreção de citocinas) respostas imune adaptativas, fazendo uma ponte entre a resposta imune inata e adaptativa (ROMANI, 2011). Isso é de grande importância no contexto da CBM, dado que algumas correntes de estudiosos vinculam a cronicidade da doença à anergia da resposta imune adaptativa. De fato, Sousa e colaboradores (2009) demonstraram que tais células podem ter um papel importante na defesa do hospedeiro frente à CBM, visto que células dendríticas diferenciadas de monócitos tanto de indivíduos saudáveis quanto infectados, quando incubadas *in vitro* com conídios de *F. pedrosoi*, desempenharam um perfil modulador de respostas Th1. Na cromoblastomicose, bem como em outras doenças fúngicas, essa resposta está associada à resistência à doença, haja vista que pacientes com a forma branda da doença apresentam proliferação celular eficiente combinada a uma alta produção de IFN- γ , citocina que amplifica a ação dos mecanismos fungicidas dos fagócitos. Por sua vez, os pacientes com a forma grave apresentam baixa secreção de IFN- γ e fraca proliferação de linfócitos T, além da produção predominante da citocina anti-inflamatória IL-10, padrão típico de resposta Th2, associada à susceptibilidade a infecções fúngicas (GIMENES *et. al.*, 2005).

Por muito tempo, o papel da resposta adaptativa na cromoblastomicose foi avaliada somente à luz desse balanço Th1/Th2. Um estudo recente expandiu essa compreensão dualizada, identificando intensa presença de células secretoras de IL-17 nos

infiltrados das lesões da CBM, assim como a presença significativa de linfócitos T regulatórios (SILVA *et. al.*, 2014). A resposta humoral, diferentemente da imunidade mediada por células, parece não desempenhar um papel importante na CBM, como observado também em outras micoses crônicas (ESTERRE *et. al.*, 2000).

5. Mecanismos de ativação e o papel dos inflamassomas

Um componente importante da imunidade inata descoberto no início da década passada e que, desde então, vem sendo muito estudado em uma série de doenças, inclusive nas fúngicas, é representado pelo complexo multiproteico denominado inflamassoma. A ativação dessa plataforma intracelular confere proteção do hospedeiro frente a patógenos por meio de mecanismos como piroptose e secreção de citocinas pró-inflamatórias que desempenham papel chave na resposta imune inata; bem como por meio de sua ação modulatória sobre o sistema imune adaptativo (MARTINON *et. al.*, 2002; CIRACI *et. al.*, 2012). A montagem da plataforma multiproteica requer a participação de um PRR, como receptores do tipo AIM2 e, mais comumente, de receptores do tipo NOD (NLRs) (LAMKANFI & DIXIT, 2014). Contando com 22 genes humanos e 34 genes murinos descritos até o momento, a família NLR pode ser subdividida em receptores NODs, NLRPs e IPAF (SCHRODER & TSCHOPP, 2010). Estruturalmente, os membros dessa família compartilham uma arquitetura molecular composta por: (I) uma porção C-terminal rica em repetições de leucina (LRR); (II) um domínio central NACHT (também denominado NOD) complexado a NAD que atua na auto-oligomerização do receptor; (III) e um domínio efetor N-terminal pirina (PYD) ou CARD que medeia interações entre proteínas importantes para a sinalização *downstream* (ou a jusante). Quando PAMPs ou DAMPs, estes associados ao estresse celular causado por agentes estéreis ou microrganismos, são reconhecidos no interior da célula por LRRs, ocorre a oligomerização do receptor, levando ao recrutamento e ativação de caspases responsáveis pela maturação e liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (MARTINON *et. al.*, 2009).

Os inflamassomas são nomeados em referência ao receptor responsável por sua montagem, e possuem como representantes de maior destaque: O NLRP1, que possui papel na proteção contra a infecção por *Bacillus anthracis* por meio do reconhecimento de sua toxina letal; O NLRP3, o principal alvo de estudos até então, que o associam a um papel protetor em uma série de infecções bacterianas, virais, e fúngicas; O NLRP6, de importante papel regulador da homeostasia da mucosa intestinal e de prevenção de auto-inflamação; O NLRC4, integrante da família IPAF, participa na restrição intracelular de bactérias via reconhecimento de flagelina; e o AIM2, essencial na defesa frente a determinadas bactérias e vírus de DNA reconhecidos devido à capacidade de ligação do

receptor ao DNA dos mesmos (RATHINAM *et. al.*, 2010; ANAND *et. al.*, 2011; PEREIRA, 2011; TOMALKA *et. al.*, 2011; ELINAV *et. al.*, 2012).

Os inflamassomas NLRC4 e AIM2 foram recentemente descritos como mecanismos importantes também no reconhecimento e combate de infecções fúngicas. Tomalka e colaboradores (2011) demonstraram que a deficiência de NLRC4: leva a um prejuízo no controle de infecções mucosas causadas por *Candida albicans*, que foi associado à falha do recrutamento de células inflamatórias; tem impacto também em respostas inflamatórias e antimicrobianas na cavidade oral exercidas por peptídeos. Outro grupo de pesquisadores, em um estudo com um modelo de aspergilose causada por *Aspergillus fumigatus*, observou um papel positivo do inflamassoma AIM2 na restrição da disseminação sistêmica de hifas do fungo (KARKI *et. al.*, 2015). À exceção desses estudos, todas as descrições feitas até hoje da participação de inflamassomas em micoses, tanto superficiais quanto profundas, foram do inflamassoma NLRP3 (TAVARES *et. al.*, 2015).

O mais extensamente detalhado inflamassoma, o NLRP3, consiste numa plataforma composta por um receptor homônimo, caspase-1 e uma proteína adaptadora ASC que, como sua definição funcional sugere, promove a integração desses demais membros via interações homotípicas entre seus domínios e PYD e CARD presentes nesses demais membros, respectivamente (figura 5). Sua montagem e ativação pode ocorrer em resposta a uma imensa variedade de estímulos estruturalmente diferentes, como PAMPs, DAMPs (e.g. ATP e ácido úrico) e irritantes ambientais (e.g. sílica, amianto e radiação UVB) (SCHRODER & TSCHOPP, 2010; BAUERNFEIND & HORNUNG, 2013). Embora intensamente estudado, não há relatos da ativação do inflamassoma por meio da interação física entre um estímulo e seu receptor, de forma que este parece atuar no reconhecimento indireto, por meio da detecção de perturbações celulares provocadas por tais ativadores. As perturbações mais frequentes são: (I) a liberação de catepsinas (principalmente a catepsina B) no citosol em decorrência da desestabilização e fragmentação lisossomal; (II) geração de espécies reativas de oxigênio (originadas de NADPH oxidase ou da mitocôndria), sinais de perigo evolutionalmente conservados; (III) efluxo de potássio, associado à abertura de canais iônicos dependentes de ATP (figura 5) (SCHRODER & TSCHOPP, 2010). Há dados suficientes na literatura que demonstram a dependência dos mecanismos supracitados na ativação do inflamassoma por fungos patogênicos. Ademais, embora geralmente ocorra a participação conjunta de tais mecanismos na ativação do inflamassoma, dependendo do

fagócito – se macrófago ou célula dendrítica – ou da espécie fúngica envolvida, um ou outro mecanismo pode ser dispensável (DOSTERT *et. al.*, 2008; TAVARES *et. al.*, 2015).

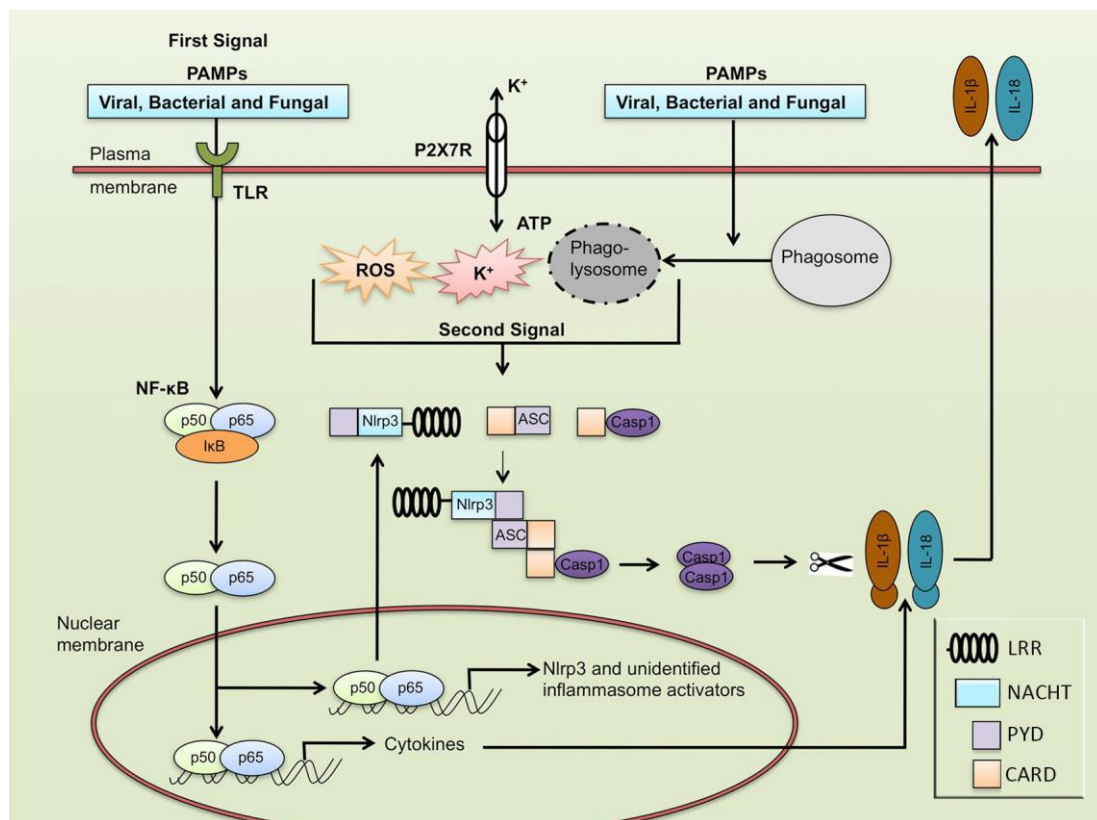


Figura 5. Estrutura do inflamassoma NLRP3 e os mecanismos de sinalização propostos para sua ativação. Modificado de (ANAND *et. al.*, 2011).

Contudo, a geração de tais estímulos não garante a secreção de todas as citocinas reguladas pelo inflamassoma. Isto porque, geralmente, a expressão basal tanto do receptor NLRP3 quanto das forma imatura da IL-1 β (embora não da IL-18) é normalmente ínfima e insuficiente, requerendo previamente a ativação do fator de transcrição NF- κ B para a ativação da transcrição dessas moléculas (figura 5) (BAUERNFEIN *et. al.*, 2009; LATZ *et. al.*, 2013). Tal regulação composta de dois pontos de checagem é reflexo do quão potente é o efeito modulador do inflamassoma e seus produtos na inflamação, estando a desregulação desse sistema associada a uma série de doenças auto-inflamatórias e auto-imunes (SAAVEDRA *et. al.*, 2015). Assim, semelhantemente à geração de IL-1 β , a ativação do inflamassoma NLRP3 ocorre em duas etapas, controladas por dois sinais (figura 5). A primeira etapa, também conhecida como *priming*, acontece mediante a ligação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α ao seu respectivo receptor de

membrana, ou por meio do engajamento de PRRs no reconhecimento de PAMPs do microrganismo invasor, culminando na transcrição do receptor e das citocinas IL-1 β e IL-18 por meio da ativação do NF- κ B. Entre os PAMPs, o componente de parede β (1,3)-glucana, via sinalização Dectina-1/SYK, tem se mostrado o mais importante primeiro sinal fornecido por fungos (TAVARES *et. al.*, 2015). Além de Dectina-1, outro PRR, TLR2, é implicado nessa etapa, quando trata-se por exemplo da infecção por *C. albicans* (HISE *et. al.*, 2009). A segunda etapa consiste na ativação do inflamassoma em si, em que a caspase-1 cliva as citocinas imaturas formadas na primeira etapa em suas formas biologicamente ativas. Os estímulos (ou segundo sinal de ativação) necessários à ocorrência dessa etapa derradeira já foram abordados anteriormente.

Recentemente, foi demonstrado por BORGHI e colaboradores (2015) que, na candidíase vaginal, a inibição do inflamassoma NLRP3 contribui para o controle da infecção por *C. albicans*, na medida em que o recrutamento neutrofílico e inflamação elicitada pelo receptor NLRP3 apresenta um papel deletério para o hospedeiro neste modelo de doença. Previamente à este estudo, o mesmo grupo mostrou também que prevenindo-se a ativação do inflamassoma NLRP3 e a subsequente liberação de seu produto, IL-1 β , animais com aspergilose pulmonar apresentaram melhora no quadro de infecção (MORETTI *et. al.*, 2014). Esses são os primeiros e únicos relatos emergentes até a presente data acerca de um papel negativo do inflamassoma no contexto de doenças fúngicas, e servem para se levar em consideração a importância do balanço adequado da resposta imune e seus componentes, como os inflamassomas, evitando-se o efeito deletério resultante de respostas inflamatórias exacerbadas, a fim de se obter um desfecho da infecção menos nocivo e com menos sequelas ao hospedeiro. Entretanto, para as demais infecções fúngicas onde foi verificada a participação do inflamassoma NLRP3, este exibiu um papel favorável para a resolução da doença. De fato, mesmo para a candidíase, o inflamassoma NLRP3 já foi demonstrado em vários estudos como um importante componente na resposta imune a seu agente etiológico, por exemplo, quando este acometia outro sítio que costuma ser afetado pela doença, a mucosa oral (HISE *et. al.*, 2009; TOMALKA *et. al.*, 2011). Inclusive, foi em um estudo da candidíase que se observou o impacto de componentes do inflamassoma NLRP3, como ASC e caspase-1, na imunidade adaptativa, por meio da modulação de respostas Th1 e Th17, conhecidamente importantes no combate à disseminação de *C. albicans* e à infecções fúngicas em geral (VAN DE VEERDONK *et. al.*, 2011). Resultados divergentes também foram observados para infecções causadas por *A. fumigatus*, cuja disseminação sistêmica

era permitida na falta dos receptores NLRP3, bem como de AIM2 (KARKI *et. al.*, 2015). Outro fungo, responsável por uma infecção oportunista menos frequente em comparação às causadas por aqueles dois fungos, mas ainda de grande ocorrência mundial, o *Cryptococcus neoformans* também foi demonstrado como capaz de ativar o inflamassoma NLRP3. Além disso, relatou-se no mesmo estudo que o engajamento do receptor NLRP3 promoveu a infiltração de células imunológicas que levaram à eliminação do fungo em um modelo murino de criptococose pulmonar (GUO *et. al.*, 2014). Ademais, o papel protetor do inflamassoma NLRP3 se estende a patógenos fúngicos primários como o *Paracoccidioides brasiliensis*, de acordo com resultados publicados por nosso grupo (TAVARES *et. al.*, 2013). Em adição, *Trichophyton schoenleinii* e *Microsporum canis*, fungos causadores de uma micose superficial conhecida como Tinea capitis, a mais comum infecção fúngica na infância, apresentam capacidade de ativar o inflamassoma NLRP3. Porém, não existem estudos publicados onde se verificou o papel do inflamassoma na doença causada por esses dermatófitos (MOHRENSCHLAGER *et. al.*, 2005; LI *et. al.*, 2013; MAO *et. al.*, 2014).

O principal mecanismo protetor do inflamassoma sugerido na maioria desses estudos sobre infecções fúngicas reside no potencial da maturação de citocinas IL-1 β e/ou IL-18, expresso por meio da atividade catalítica reguladora desempenhada pela caspase-1 (figura 6). Não obstante, recentemente foi revelada a participação de outras caspases (8 e 11) na sinalização do inflamassoma (de forma não-canônica) e, por meio deste, na liberação dessas citocinas (KAYAGAKI *et. al.*, 2011; DUPAUL-CHICOINE & SALEH, 2012). Gabrielli e colaboradores (2015) demonstraram que aspartil proteínases de *C. albicans* são capazes de induzir não somente a ativação do inflamassoma via NLRP3/caspase-1, assim como, por meio da indução de interferon do tipo I (IFN), também a ativação de caspase-11, cooperando com a caspase-1 no incremento da secreção de IL-1 β . Além disso, a ativação não-canônica do inflamassoma via caspase-11 pode ocorrer independentemente da ativação da caspase-1, como demonstrado por um estudo de Kayagaki e colaboradores (2011). Além da secreção de citocinas IL-1 β e IL-18, outro importante mecanismo desempenhado pela resposta inata e que pode ser controlado pela sinalização do inflamassoma, tanto via caspase-1, quanto caspase-11, é a indução da piroptose, programa importante de morte celular lítica com função na: (I) interrupção da replicação de patógenos intracelulares (destruindo seu sítio de multiplicação); (II) eliminação do microrganismo por fagócitos ativados que ganham acesso ao patógeno exposto; (III) modulação da resposta imune adaptativa por meio da

liberação de moléculas com propriedade adjuvante (e.g. IL-1 α e HMGB1) (LAMKANFI & DIXIT, 2014).

Embora não haja estudos que o associem diretamente à ativação da piroptose, o inflamassoma de caspase-8, assim como os demais, apresenta um notável papel na maturação de IL-1 β . Interessantemente, o inflamassoma de caspase-8 é capaz de regular a secreção de IL-1 β independentemente de um NLR, bastando-se o engajamento da dectina-1 no reconhecimento extracelular de determinados fungos (e.g. *C. albicans* e *A. fumigatus*) para se promover tanto a transcrição quanto o processamento da IL-1 β (figura 6) (GRINGHUIS *et. al.*, 2012). Ademais, já se foi demonstrado, utilizando-se células dendríticas, um papel mediador da enzima na produção de IL-1 β via sinalização pelo inflamassoma NLRP3 independente de caspase-1 (ANTONOPOULOS *et. al.*, 2015).

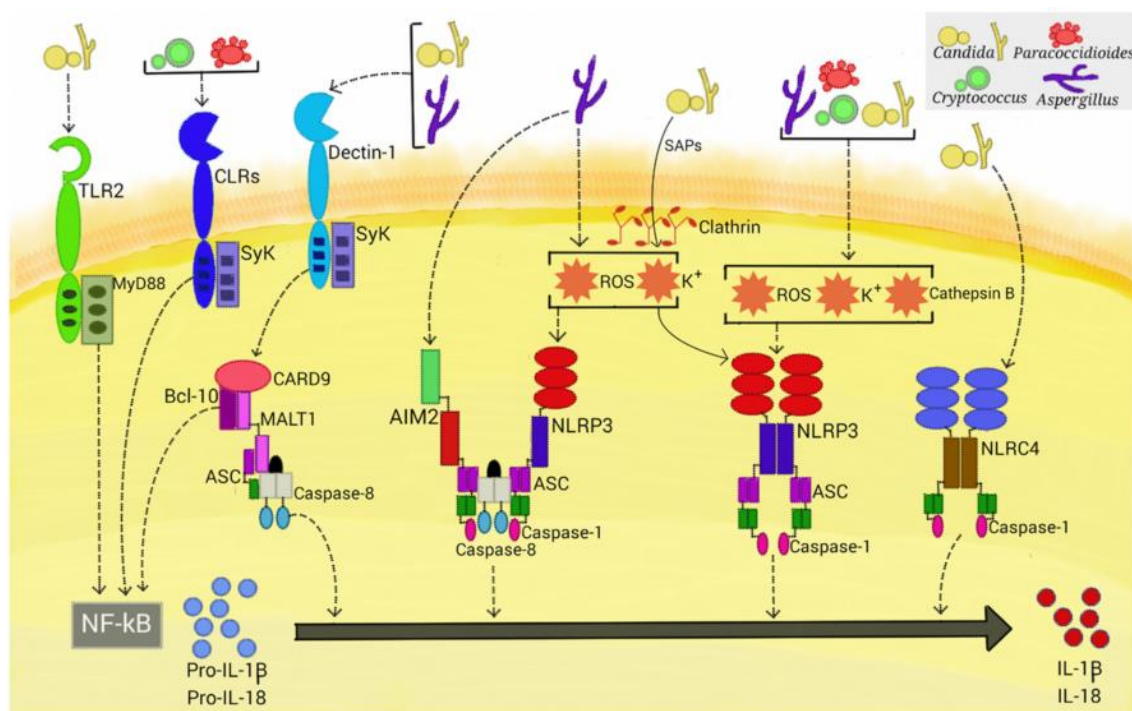


Figura 6. Ativação do inflamassoma por fungos patogênicos. Quatro complexos inflamassoma são ativados por fungos patogênicos sistêmicos. *Candida*, *Apergillus*, *Cryptococcus* e *Paracoccidioides* ativam receptores associados ao primeiro sinal (e.g. dectina-1 e -2) para a ativação do inflamassoma. Todos os quatro patógenos ativam o inflamassoma canônico de NLRP3 por meio da indução de ROS, efluxo de potássio e liberação de catepsina B. Retirado de (TAVARES *et. al.*, 2015).

II. Objetivos

1. Objetivo geral

Considerando que estudos sobre a ativação do inflamassoma por *F. pedrosoi* são inexistentes até o momento, bem como as emergentes evidências do importante papel dos inflamassomas em infecções fúngicas, este trabalho tenciona investigar e descrever, comparativamente, os mecanismos de ativação do inflamassoma pelas formas saprofíticas de *F. pedrosoi*, além de avaliar o papel do inflamassoma no controle da infecção induzida pelo fungo.

2. Objetivos específicos

- 1- Analisar comparativamente a ativação do inflamassoma por conídios e hifas de *F. pedrosoi* em macrófagos e células dendríticas
- 2- Investigar o papel de NF- κ B e MyD88 na secreção da IL-1 β induzida pelo *F. pedrosoi*
- 3- Definir os mecanismos moleculares que levam à ativação do inflamassoma
- 4- Avaliar o potencial modulador da melanina sobre o inflamassoma
- 5- Verificar o papel e contribuição do inflamassoma e seus componentes NLRP3 e caspase-1/11 no controle da infecção *in vitro* e *in vivo*

III. Materiais e Métodos

1. Animais

Foram utilizados no estudo camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 (*Mus musculus*) com 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram mantidos em condições sanitárias apropriadas, com fornecimento de água e ração *ad libitum*, no biotério do Instituto de Biologia – UnB. Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com as diretrizes do CONCEA e foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Uso Animal da UnB (UnBDoc 134976/2014).

2. Cultura celular

Foram utilizadas no decorrer deste estudo culturas de células primárias - macrófagos e células dendríticas derivados de medula óssea (BMDMs e BMDCs, respectivamente) - e uma cultura de linhagem celular humana – THP-1. A geração das BMDMs e BMDCs foi realizada a partir da diferenciação das células tronco hematopoiéticas murinas segundo protocolo preconizado por Lutz e colaboradores (1999). Para a extração das células precursoras da medula óssea, o interior de fêmures e tíbias dos camundongos foram lavados com meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) a 4 °C com o auxílio de uma seringa para a liberação das células da medula. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 300 x g durante 5 minutos e, após o descarte do sobrenadante, o precipitado celular submetido à ação de uma solução de lise de hemácias (8,3 g/l de cloreto de amônio em 0,01 M de tampão Tris-HCl) (Sigma-Aldrich). Após a remoção da solução por centrifugação, 2×10^6 células foram ressuspensas em 10 ml de meio para diferenciação composto por RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), além de 20 ng/ml do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos GM-CSF (eBioscience), 50 μ M de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e gentamicina. A suspensão foi colocada em placas de petri e acondicionada em estufa à 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO₂.

No terceiro dia de cultivo foram acrescentados mais 10 ml de meio suplementado. No sexto dia de cultivo, metade do volume da placa (10 ml) foi retirado e centrifugado a

300 x g durante 5 minutos, sendo o precipitado celular formado ressuspensionado em 10 ml de novo meio para diferenciação e as células devolvidas à placa de origem. Após oito dias de cultura celular, o sobrenadante - composto de células não aderidas, BMDCs - foi coletado. A monocamada de células aderidas à superfície da placa, BMDMs, foi recoberta com uma solução enzimática denominada “TrypLE Express” (Invitrogen), durante 20 minutos em estufa a 37 °C, para promover o desprendimento celular da superfície da placa. Após contagem das células em corante de exclusão azul de tripan (a fim de se avaliar a viabilidade celular), as BMDMs e BMDCs foram ressuspensionadas em meio de experimentação (RPMI-1640 acrescido de 10 % de SFB) e colocadas em placas de cultura para repousar e aderir durante 24 horas. Após esse período, o meio foi renovado e deu-se início aos experimentos.

A linhagem de monócito humano (THP-1) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ) e mantida por passagens em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de SFB e 10 µM de β-mercaptoetanol.

3. Fungo

Foi utilizada neste trabalho a cepa de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428. O fungo foi cultivado em meio Batata Dextrose (BD, 10% de batata inglesa e 1% de dextrose) durante 11-14 dias, à 32 °C, sob 120 rotações por minuto (rpm). Para a obtenção de conídios para os ensaios *in vitro* e *in vivo*, o fungo foi submetido à filtração a vácuo por papel filtro qualitativo com poros de 14 µm (J. Prolab), o que proporcionou suspensões celulares com a pureza de, pelo menos, 99 % de conídios. O inóculo de propágulos fúngicos (mistura de conídios e fragmentos de hifas) para a infecção *in vivo* foi obtido por meio de várias etapas de filtração. Primeiramente, o fungo foi macerado com o auxílio da base do êmbolo de uma seringa, em filtro celular de nylon com poros de 70 µm de tamanho (BD), e lavado com tampão fosfato-salino (PBS, Phosphate Buffered Saline). Em seguida, a suspensão de fungos obtida desta etapa de filtração foi transferida para um filtro celular de nylon com poros de 40 µm de tamanho (BD). O fungo retido neste último filtro foi lavado repetidas vezes com PBS até que esse fungo retido atingisse a proporção 1:3 de conídios para hifas, e utilizado como o inóculo de propágulos fúngicos. Para a obtenção somente de fragmentos de hifas, utilizados nos ensaios de interação *in vitro*, a etapa de lavagem se estendeu até que o fungo retido atingisse, no mínimo, 95 % de

fragmentos de hifas. Após a etapa de filtração, recuperou-se o fungo retido no filtro em um novo tubo contendo PBS. A suspensão celular de conídios, fragmentos de hifas ou ambos misturados foi centrifugada a 4000 x g por 5 minutos e em seguida lavada com PBS por duas vezes para uso nos experimentos.

Para a obtenção do conídio intumescido, conídios ($5 \times 10^6/\text{ml}$) foram incubados em meio RPMI suplementado a 20 % com SFB por 6 horas, à 37 °C, sob 120 rpm. Em seguida, o fungo foi fixado com paraformaldeído (PFA) a 3 % e lavado conforme acima para o uso nos ensaios de interação e avaliação do intumescimento conidial. Esta foi realizada, previamente aos experimentos, por meio de citometria de fluxo (FACSVerse – BD Biosciences), através da comparação - entre o fungo incubado com PBS ou com o meio suplementado - dos parâmetros de FSC (fornecido pelo detector de dispersão de luz frontal do equipamento), correlacionado ao volume celular; e SSC (gerado em razão da captação de luz por um foto-sensor de dispersão lateral), que depende da complexidade interna da célula (e.g. quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos). Os dados adquiridos foram analisados no programa FlowJo (versão 6.0), sendo representados na forma de gráfico de pontos (dot plot) e histograma.

O fungo parcialmente depletado de melanina foi obtido por meio de duas formas: tratamento do fungo com hidróxido de sódio (descrito em maiores detalhes abaixo) para a remoção da melanina associada à parede; e cultivo do fungo em meio acrescido de 32 mg/l de um inibidor seletivo da via DHN de biossíntese de melanina, triciclazol (5-metil-1,2,4-triazol-(3,4- β)-benzotiazol; BIM 750[®], Down Agrosociences), de acordo com testes realizados por Cunha e colaboradores (2005). O triciclazol (TC) foi diluído em etanol e adicionado ao meio de cultivo de forma que a concentração final de etanol não excedesse 0,25 % (vol/vol). O fungo deficiente em melanina foi fixado com PFA para o uso nos ensaios de interação, assim como o fungo melanizado que serviu como grupo controle. Para os ensaios onde se utilizou o fungo inativado, o fungo foi tratado com PFA a 3 % em PBS por 6 horas. Posteriormente, o fungo foi lavado (centrifugação a 4000 x g por 5 minutos e ressuspensão em PBS) três vezes e reservado até seu uso. A inativação do fungo foi confirmada por meio da avaliação do crescimento das células em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA; Himedia).

4. Extração de melanina secretada e da melanina de parede

Para a obtenção da melanina secretada (MS) (também conhecida como chromoAg) e da melanina de parede do fungo (MP), foi utilizado o meio de cultura líquido Sabouraud Dextrose (SD; Himedia) para o cultivo do fungo à 37 °C por 14 dias. Esse meio promove o crescimento do fungo tanto na forma conidial quanto, principalmente, na forma filamentosa, o que permite um maior rendimento na obtenção de melanina de parede, considerando o maior tamanho desta forma celular. Após esse período, as células do fungo foram separadas do sobrenadante por centrifugação à 5000 x g, por 20 minutos, e reservadas. O sobrenadante foi, em seguida, submetido à filtração por membrana de 3 µm de diâmetro para assegurar a remoção de células do sobrenadante. Posteriormente, o filtrado livre de células e composto por componentes secretados (dentre eles a melanina) pelo *F. pedrosoi* foi congelado à -80 °C e liofilizado. Previamente aos ensaios de interação, o liofilizado foi pesado, solubilizado em água destilada estéril e utilizado.

As células reservadas do cultivo em meio SD foram utilizadas para a extração da melanina associada à parede do fungo, segundo protocolo adaptado da metodologia descrita por Alviano e colaboradores (1991). Para isso, as células foram inativadas com formaldeído a 4 % por um período de 24 horas. Posteriormente, foram submetidas à centrifugação a 5000 x g por 10 minutos e ressuspensas em água destilada, repetindo-se esta operação por mais quatro vezes. Após essas lavagens, o fungo foi ressuspense em solução de NaOH (Merck) a 1 M na concentração de 10 mg de células fúngicas/ml à 32 °C por 24 horas, sob 120 rpm. Como a melanina é solúvel em soluções altamente alcalinas, difundiu-se das células para a solução de extração, tornando-a notavelmente escura. Na etapa seguinte, a suspensão celular foi centrifugada à 5000 x g por 30 minutos para a separação do fungo e do sobrenadante rico em melanina que foi, em seguida, submetido também à filtração por membrana com poros de 0,22 µm de diâmetro para assegurar a remoção de células e debris celulares do sobrenadante. Considerando-se a insolubilidade da melanina em soluções fortemente ácidas, o sobrenadante foi acidificado com HCl (Dinâmica) a 5 M até que o pH de valor 1.5 fosse atingido. O precipitado contendo o pigmento foi centrifugado a 5000 x g por 20 minutos e lavado exaustivamente com água destilada até que o sobrenadante de lavagem atingisse pH próximo ao neutro. Após a eliminação do sobrenadante da última lavagem, a amostra foi congelada a -80 °C, liofilizada e pesada. O pigmento insolúvel foi ressuspense em água destilada e submetido

à vigorosa agitação junto à 200 mg de pérolas de vidro de 425-600 μm (Sigma-Aldrich) para a obtenção de partículas de melanina de parede passíveis de sofrerem fagocitose. Foi utilizado em todo o processo de extração materiais estéreis, sendo as soluções esterilizadas por filtração.

5. Ensaio de interação *in vitro*

Para a realização dos experimentos *in vitro*, BMDMs, BMDCs e células THP-1, na concentração de 10^6 células/ml, foram submetidas à interação com MS, MP (200 $\mu\text{g/ml}$), ou com as formas do fungo em uma multiplicidade de infecção (MOI, Multiplicity Of Infection) (onde MOI é a razão entre o número de fungos e o número de células em um ensaio de infecção) igual a 3 e a 1 para infecções com conídios e fragmentos de hifas, respectivamente, durante 24 horas em meio RPMI com 10 % de SFB. Como controle negativo de comparação ao grupo estimulado com MS, as células primárias foram incubadas com 200 $\mu\text{g/ml}$ de meio Sabouraud Dextrose. Outros estímulos como LPS (500 ng/ml, adicionado 3 horas previamente à interação; Sigma-Aldrich) e ATP (5 mM, adicionado 1 hora antes da coleta do sobrenadante; InvivoGen) foram utilizados, bem como adotados como controle positivo para a secreção de IL-1 β , quando incubados juntos.

Com o propósito de caracterizar os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória, foram adicionados uma hora e meia previamente ao desafio das células, inibidores de: I κ B quinase, celastrol (5 μM ; InvivoGen); MYD88, Pepinh-MYD (40 μM ; InvivoGen); catepsina b, CA-074 Me (25 μM ; Sigma-Aldrich); espécies reativas de oxigênio (ROS), Rotenona (10 μM ; Sigma-Aldrich); efluxo de potássio, Glibenclamida (150 μM ; InvivoGen); caspase-1, AC-Y-VAD-CHO (50 μM ; InvivoGen); caspase-8, Z-IETD-FMK (50 μM ; Santa Cruz). Ademais, a avaliação do efeito da inibição do efluxo de potássio também foi realizada por meio do tratamento das células com KCl (50 mM; Sigma-Aldrich).

6. Ensaio de capacidade fungicida *in vitro*

Para o estudo do papel de componentes do inflamassoma na morte intracelular do *F. pedrosoi*, foram empregadas BMDMs provenientes de animais selvagens (WT) ou deficientes para as proteínas NLRP3 e caspase-1/11. As BMDMs selvagens foram tratadas ou não com ATP como descrito anteriormente. Ademais, como controle positivo da ativação fungicida, os macrófagos selvagens foram também incubados com IFN- γ (20 ng/ml; Sigma-Aldrich) desde 3 horas antes da infecção com conídios ou fragmentos de hifa. Ao término de 24 horas de interação com o fungo, as células foram lavadas para a remoção do fungo não fagocitado em suspensão ou fracamente aderido e, em seguida, os fagócitos foram lisados com 200 μ l de uma solução aquosa do detergente SDS (0,05 %; Dodecil Sulfato de Sódio, Bio-Rad). As células fúngicas foram expostas após a lise total dos macrófagos e, em seguida, submetidas à diluição seriada em PBS. A partir de 1 ml de suspensão celular de conídios ou fragmentos de hifas diluída 1:500 e 1:20, respectivamente, 100 μ l foram coletados e plaqueados em meio Sabouraud Dextrose Agar, seguido da incubação das placas em estufa estacionária durante 5-7 dias, a 37 °C. Posteriormente, a quantidade de células viáveis foi determinada por meio da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) para a análise da capacidade microbicida contra conídios e fragmentos de hifas.

7. Quantificação de óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico das amostras de sobrenadante provenientes dos ensaios para avaliação da capacidade fungicida *in vitro* foi determinada por meio da reação colorimétrica de Griess. Resumidamente, 50 μ l da amostra foram incubadas com o mesmo volume do reagente de Griess (1% de sulfanilamida diluída em ácido ortofosfórico e 0,1% de cloridrato de naftiletilediamino). A absorbância do cromóforo formado foi medida por espectrofotometria a 540 nm. A concentração molar de nitrito (produto da degradação do óxido nítrico liberado no sobrenadante) nas amostras foi determinada em comparação a uma curva padrão (com uma faixa de concentração de 100-1,56 μ M) obtida da diluição seriada de NaNO₂ em meio de experimentação.

8. Dosagem de citocinas

O sobrenadante obtido dos ensaios de cultura celular foram submetidos à técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Ensaio de Ligação Imunoenzimático) a fim de se avaliar os níveis de citocinas presentes nas amostras, demonstrados em valores absolutos (pg/ml). Foram utilizados kits comerciais (kit Ready-Set-Go!; eBioscience), seguindo-se as recomendações dos fabricantes, para a dosagem de IL-1 β e TNF- α .

9. Ensaio de infecção *in vivo* e análise da evolução da doença

Animais selvagens (WT) e nocautes para as proteínas NLRP3 e Caspase-1/11 foram infectados via subcutânea no coxim plantar com 50 μ l de PBS contendo 10⁶ conídios ou propágulos do fungo (na proporção de 1:3 de conídios para fragmentos de hifa) *F. pedrosoi*. A análise da evolução da doença foi realizada pela avaliação morfológica da lesão formada, feita por meio da medição do diâmetro da lesão, a cada 3 dias, com o auxílio de um paquímetro; bem como pela coleta de amostras de tecidos infectados para a determinação da carga fúngica pela determinação de UFC. Segundo dados prévios (não publicados) do nosso grupo, conídios apresentam baixa persistência no hospedeiro murino, enquanto que a infecção deste com propágulos fúngicos promove uma doença de curso mais duradouro. Visto isso, animais infectados com conídios foram sacrificados e submetidos à quantificação de UFC após 7, 14 e 21 dias da inoculação do fungo, enquanto que para camundongos infectados com propágulos fúngicos foram adotados tempos mais tardios de 14, 21 e 28 dias de infecção. Foram empregados 4 animais de cada grupo (WT, NLRP3^{-/-} e Caspase-1/11^{-/-}) para cada ponto de coleta (n=4).

Para a determinação da carga fúngica das lesões, os fragmentos de lesão foram pesados e macerados com macerador de vidro em 700 μ l de PBS estéril. Posteriormente, foram centrifugados a 1000 x g, ressuspensos novamente em PBS e plaqueados em meio SDA suplementado com antibiótico, sendo mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente. A quantidade de células viáveis foi determinada por meio da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), sendo o resultado representado em UFC/g de tecido.

10. Análises estatísticas

Os experimentos *in vitro* foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo os dados obtidos nesses experimentos expressos como a média \pm SEM de um experimento representativo de dois ou três experimentos conduzidos em triplicatas. Os experimentos *in vivo* foram analisados por two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo os dados obtidos nesses experimentos expressos como a média \pm SD de um experimento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0. As diferenças foram consideradas significativamente estatísticas se $p \leq 0,05$.

IV. Resultados

1. O *F. pedrosoi* induz a ativação do inflamassoma

Para verificar se o *F. pedrosoi* poderia induzir a secreção da interleucina-1 β , BMDMs e BMDCs murinas foram infectadas com as diferentes formas saprofíticas do fungo – conídios e hifas. A infecção com os fragmentos de hifas resultou na secreção expressiva de IL-1 β em ambas as células primárias após 24 horas de interação (Figura 7A e 7B). Houve o incremento nessa secreção quando ambas as células primárias infectadas foram co-estimuladas com LPS ou ATP (Figura 7A e 7B).

Diversamente, o conídio de *F. pedrosoi* não foi capaz de induzir diretamente a secreção de IL-1 β (Figura 7A), bem como a de TNF- α (Figura 9C e 9D), cuja secreção, embora ocorra independentemente da ativação do inflamassoma, ocorre após a geração do primeiro sinal. Entretanto, quando BMDCs, mas não BMDMs, foram tratadas com LPS previamente à infecção com conídios, estes foram capazes de induzir a secreção de IL-1 β , atuando como um segundo sinal de ativação do inflamassoma (Figura 7A e 7B). Ademais, após a adição de ATP ao cultivo de fagócitos infectados com conídios, foi detectada uma robusta secreção de IL-1 β no sobrenadante celular de BMDCs, mas não de BMDMs, em níveis semelhantes aos de BMDCs estimuladas com ATP e infectadas com hifas (Figura 7A e 7B).

Esses dados sugerem que hifas apresentam um maior potencial de ativação do inflamassoma em comparação aos conídios, fornecendo os dois sinais para a ativação do inflamassoma, tanto em BMDMs, quanto em BMDCs. Diferentemente, os conídios só são capazes de ativar o inflamassoma em BMDCs, após o fornecimento exógeno do primeiro ou segundo sinal de ativação do inflamassoma.

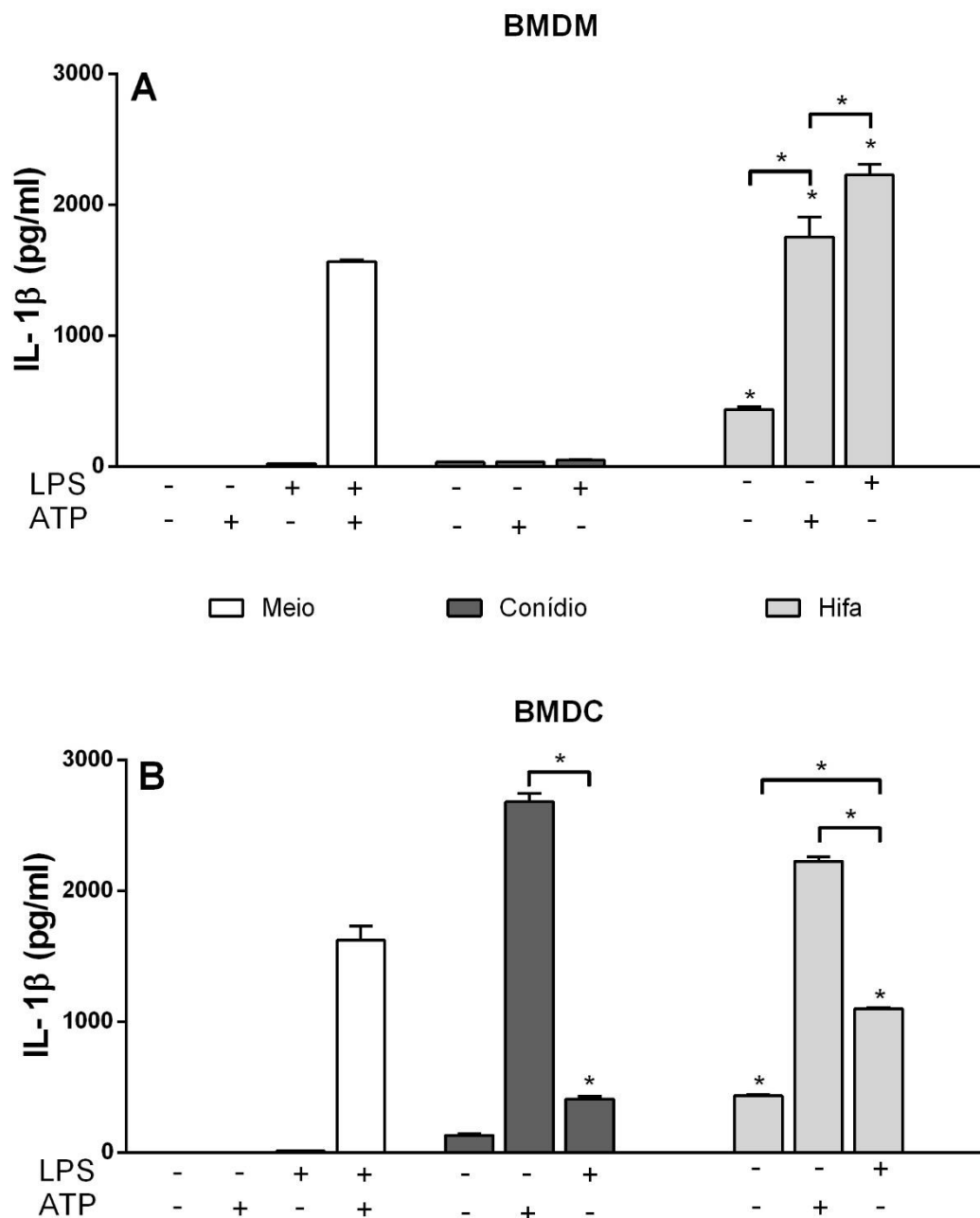


Figura 7. O *F. pedrosoi* induz a ativação do inflamassoma. Níveis de IL-1 β após interação de BMDMs (A) e BMDCs (B) durante 24 horas com conídios e fragmentos de hifas de *F. pedrosoi* (MOI 3 e 1, respectivamente); LPS, ATP (adicionado 3 horas antes do início ou 1 hora antes do término da interação, respectivamente), ou ambos, como controle positivo da citocina. * $p \leq 0,05$, em referência à comparação com o grupo de células não infectadas e não estimuladas (meio) ou com outro grupo quando indicado.

2. Alterações na morfologia do conídio não contribuem para a ativação do inflamassoma

Os conídios de *Aspergillus spp.* atingem, no primeiro estágio visível do seu processo de transformação em hifas, um estágio de inchamento e, associado à esse fenômeno, apresentam um aumento da exposição de componentes de parede imunoestimuladores, como a β -1,3-glucana (HOHL *et. al.*, 2005; STEELE *et. al.*, 2005; GERSUK *et. al.*, 2006). Para verificar se o conídio do *F. pedrosoi* passa por esse processo, bem como se adquiriria capacidade de ativar o inflamassoma quando atingisse tal estágio, conídios foram previamente incubados em PBS ou em meio RPMI com 20 % de SFB, inativados e utilizados para a interação com BMDMs e BMDCs. Embora foi observada a transformação do fungo incubado em meio, conforme indicado pelo aumento celular (Figura 8), o intumescimento da célula não contribuiu para a secreção de IL-1 β , assim como a de TNF- α (Figura 9).

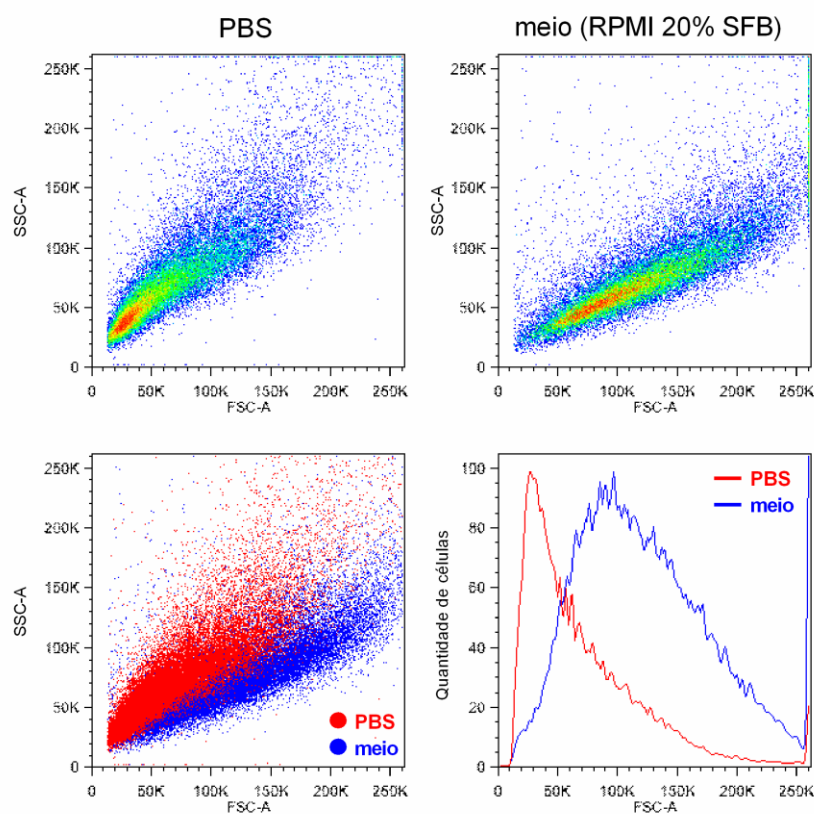


Figura 8. O conídio do *Fonsecaea pedrosoi* atinge o estágio de intumescimento celular. Parâmetros de FSC e SSC de conídios de *F. pedrosoi* incubados durante 6 horas em PBS ou meio RPMI com 20 % de SFB e representados através de gráfico de pontos (painéis superiores e painel inferior esquerdo) e histograma de número de células vs FSC (painel inferior direito).

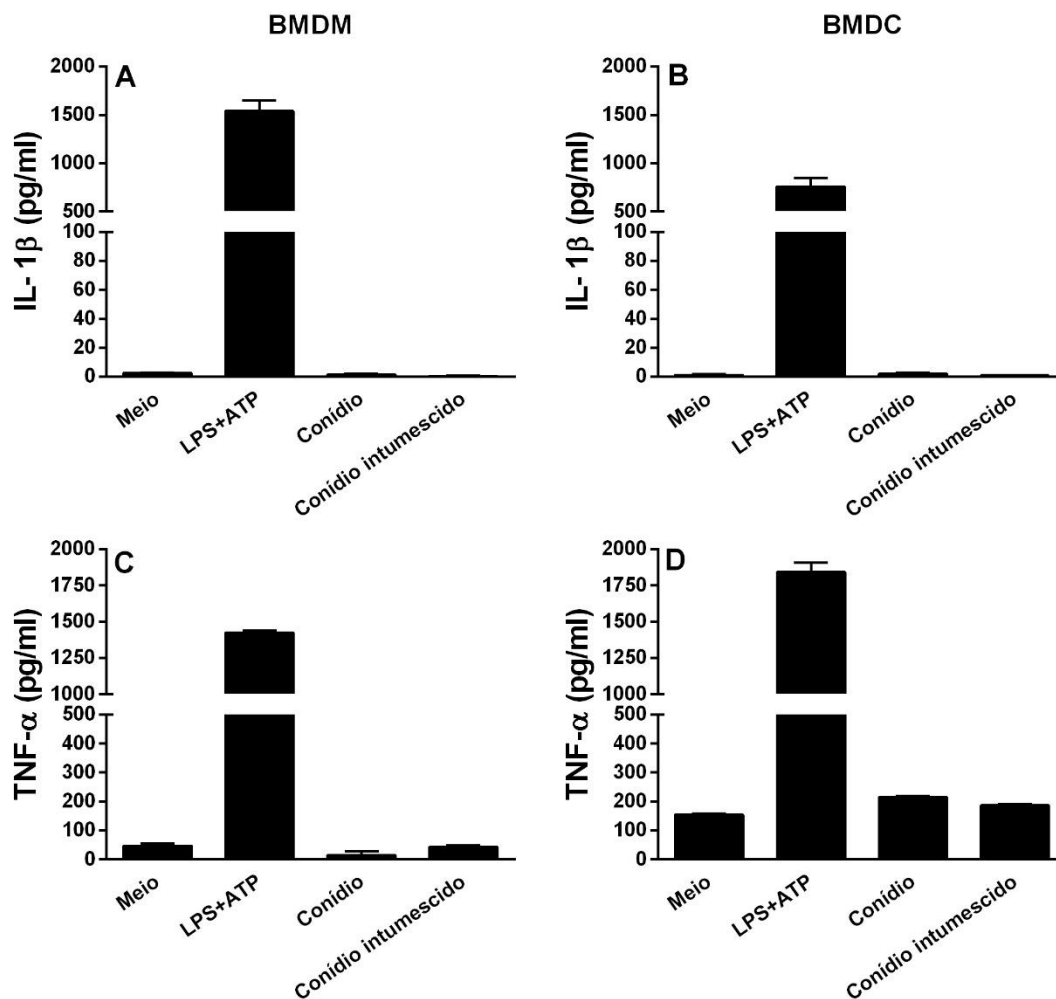


Figura 9. Alterações na morfologia do conídio não contribuem para a ativação do inflamassoma. Níveis de IL-1 β e TNF- α após ensaio de interação de BMDMs (A e C) e BMDCs (B e D) com conídios e conídios intumescidos (incubados em meio RPMI com 20 % de SFB) inativados previamente com paraformaldeído.

3. A sinalização via NF- κ B, independentemente de MyD88, leva à ativação do inflamassoma por *F. pedrosoi*

A fim de investigar as vias de sinalização que participam do reconhecimento do *F. pedrosoi* e estão envolvidas na produção de IL-1 β , BMDMs foram tratadas com inibidores de NF- κ B (Celastrol) e MyD88 (PepHin-MYD), sendo posteriormente infectadas ou não com fragmentos de hifas do fungo. Como esperado, a secreção de IL-1 β foi abolida nas células que sofreram inibição para NF- κ B (Figura 10A). O mesmo foi

observado para TNF, visto que NF- κ B é um fator de transcrição que promove não somente a produção da forma imatura da IL-1 β e do receptor NLRP3, como também a do TNF- α (Figura 10B).

Ademais, a inibição de MyD88, proteína adaptadora chave na transdução de sinal de receptores TLRs que culmina na ativação de NF- κ B, embora tenha atenuado a secreção de TNF- α , não afetou os níveis de IL-1 β produzidos pelos macrófagos (Figura 10B). Esses resultados indicam que a sinalização via NF- κ B, independentemente de MyD88, leva à ativação do inflamassoma por *F. pedrosoi*.

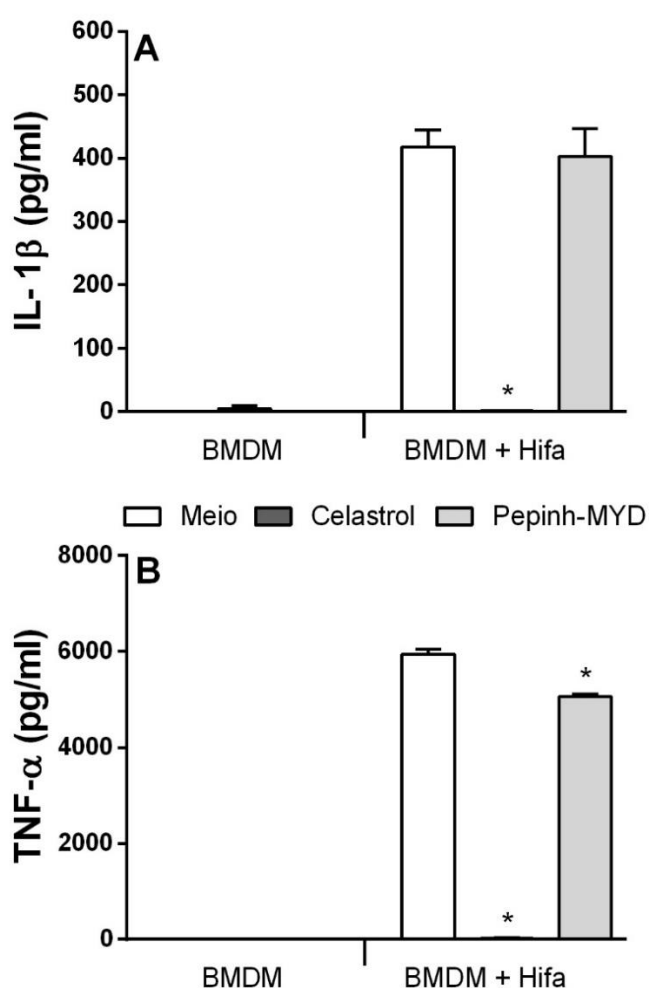


Figura 10. A sinalização via NF- κ B, independentemente de MyD88, leva à ativação do inflamassoma por *F. pedrosoi*. Níveis de IL-1 β (A) e TNF- α (B) após ensaio de infecção de BMDMs tratadas previamente com inibidores para NF- κ B (Celastrol) e MyD88 (Pepinh-MYD). * $p \leq 0,05$, em referência à comparação com o grupo de células infectadas e não tratadas com inibidor.

4. A secreção de IL-1 β induzida por *F. pedrosoi* é dependente de NLRP3, caspase-1, e influenciada pela caspase-8

A IL-1 β é inicialmente produzida como um precursor citosólico, pro-IL-1b, e, diferentemente de outras citocinas, requer clivagem proteolítica antes da sua secreção. Também produzida como um zimógeno, a caspase-1 é uma protease de cisteína presente em uma diversidade de inflamassomas (NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2) que, quando ativados, induzem sua auto-clivagem, capacitando-a processar IL-1 β em sua forma ativa secretada (SOLLBERGER *et. al.*, 2014). Com isso em mente, fez-se o uso de um inibidor de caspase-1, AC-Y-VAD-CHO, para avaliar se a secreção de IL-1 β induzida por *F. pedrosoi* dependia da atividade dessa caspase. Como esperado, houve robusta redução dos níveis da citocina em ensaios com BMDMs e BMDCs (Figura 11A e 11B). O mesmo foi observado quando utilizou-se células deficientes de caspase-1/11 (Figura 12A e 12B), corroborando assim o resultado obtido com o uso do inibidor. As células selvagens tratadas com AC-Y-VAD-CHO, ou mesmo as células nocautes para caspase-1/11, apresentaram estatisticamente a mesma quantidade de TNF- α em seu sobrenadante que o de células selvagens com caspase-1 funcional (Figuras 11C, 11D, 12C e 12D).

Considerando que um estudo recente demonstrou a participação de uma via não canônica na maturação e secreção de IL-1 β induzida por *Candida* e *Aspergillus*, as células foram incubadas com um inibidor da caspase-8, Z-IETD-FMK, para se avaliar a possível participação do inflamassoma não-canônico de caspase-8 no modelo deste trabalho (GRINGHUIS *et. al.*, 2012). Interessantemente, foi verificada uma queda parcial dos níveis de IL-1 β (mas não de TNF- α) em células tratadas com o inibidor, indicando que o *F. pedrosoi* atua na ativação do inflamassoma também por uma via de ativação dependente de caspase-8, embora não essencial para a maturação e secreção de IL-1 β como é a via canônica (Figura 10A-D).

É de conhecimento que o inflamassoma NLRP3 atua mediando a secreção de IL-1 β em resposta a uma extensa lista de fungos patogênicos composta por *A. fumigatus*, *P. brasiliensis*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *T. schoenleinii* e outros (TAVARES *et. al.*, 2015; LI *et. al.*, 2013). Para avaliar se a secreção de IL-1 β em resposta ao desafio de BMDMs e BMDCs com *F. pedrosoi* foi dependente do engajamento do receptor NLRP3, foram empregadas células obtidas de animais nocaute para esse receptor. Pode-se concluir, a partir da abrupta redução da secreção da IL-1 β (porém não de TNF- α) no

sobrenadante das células deficientes para NLRP3, em comparação ao de células selvagens, que a produção de IL-1 β por BMDMs e BMDCs infectadas com *F. pedrosoi* é dependente da ativação do inflamassoma NLRP3 (Figura 12).

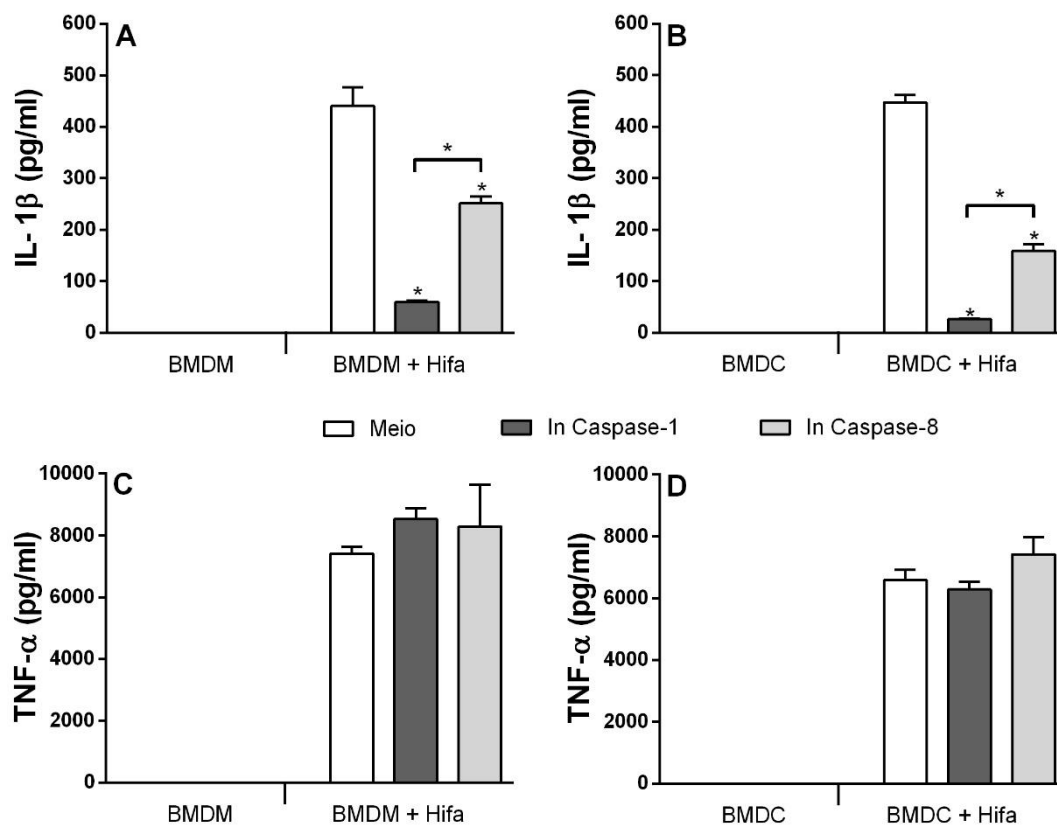


Figura 11. A secreção de IL-1 β induzida por *F. pedrosoi* é dependente de caspase-1 e influenciada pela caspase-8. Níveis de IL-1 β e TNF- α após ensaio de infecção de BMDMs (A, C) e BMDCs (B, D) tratadas previamente com inibidores para caspase-1 (AC-Y-VAD-CHO) ou caspase-8 (Z-IETD-FMK). *p \leq 0,05, em referência à comparação com o grupo de células infectadas e não tratadas com inibidor, ou com outro grupo quando indicado.

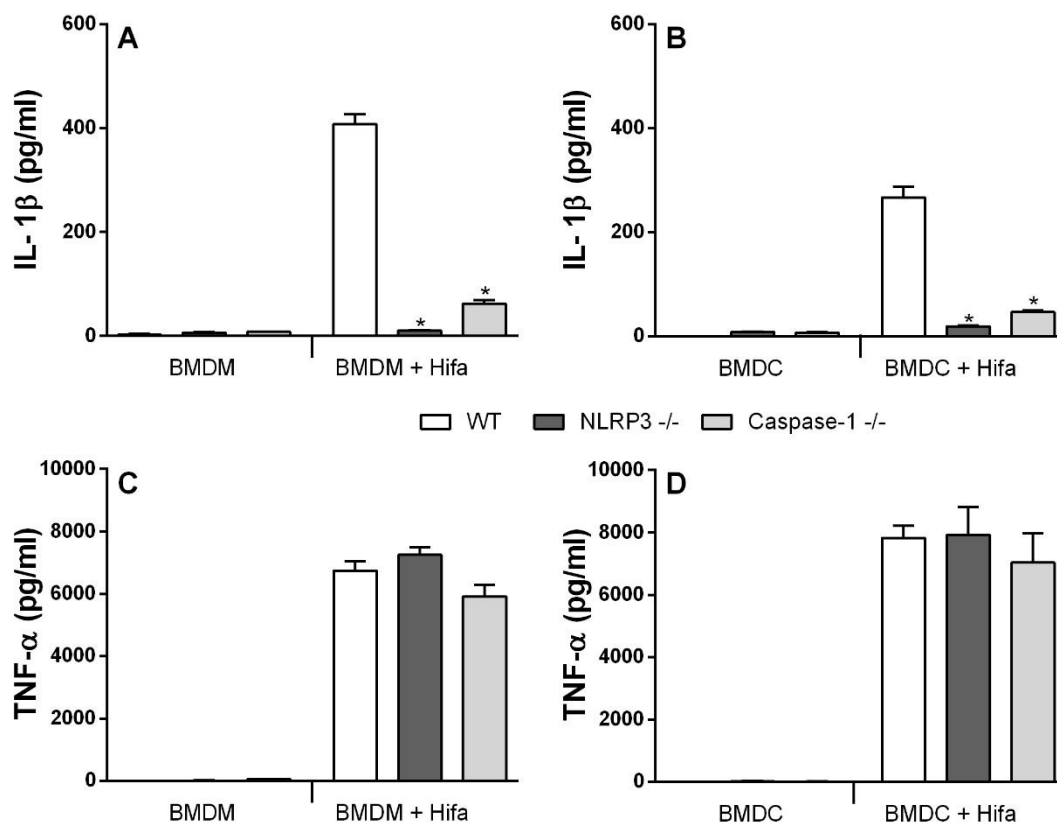


Figura 12. A secreção de IL-1 β induzida por *F. pedrosoi* é dependente de NLRP3 e caspase-1. Níveis de IL-1 β e TNF- α após ensaio de infecção de BMDMs (A e C) e BMDCs (B e D) provenientes de animais selvagens (WT) e deficientes de NLRP3 ou caspase-1/11. * $p \leq 0,05$, em referência à comparação com o grupo de células selvagens.

5. O efluxo de potássio, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a liberação de catepsina B estão envolvidos na ativação do inflamassoma NLRP3 por *F. pedrosoi*

Entre os mecanismos de ativação mais aceitos e descritos com maior frequência para a ativação do inflamassoma NLRP3, situam-se o efluxo de potássio e a liberação de ROS e de catepsina B no citosol (SCHRODER & TSCHOPP, 2010). Para verificar se os mecanismos supracitados estavam envolvidos na ativação do inflamassoma NLRP3 por *F. pedrosoi*, as BMDMs e BMDCs foram pré-tratadas com CA-074, um inibidor da atividade da catepsina B. Como observado na figura 13 (A e B), a indução da secreção de

IL-1 β após 24 horas de infecção foi drasticamente diminuída, assim como, curiosamente, a secreção de TNF- α (Figura 12C e 12D).

Posteriormente, as células foram tratadas com um inibidor de ROS denominado rotenona, que atua interferindo no complexo I da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, organela que representa um potencial sítio de co-localização do NLRP3 durante respostas inflamatórias (RIMESSI *et. al.*, 2015). Como esperado, a secreção de IL-1 β foi reduzida em BMDMs, porém, de maneira menos intensa em relação aos outros inibidores (Figura 13A). Contrariamente, houve um aumento nos níveis de IL-1 β no sobrenadante de BMDCs (Figura 13B). Os níveis de TNF- α , em contrapartida, permaneceram inalterados em ambos os tipos celulares, o que sugere que a diminuição de IL-1 β não ocorreu devido à efeitos tóxicos às células provocados pelo uso do inibidor (Figura 13C e D).

Por fim, foi avaliado se a ativação do inflamassoma NLRP3 pelo fungo era dependente do efluxo de potássio. Foram utilizadas duas metodologias distintas para a execução desse teste: tratamento das células com glibenclamida, um agente que bloqueia seletivamente canais de potássio sensíveis ao ATP, impedindo a maturação de caspase-1 e de pró-IL-1 β ; e adição de uma alta quantidade de íons K⁺ (fornecido na forma de KCl) ao ambiente extracelular, de forma a suprimir o gradiente de concentração intracelular-extracelular que permite o transporte do cátion para fora da célula. Nas duas condições de bloqueio das células, estas apresentaram drástica redução no processamento de IL-1 β , como indicado pela fraca detecção de IL-1 β no sobrenadante de cultura (Figura 13A e 13B). A adição do inibidor ou de KCl não repercutiu na alteração dos níveis de TNF- α (Figura 13C e 13D).

Tomados em conjunto, esses dados mostram que o efluxo de potássio, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a liberação de catepsina B estão envolvidos na ativação do inflamassoma NLRP3 por *F. pedrosoi*, embora essa ativação prescindia de ROS.

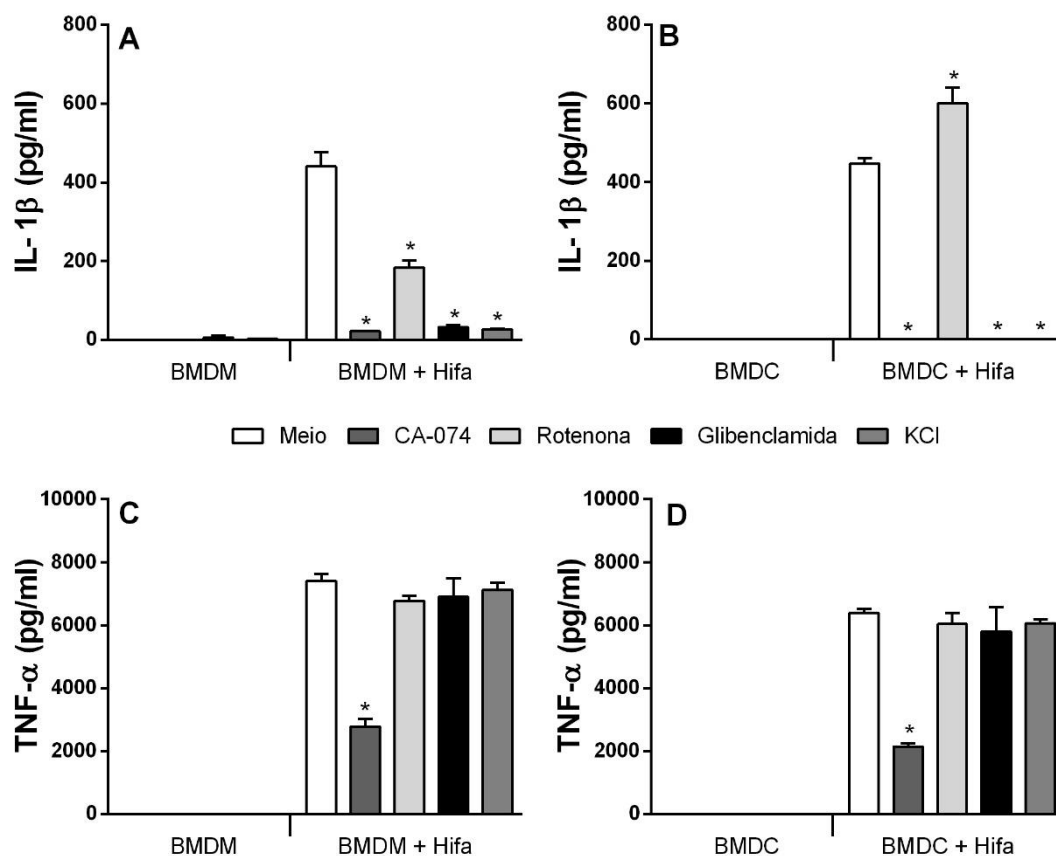


Figura 13. O efluxo de potássio, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a liberação de catepsina B estão envolvidos na ativação do inflamassoma NLRP3 por *F. pedrosoi*. Níveis de IL-1 β e TNF- α após ensaio de infecção de BMDMs (A, C) e BMDCs (B, D) tratadas previamente com inibidores para catepsina B (CA-074), espécies reativas de oxigênio - ROS (rotenona), canal de K⁺ sensível ao ATP (glibenclamida); ou incubadas com KCl. *p \leq 0,05, em referência à comparação com o grupo de células infectadas e não incubadas com inibidor ou KCl.

6. A viabilidade de *F. pedrosoi* não interfere na indução da secreção de IL-1 β

Para se determinar a importância da viabilidade de *F. pedrosoi* na ativação do inflamassoma, as BMDMs e BMDCs foram infectadas com conídios e hifas viáveis ou inativadas por fixação com paraformaldeído, para posterior mensuração de IL-1 β e TNF- α no sobrenadante de cultivo por ELISA. Verificou-se que a viabilidade dos conídios não interferiu na secreção tanto de IL-1 β (Figura 14A e 14B), quanto de TNF- α (Figura 14A e 14B), visto que o nível dessas citocinas permaneceu inalterado mediante a infecção com células do fungo tratadas ou não com paraformaldeído. Ademais, esse resultado já era

esperado, dado que mesmo a infecção com conídios vivos não foi capaz de promover a secreção dessas citocinas (Figura 14). Curiosamente, de forma contrária à outros modelos de ativação do inflamassoma por fungos, hifas de *F. pedrosoi* vivas ou mortas apresentaram-se estatisticamente iguais no tocante à capacidade de induzir a secreção de IL-1 β , tanto em BMDMs, quanto em BMDCs (Figura 14A e 14B). Por outro lado, foi observado um incremento nos níveis de TNF- α no sobrenadante de fagócitos que interagiram com hifas mortas, em relação àquelas infectadas com o fungo vivo (Figura 14C e 14D). Esses resultados sugerem que componentes imunoestimuladores, cuja presença no fungo é inalterada após o tratamento químico com um agente fixador, são responsáveis pela ativação do inflamassoma por hifas de *F. pedrosoi*.

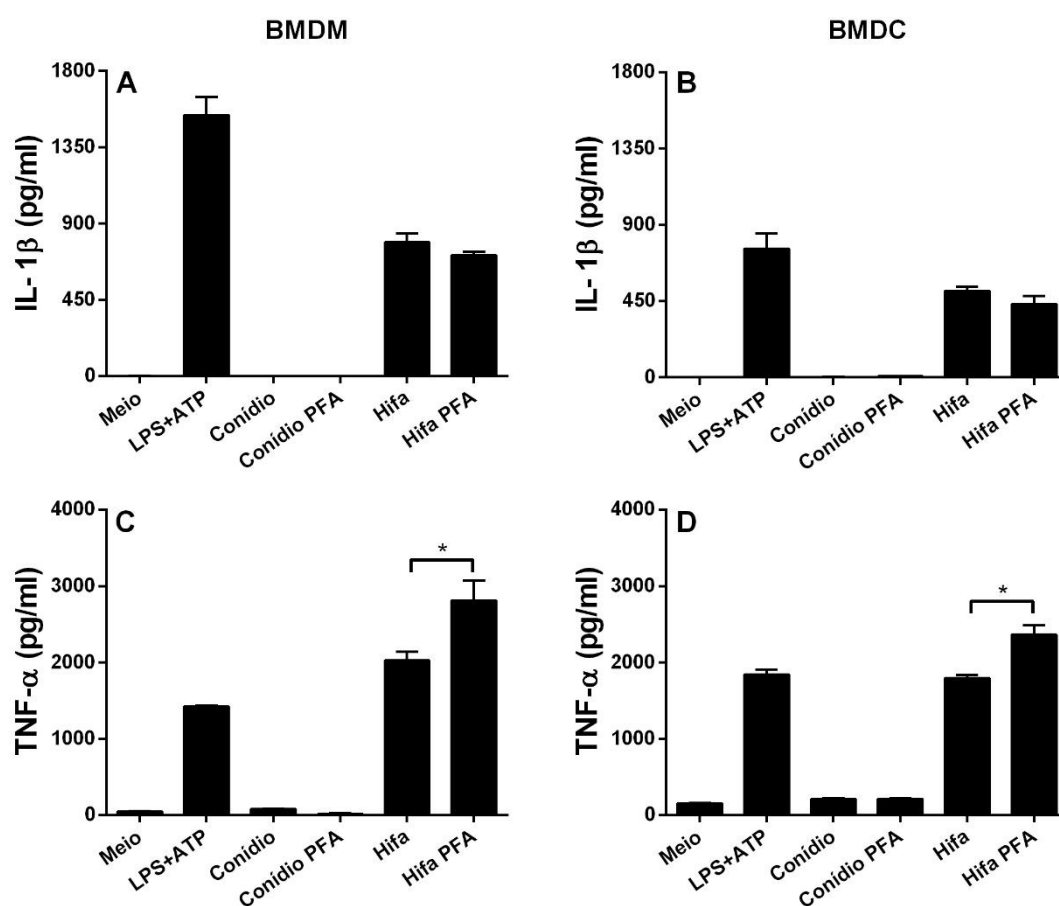


Figura 14. A viabilidade de *F. pedrosoi* não interfere na indução da secreção de IL-1 β . Níveis de IL-1 β e TNF- α após ensaio de interação de BMDMs (A, C) e BMDCs (B, D) com conídios e fragmentos de hifas viáveis ou inativados com paraformaldeído (PFA). * $p \leq 0,05$, em referência à comparação com o grupo de células infectadas com células fúngicas viáveis.

7. A melanina contribui para a ativação do inflamassoma

Considerando que a melanina presente na parede celular do *F. pedrosoi* poderia encobrir componentes imunoestimuladores capazes de gerar o 1º sinal para a ativação do inflamassoma, foi hipotetizado aqui que este importante fator de virulência estaria reduzindo, por meio da inibição do reconhecimento apropriado do fungo, a capacidade das células do *F. pedrosoi* em induzir a secreção de níveis ainda mais robustos de IL-1 β . Com o objetivo de avaliar o papel da melanina na modulação do inflamassoma, hifas de *F. pedrosoi* foram parcialmente depletadas de melanina e utilizadas para interação com as BMDMs e BMDCs. Surpreendentemente, foi observado uma redução expressiva dos níveis de IL-1 β (Figura 15A e 15B), embora não de TNF- α (Figura 15C e 15D), das células incubadas na presença do fungo parcialmente depletado de melanina, em relação ao grupo controle infectado.

Para investigar mais a fundo o papel e o possível tipo de estímulo fornecido pela melanina para a indução da secreção da IL-1 β , foi realizada tanto a extração da melanina incorporada à parede (MP), insolúvel, quanto a secretada no meio de cultivo (MS), solúvel, para posterior interação com BMDMs e BMDCs. Foi observado que a melanina de parede celular induziu diretamente a secreção de IL-1 β , bem como de TNF- α , tanto por BMDMs, quanto por BMDCs (Figura 16A-D). Houve, em adição, um acréscimo nos níveis de IL-1 β (exceto em BMDCs) e TNF- α no sobrenadante das células incubadas com LPS previamente à interação (Figura 16A-D). Em contrapartida, a melanina secretada não induziu a produção de nenhuma das citocinas pró-inflamatórias avaliadas (Figura 16A-D).

Para certificar que a ativação do inflamassoma foi devido à ação da melanina e não à uma possível contaminação com LPS durante os processos de extração do polímero, BMDMs deficientes de TLR4, principal receptor do LPS, foram incubadas com a melanina de parede. Como os níveis de TNF- α – citocina normalmente secretada em resposta à ativação do TLR4 – detectados no sobrenadante de cultivo dessas células não foram inferiores aos mensurados no sobrenadante de células selvagens, descartou-se a hipótese de contaminação da melanina de parede (Figura 16E). Em conjunto, esses resultados indicam que a melanina de parede, mas não a secretada, fornece ambos o primeiro e o segundo sinal para a ativação do inflamassoma.

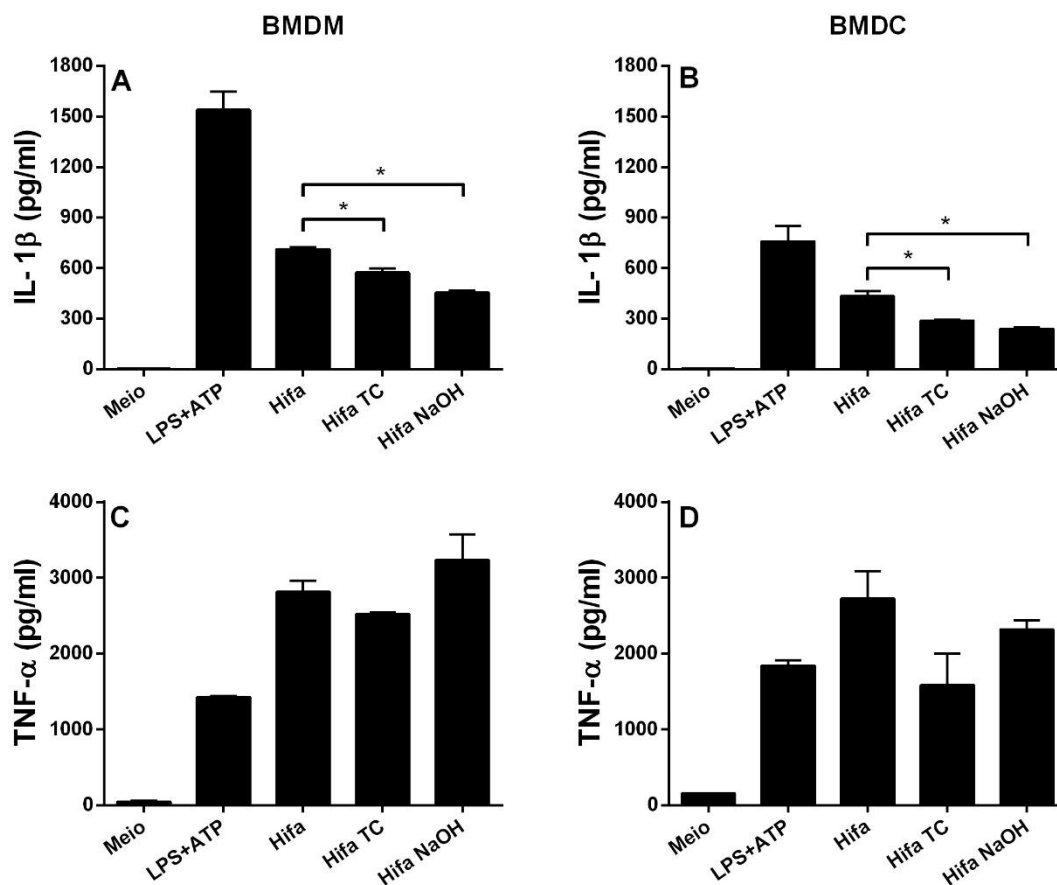


Figura 15. A depleção parcial da melanina de parede prejudica a indução da secreção de IL-1 β . Níveis de IL-1 β e TNF- α após ensaio de interação de BMDMs (A, C) e BMDCs (B, D) com fragmentos de hifas cultivados na presença do inibidor da síntese de melanina DHN, triciclazol (TC), ou tratados com hidróxido de sódio (NaOH), ambos inativados anteriormente com paraformaldeído. * $p \leq 0,05$.

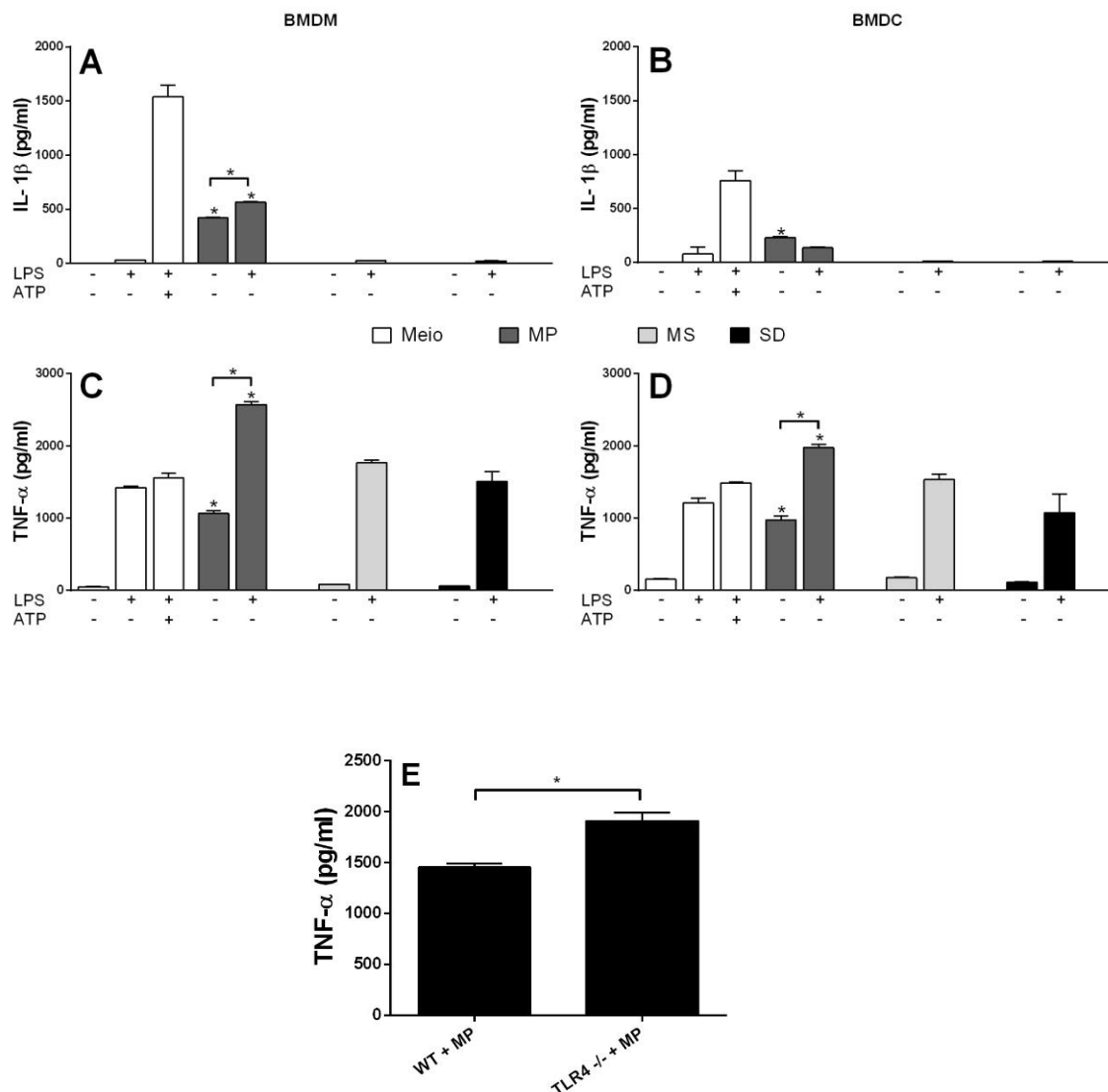


Figura 16. A melanina contribui para a ativação do inflamassoma. Níveis de IL-1 β e TNF- α após ensaio de interação de BMDMs (A e C) e BMDCs (B e D) com 200 μ g/ml de melanina de parede (MP); melanina solúvel (MS) ou seu controle de comparação, o meio Sabouraud Dextrose (SD). As células foram incubadas também com meio, LPS, ATP (adicionado 3 horas antes do início ou 1 hora antes do término da interação, respectivamente), ou ambos, como controle positivo da IL-1 β . (E) Níveis de TNF- α após ensaio de interação de BMDMs selvagens ou deficientes de TLR4 com melanina de parede (a 200 μ g/ml). * $p \leq 0,05$, em referência à comparação com o grupo de células não estimuladas (meio), ou com outro grupo quando indicado.

8. A ativação do inflamassoma *in vitro* não contribui para a morte de *F. pedrosoi*

Para avaliar o papel funcional da ativação do inflamassoma *in vitro* na morte do *F. pedrosoi*, BMDMs selvagens e deficientes para NLRP3 ou caspase-1/11 foram infectadas por 24 horas com conídios ou fragmentos de hifas do fungo. Ao final da infecção, os macrófagos foram lisados para a contagem das unidades formadoras de colônias, que se apresentou estatisticamente igual entre os cultivos com células selvagens ou nocautes, tanto na infecção com conídios (Figura 17A) quanto na infecção com hifas (Figura 17B). Em uma tentativa de otimizar a resposta fungicida dos macrófagos por meio da intensificação da ativação do inflamassoma, as células selvagens foram co-estimuladas com ATP. Entretanto, não houve redução na quantidade de UFC de células incubadas com ATP, ou mesmo com IFN- γ , importante ativador de mecanismos fungicidas de macrófagos (Figura 17C e 17D).

Para avaliar se essa incapacidade fungicida dos BMDMs decorreu de uma baixa produção de óxido nítrico, molécula de grande importância para a atividade fungicida dos macrófagos, o sobrenadante de cultivo foi submetido à reação de Griess para a determinação dos níveis de óxido nítrico. Foi observado que apenas as células tratadas com IFN- γ produziram níveis relevantes de óxido nítrico (Figura 18C e 18D), embora, mesmo assim, não tenha surtido efeito na morte do fungo (Figura 17C e 17D). Esses resultados corroboram dados da literatura que mostram que embora possam atuar na restrição do crescimento intracelular do *F. pedrosoi*, macrófagos não apresentam papel microbicida frente a esse fungo (ROZENTAL *et. al.*, 1994).

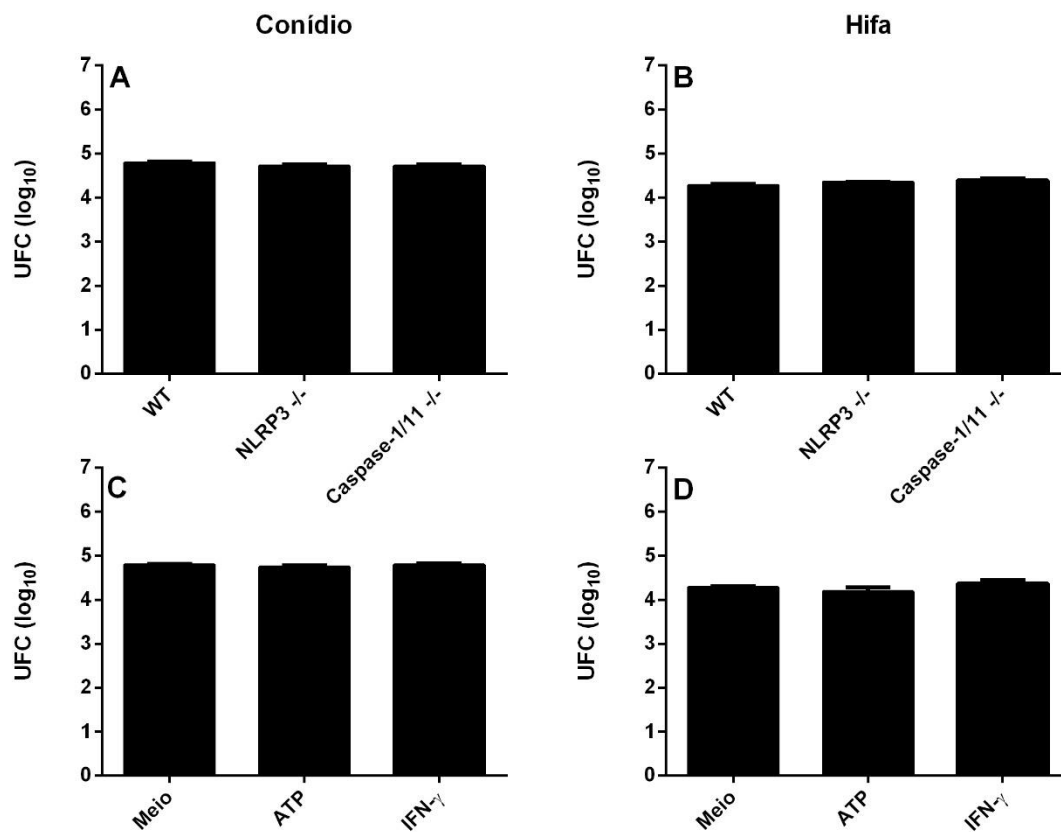


Figura 17. A ativação do inflamassoma *in vitro* não contribui para a morte de *F. pedrosoi*. Quantidade de unidades formadoras de colônias após ensaio de infecção de BMDMs provenientes de animais selvagens (WT) e deficientes de NLRP3 ou caspase-1 com conídios (A) ou fragmentos de hifas (B) em um MOI de 1. Quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) após ensaio de infecção de BMDMs tratadas previamente com IFN- γ ou com ATP após a infecção com conídios (C) ou fragmentos de hifas (D).

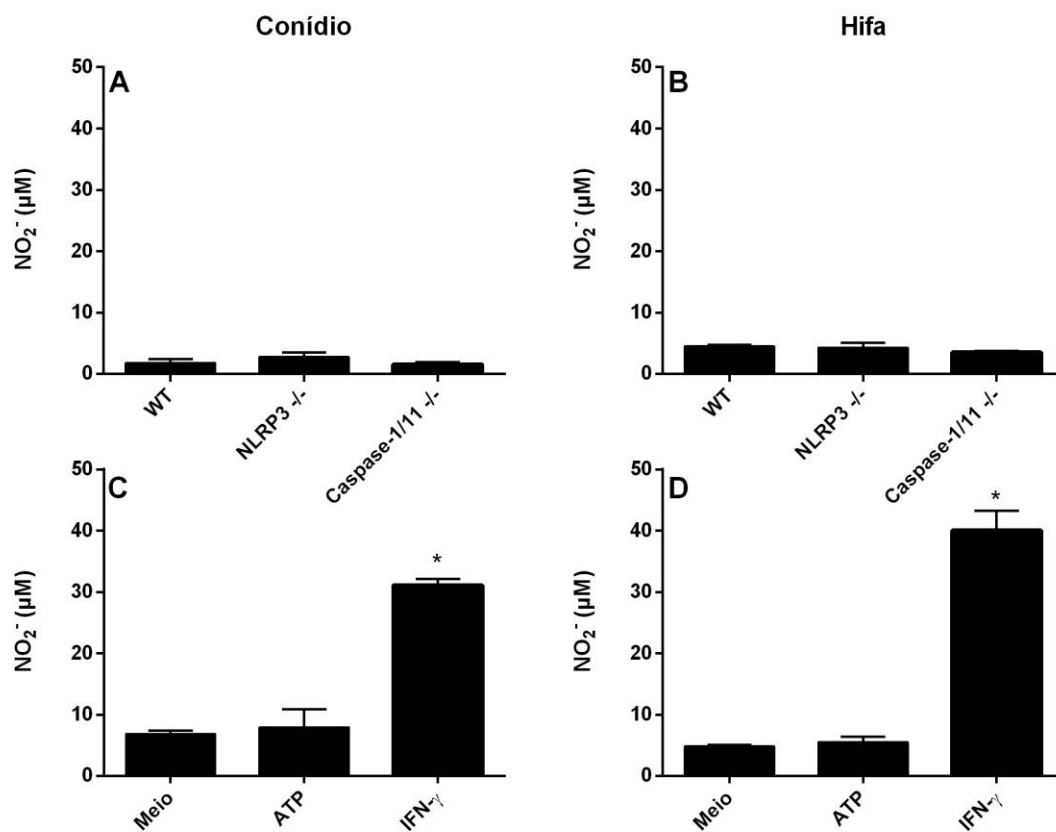


Figura 18. Níveis de NO₂⁻ do ensaio de capacidade fungicida *in vitro*. Dosagem de NO₂⁻ após ensaio de infecção de BMDMs provenientes de animais selvagens (WT) e deficientes de NLRP3 ou caspase-1 com conídios (A) ou fragmentos de hifas (B) em um MOI de 1. Dosagem de NO₂⁻ após ensaio de infecção de BMDMs tratadas previamente com IFN- γ ou com ATP após a infecção com conídios (C) ou fragmentos de hifas (D). * $p \leq 0,05$, em referência à comparação com o grupo de células não estimuladas (meio).

9. As proteínas caspase-1/11 e NLRP3, componentes do inflamassoma, contribuem no controle da CBM experimental murina

A ativação do inflamassoma pode contribuir para a defesa antimicrobiana de várias formas, que incluem não só a potencialização de mecanismos microbicidas de fagócitos, como também a indução do recrutamento leucocitário para sítios sob infecção, fortalecimento de respostas antimicrobianas e pró-inflamatórias desempenhadas por peptídeos, promoção de piroptose, entre outros (TOMALKA *et. al.*, 2011; CHEN & SCHRODER, 2013). Nesse contexto, para avaliar se as proteínas do inflamassoma, NLRP3 e caspase-1/11, contribuem no controle da infecção em camundongos experimentalmente infectados com conídios ou com propágulos fúngicos do *F. pedrosoi*, realizou-se uma cinética de infecção com essas formas saprofíticas do fungo. Na infecção com conídios foi verificado que, embora o diâmetro das lesões foi maior em camundongos deficientes de NLRP3, após 6 dias de infecção; e 6, 9 e 12 dias pós-infecção no grupo com deficiência para caspase-1/11 (Figura 19A), em relação aos animais selvagens, a carga fúngica desses animais e dos animais nocautes, em todos os tempos analisados, foi estatisticamente igual (Figura 19B).

Ao analisar o diâmetro das lesões dos animais infectados com propágulos fúngicos, nota-se um aumento de tamanho, em relação ao grupo controle, nos animais nocautes para caspase-1/11 com 6 e 15 dias de infecção, enquanto que animais deficientes para o receptor analisado apresentaram menor diâmetro da lesão, com 3 dias pós-infecção (Figura 20A). Entretanto, no tempo mais tardio de infecção, somente animais nocautes exibiram a presença de fungos viáveis na lesão, de acordo com a análise de UFC, mostrando um papel positivo dos componentes do inflamassoma, NLRP3 e caspase-1/11, na debelação da cromoblastomicose em modelo murino (Figura 20B).

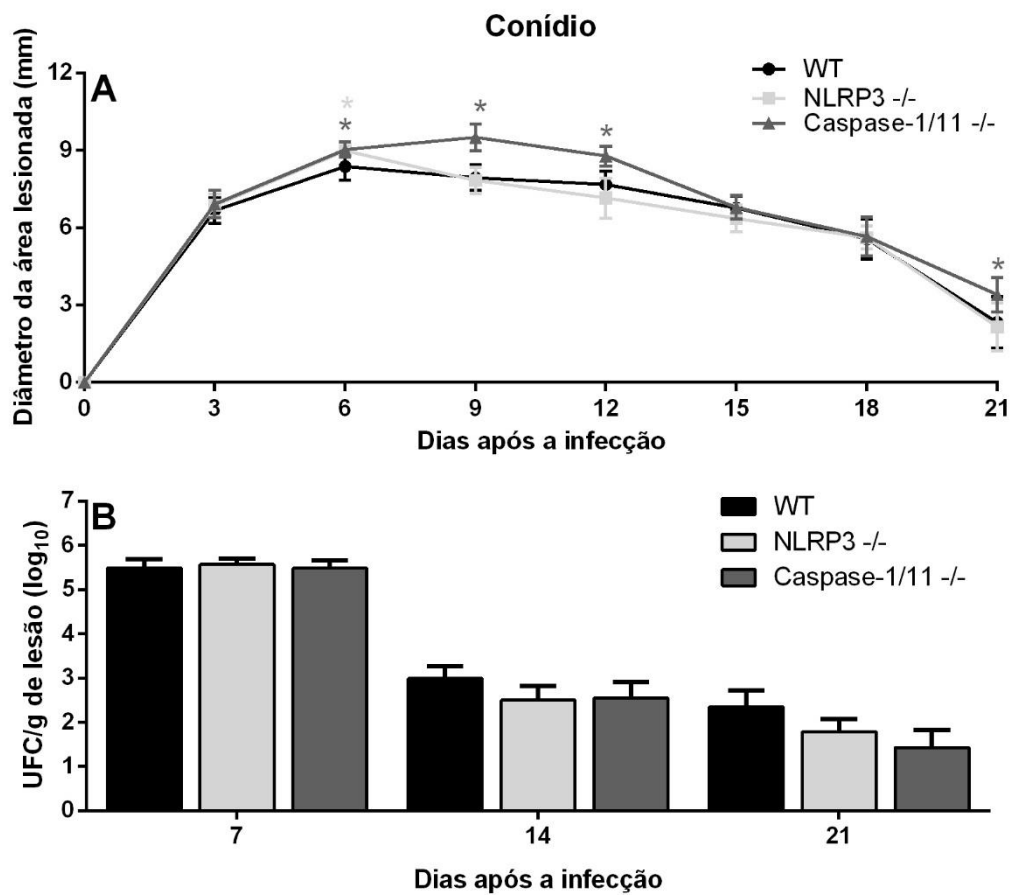


Figura 19. Cinética de infecção *in vivo* com conídios do *Fonsecaea pedrosoi*. Camundongos selvagens (WT) e deficientes de NLRP3 e caspase-1/11 foram infectados com 10^6 conídios via subcutânea no coxim plantar. A cada 3 dias foi realizada a morfometria da área lesionada, bem como, nos 7º, 14º e 21º dias após a infecção, realizou-se o sacrifício dos animais para obtenção do macerado da pata destinado à quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC), expressas como UFC/g de tecido lesionado. Os dados são provenientes de um único ensaio de infecção onde foram utilizados 4 animais/grupo (n=4). * $p \leq 0,05$, em referência à comparação com o grupo WT.

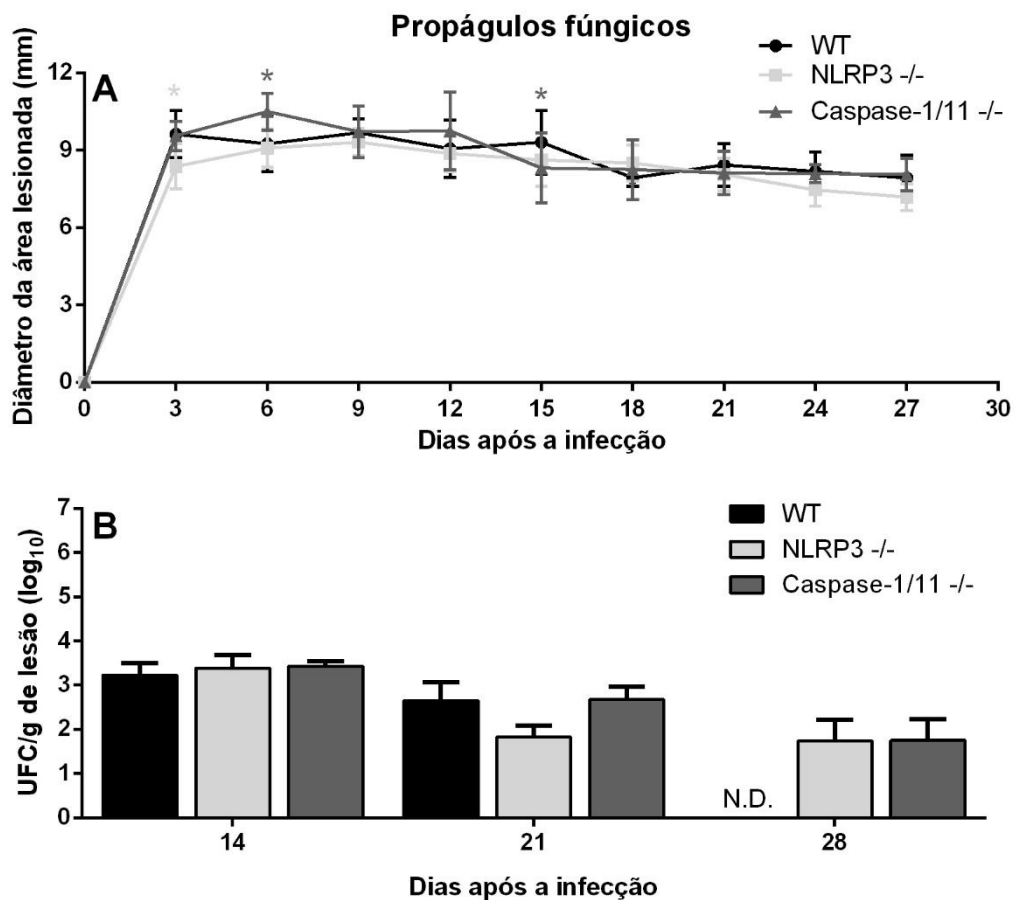


Figura 20. Cinética de infecção *in vivo* com propágulos do *Fonsecaea pedrosoi*. Camundongos selvagens (WT) e deficientes de NLRP3 e caspase-1/11 foram infectados com 10^6 fragmentos de hifas via subcutânea no coxim plantar. A cada 3 dias foi realizada a morfometria da área lesionada, bem como, nos 14^o, 21^o e 28^o dias após a infecção, realizou-se o sacrifício dos animais para obtenção do macerado da pata destinado à quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC), expressas como UFC/g de tecido lesionado. Os dados são provenientes de um único ensaio de infecção onde foram utilizados 4 animais/grupo (n=4). N.D.: Não detectado. * $p \leq 0,05$, em referência à comparação com o grupo WT.

10. *F. pedrosoi* induz a secreção de IL-1 β em linhagem de células humanas

A fim de avaliar a habilidade de *F. pedrosoi* em induzir a secreção de IL-1 β por células humanas *in vitro*, monócitos humanos da linhagem THP-1 foram utilizadas para ensaios de interação com as formas saprofíticas do fungo e a melanina de parede do mesmo. Como resultado, foi observada a secreção de IL-1 β nos sobrenadantes dos cocultivos com hifa e melanina, enquanto não houve diferença entre o grupo controle e o grupo de células infectadas com conídios. Contudo, células THP-1 que receberam estímulo de LPS previamente à infecção adquiriram capacidade marcante de secretar IL-1 β frente ao desafio celular com conídios, em quantidade superior às células incubadas com LPS na ausência do fungo (Figura 21). Vale ser mencionado o notável potencial dessa linhagem celular em secretar IL-1 β apenas na presença de um primeiro sinal de ativação, como o provido pelo LPS, embora o conídio sozinho não forneça um primeiro sinal capaz de levar à secreção da IL-1 β .

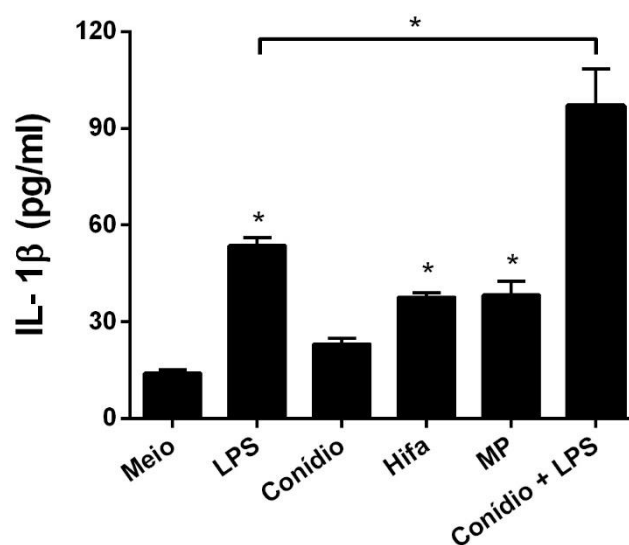


Figura 21. *F. pedrosoi* induz a secreção de IL-1 β em linhagem de células humanas. Níveis de IL-1 β após ensaio de interação de conídios, fragmentos de hifas e melanina de parede (MP) com monócitos THP-1. * $p \leq 0,05$, em referência à comparação com o grupo de células não infectadas e não estimuladas (meio), ou com outro grupo quando indicado.

V. Discussão

A cromoblastomicose é uma infecção fúngica crônica da pele e tecidos subcutâneos, ocorrendo principalmente em zonas tropicais e subtropicais do mundo. Embora tenha sido identificada pela primeira vez no início do século XX, pouco se sabe acerca da interação de seus agentes etiológicos com o sistema imunológico do hospedeiro. Recentemente, foi proposto por Sousa e colaboradores (2011), por meio de modelos de infecção *in vitro* e *in vivo* com conídios de *F. pedrosoi*, que a cronicidade da CBM decorre de falhas tanto no reconhecimento do fungo, levando à baixa produção de citocinas pró-inflamatórias entre elas o TNF- α , quanto no desenvolvimento de resposta imune eficiente para a contenção da infecção. Entretanto, tal proposição não reflete a doença observada em humanos, os quais apresentam quadro inflamatório crônico e lesões granulomatosas com a presença de macrófagos em diferentes estados de ativação, acompanhados de intensa resposta neutrofílica e da produção da citocina pró-inflamatória TNF- α (ESTERRE *et. al.*, 1993; CORRÊA *et. al.*, 2003).

Essa discordância entre o perfil imunológico apresentado pelos modelos animais e pacientes com a cromoblastomicose pode ser explicada pelas diferentes propriedades imunomoduladoras apresentadas pelas formas do fungo *F. pedrosoi*. Resultados prévios (não publicados) do nosso grupo demonstraram que os conídios não elicitam uma resposta inflamatória no hospedeiro, enquanto as células muriformes, forma patogênica comumente encontrada nas lesões, foram capazes de induzir a regulação positiva de uma série de genes relacionados com a resposta inflamatória, bem como a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Nesse contexto, e considerando a secreção da IL-1 β como um forte indicador da ativação do inflamassoma, a proposta deste trabalho foi avaliar, após a interação com conídios e hifas, a capacidade do *F. pedrosoi* em ativar o inflamassoma, bem como o seu papel no curso da cromoblastomicose murina. Em comparação aos conídios, fragmentos de hifas induziram maior secreção de IL-1 β , tanto em BMDMs quanto em BMDCs, por meio do fornecimento dos dois sinais necessários à ativação do inflamassoma.

Os conídios de *F. pedrosoi*, por sua vez, não foram capazes de induzir diretamente a secreção de IL-1 β . Tal achado, entretanto, vai de encontro a um estudo realizado por

Hayakawa e colaboradores (2006) que, estudando um modelo de infecção *in vitro* de macrófagos residentes murinos com conídios de *F. pedrosoi*, observaram a secreção de IL-1 β após 72 horas de interação. Entretanto, como demonstrado por Rozental e colaboradores (1994), a totalidade dos conídios desse fungo, ainda nas primeiras 24 horas de interação com macrófagos residentes, germinam e transformam-se em hifas. Nesse sentido, a produção de IL-1 β observada por Hayakawa não resulta necessariamente da interação com conídios, sendo mais provável tratar-se de resposta à interação com hifas recém formadas. No presente estudo, mesmo os conídios que passaram por intumescimento celular, processo associado à uma maior exposição de componentes imunoestimuladores, foram incapaz de ativar o inflamassoma, corroborando resultados semelhantes obtidos com conídios de *A. fumigatus* (LUTHER *et. al.*, 2007; SAÏD-SADIER, 2010).

Já foi observado que a morfogênese de hifas de *Candida* e *Aspergillus* no interior de fagócitos contribui para a secreção de IL- β por meio da ativação do inflamassoma NLRP3 (JOLY *et. al.*, 2009; SAÏD-SADIER, 2010). No entanto, a germinação de hifas não foi observada no presente modelo de infecção, provavelmente em razão do uso de macrófagos com perfil pró-inflamatório (oposto ao perfil anti-inflamatório de macrófagos residentes) e células dendríticas, os quais inibem a germinação e subsequente filamentação do conídio de *F. pedrosoi* (ROZENTAL *et. al.*, 1994; DA SILVA *et. al.*, 2007). Assim, apesar de demonstrado aqui que a viabilidade do fungo não impacta na ativação do inflamassoma por *F. pedrosoi*, possivelmente ela contribui para a sua ativação em macrófagos do perfil anti-inflamatório infectados com o conídio, durante a mudança da morfologia do fungo.

Ademais, foi observado aqui que, sob determinadas condições – na presença de ATP ou LPS - conídios podem ativar o inflamassoma independentemente de eventual germinação. Assim, no contexto da CBM humana, tanto hifas, como também conídios, poderiam induzir a ativação do inflamassoma nos hospedeiros, quando acompanhados de infecções bacterianas secundárias, as quais são extremamente comuns na CBM (BONIFAZ *et. al.*, 2001). Além disso, a co-infecção com hifas, formas fúngicas demonstradas aqui como indutoras da secreção de TNF- α e IL-1 β , poderia fornecer um primeiro sinal necessário para a ativação do inflamassoma por conídios.

Os resultados aqui apresentados sugerem um papel diferenciado das células dendríticas, em comparação à macrófagos, na ativação do inflamassoma na CBM murina, visto que foram as únicas células capazes de ativar o inflamassoma na infecção com conídios, o que pode sugerir um papel desse tipo de fagócito no seu reconhecimento e promoção de respostas imunes importantes no combate aos mesmos. Isso é reforçado por um estudo realizado por Sousa e colaboradores (2009), em que mostraram que os conídios induziram o aumento da expressão de HLA-DR e de moléculas co-estimulatórias das células dendríticas obtidas de pacientes com a forma severa da doença, revertendo a anergia antígeno-específica e promovendo a modulação de uma resposta Th1, associada à proteção do hospedeiro na CBM.

Tendo em vista que hifas de *F. pedrosoi*, diferentemente de conídios, participam ativamente da resposta inflamatória dependente do inflamassoma, os experimentos visando a sua caracterização foram executados somente com as hifas do fungo. Primeiramente, foi observado que a sinalização via NF- κ B é importante para o desencadeamento da ativação do inflamassoma por *F. pedrosoi*, corroborando com outros modelos de infecções fúngicas (TAVARES *et. al.*, 2015). Ademais, a secreção da IL-1 β se mostrou independente da atividade da proteína adaptadora MyD88, responsável pela transdução de sinal de receptores TLRs ativados, que culmina na ativação de NF- κ B. Isso implica que outros PRRs, que não TLRs, possam estar envolvidos no processo de reconhecimento do fungo, fornecendo o primeiro sinal necessário para a ativação do inflamassoma. Nesse sentido, CLRs como dectina-1 ou dectina-2 são fortes candidatos, visto que estudos anteriores já demonstraram a importância de ambos no reconhecimento de *F. pedrosoi*, bem como na mediação da produção de citocinas pró-inflamatórias (DE SOUZA *et. al.*, 2011; WÜTHRICH *et. al.*, 2015). Dados semelhantes foram observados na infecção com o *A. fumigatus*, onde estes mesmos receptores foram associados com a ativação do inflamassoma e a produção de IL-1 β (GRINGHUIS *et. al.*, 2012; SUN *et. al.*, 2013).

A ativação de NF- κ B via PRRs, embora promova a produção da pró-IL-1 β , é insuficiente para promover a maturação e secreção da IL-1 β , e devido ao grande potencial inflamatório dessa citocina, esse processamento e liberação da IL-1 β é rigorosamente regulado pelo inflamassoma (SCHRODER & TSCHOPP, 2010). Com isso em mente, foi investigado em seguida se as caspases-1 e -8, enzimas com papel central na atividade do inflamassoma, seriam as responsáveis pelo processamento e secreção da IL-1 β por *F.*

pedrosoi. Foi observado que fagócitos que não apresentam atividade da caspase-1, seja pelo uso de inibidores ou por deficiência de genes que promovem sua produção, falham na indução da IL-1 β . Esse resultado não causa surpresa, uma vez que a caspase-1 é responsável pela atividade do inflamassoma canônico.

Outrossim, a caspase-8 tem emergido como uma via alternativa de ativação do inflamassoma pelos fungos patogênicos *C. albicans*, *A. fumigatus* e *C. neoformans*. (GRINGHUIS *et. al.*, 2012; CHEN *et. al.*, 2015) Como demonstrado aqui, *F. pedrosoi* também ativa o inflamassoma de caspase-8, embora tenha apresentado resultados mais discretos na secreção de IL-1 β induzida por esse fungo. Curiosamente, notou-se que o bloqueio da caspase-1 praticamente extinguiu a secreção de IL-1 β , o que, a princípio, não deveria ocorrer, considerando o caráter aditivo apresentado pela caspase-8 na secreção de IL-1 β . Contudo, esse resultado pode ser justificado por um recente estudo no qual PHILIP e colaboradores (2014) observaram que a caspase-8 foi necessária para o processamento de IL-1 β por meio da caspase-1. Dessa forma, é sugerido que a caspase-8 estaria atuando, ao menos no presente modelo, em cooperação com a caspase-1 para a promoção da secreção de IL-1 β , e não de forma independente. Sabe-se que essa cooperação pode se dar tanto numa atividade sinérgica na clivagem de IL-1 β , ou previamente na indução de pró-IL-1 β (GRINGHUIS *et. al.*, 2012; KARKI *et. al.*, 2015).

Para a montagem e ativação do inflamassoma, normalmente se requer o engajamento de receptores do tipo NOD (SCHRODER & TSCHOPP, 2010). Evidências de que o NLRP3 é o receptor de maior participação na montagem e ativação de inflamassomas em modelos de infecções fúngicas motivaram a verificação também de sua participação no presente modelo de infecção com *F. pedrosoi* (TAVARES *et. al.*, 2015). Como esperado, foi observada a produção insignificante de IL-1 β em células deficientes de NLRP3, sugerindo que esse receptor seja o principal PRR associado ao processamento de IL-1 β na infecção com *F. pedrosoi*. Não obstante, há a possibilidade da participação acessória de outros receptores, como o AIM2, com o qual NLRP3 é capaz de montar uma plataforma única, onde há cooperação e sinergismo entre ambos os receptores para o processamento de IL-1 β e IL-18 (KARKI *et. al.*, 2015).

É consenso até o momento que, embora não se tenham provas de estímulos que interajam diretamente com o NLRP3 para sua ativação, esta ocorre por meio de 3 mecanismos centrais: efluxo de íons potássio intracelulares por meio de canais iônicos; e

a liberação de ROS e de catepsina B no citosol (SCHRODER & TSCHOPP, 2010). Para verificar como o *F. pedrosoi* estimulou o inflamassoma NLRP3, cada um desses mecanismos foi bloqueado por meio do uso de inibidores. O bloqueio do efluxo de potássio foi realizado também através da adição de KCl, tendo sido observado por essas duas metodologias uma intensa diminuição dos níveis de IL-1 β . Diversamente, a produção de ROS não demonstrou um papel essencial à ativação do inflamassoma, visto que BMDCs, diferentemente de BMDMs, continuaram a induzir robusta secreção de IL-1 β na presença de rotenona, inibidor da produção de ROS via mitocondrial. Curiosamente, BMDCs tratadas com esse inibidor não só secretaram altos níveis de IL-1 β , como o fizeram mais intensamente que BMDMs sem tratamento, o que corrobora resultados de Gao e colaboradores (2013) que mostram que a rotenona pode induzir diretamente a ativação de caspase-1 e a secreção de IL-1 β . Ademais, há outras vias de produção de ROS associadas à ativação do inflamassoma NLRP3, como a via endossomal, por meio da atividade da enzima NADPH oxidase. De fato, há evidências que fungos como *P. brasiliensis*, *C. neoformans* e *T. schoenleinii* ativem o NLRP3 por uso desta via (LI *et. al.*, 2013; TAVARES *et. al.*, 2013; GUO *et. al.*, 2014). Como os mecanismos de ativação do NLRP3 por fungos são altamente conservados, é possível que o ROS resultante da atividade da NADPH oxidase participe também da ativação do inflamassoma por *F. pedrosoi*, dado que a atividade da enzima já foi detectada durante a interação de macrófagos com o *F. pedrosoi* (ROZENTAL *et. al.*, 1994). Mais estudos precisam ser realizados para que o mecanismo seja totalmente elucidado.

Insta salientar que a inibição tanto do efluxo de potássio quanto da produção de ROS afetou apenas os níveis de IL-1 β , mas não de TNF- α , corroborando a especificidade desses mecanismos para o fornecimento do segundo sinal de ativação do inflamassoma por *F. pedrosoi*. Porém, a secreção de TNF- α , inesperadamente, foi afetada por meio do uso do inibidor CA-074Me, amplamente utilizado em estudos para se verificar o papel da liberação de catepsinas na ativação do inflamassoma. Contudo, sabe-se que o uso do inibidor e a subsequente inibição da catepsina B não interfere na ativação do NF κ B, de forma que esse resultado não exclui o papel da catepsina B na ativação do inflamassoma no presente modelo. No mais, já foi observado que a inibição da atividade dessa catepsina pode interferir na secreção de TNF- α por meio da retenção de vesículas que a transporta para a membrana celular (HA *et. al.*, 2008). Desse modo, se a interferência do inibidor se deu por um mecanismo pós-traducional, mas não na transcrição do TNF- α por meio da

regulação do NF κ B, ela não estaria afetando a produção de pró-IL-1 β . Aliás, é mais indicada para ensaios futuros a avaliação da secreção de outra citocina que independa da atividade da catepsina B.

Alguns estudos já descreveram a participação de componentes fúngicos na modulação do inflamassoma (TAVARES *et. al.*, 2015). No entanto, embora a melanina seja vastamente distribuída nas espécies de fungos patogênicos, nenhum estudo abordou até o momento seu impacto na ativação do inflamassoma induzido por fungos (EISENMAN & CASADEVALL, 2012). A melanina é considerada um importante fator de virulência em fungos patogênicos, possuindo, dentre outros papéis, o de reduzir o reconhecimento do fungo por células do sistema imune inato, supostamente por meio do bloqueio de componentes imunogênicos como monohexosylceramidas (NIMRICHTER *et. al.*, 2005; EISENMAN & CASADEVALL, 2012). Esse bloqueio, por sua vez, repercute na capacidade da indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que conídios albinos de *A. fumigatus* apresentam maior capacidade de indução de IL-6 e TNF- α mediadas por dectina-1, TLR4 e receptor de manose, em comparação à células melanizadas (CHAI *et. al.*, 2010).

Nesse contexto, foi investigado o papel desse importante mecanismo de virulência na modulação do inflamassoma. Para isso, foram utilizados fungos parcialmente depletados de melanina por meio da inibição da síntese do pigmento, ou através da remoção do mesmo com uma solução de NaOH. De maneira inusitada, ocorreu a diminuição da secreção de IL-1 β na interação com as células submetidas a ambos os tratamentos. O resultado obtido através do uso do fungo tratado com o inibidor de melanina assegurou que a redução de IL-1 β observada na interação celular com as hifas tratadas com hidróxido de sódio não se deveu a um possível efeito deste químico sobre a integridade de algum outro componente da parede fúngica que contribua para a ativação do inflamassoma. Posteriores ensaios com o extrato da melanina de parede confirmaram esses resultados, demonstrando, além disso, que o polímero é um indutor de ambos os sinais de ativação do inflamassoma. Assim, foi demonstrado no presente estudo um novo componente fúngico capaz de ativar o inflamassoma, que pode ter grande importância nas infecções fúngicas, visto que a maioria dos fungos patogênicos são capazes de sintetizar o pigmento.

Embora tais achados contrariem resultados da literatura que associam a melanina a um prejuízo da sinalização inflamatória, como aqueles citados para conídios de *A. fumigatus*, são sustentados por outros estudos que atribuem propriedades pró-inflamatórias ao polímero. A própria melanina humana já foi associada à inflamação gengival e à patogênese da doença inflamatória intra-ocular denominada uveíte (PATSAKAS *et. al.*, 1981; SMITH *et. al.*, 1998). De forma semelhante, a presença de melanina no fungo *C. neoformans* contribui na secreção da quimiocina MCP-1 e na infiltração leucocitária pulmonar na criptococose murina (MEDNICK *et. al.*, 2005). A melanina DHN do *F. pedrosoi*, embora seja de origem metabólica diferente dessas outras (sintetizadas via L-DOPA), parece possuir propriedades moduladoras semelhantes. Alviano e colaboradores (2004) mostraram, por meio do uso de neutrófilos, um papel positivo da melanina de *F. pedrosoi* na indução da fagocitose do fungo, bem como na produção de espécies reativas de oxigênio.

Não obstante, é possível que algum outro componente de parede associado a melanina poderia contribuir para a ativação do inflamassoma, visto que o polímero entremeia a parede do fungo, formando ligações covalentes cruzadas com componentes polissacarídicos, especialmente aqueles com alto conteúdo de manose, carboidrato passível de extração junto a melanina (ZHONG *et. al.*, 2008). De fato, já foi observado o envolvimento do receptor de manose na indução de citocinas como IL-6 e IL-1 β em infecções com *C. albicans* (YAMAMOTO *et. al.*, 1997).

Considerando que a sinalização da IL-1 β e o receptor NLRP3 apresentaram um papel *in vitro* na restrição intracelular de *P. brasiliensis* em BMDMs, foi avaliado por meio do uso de células nocautes se o NLRP3, bem como as caspases-1 e -11 apresentariam um papel na morte de hifas e conídios do *F. pedrosoi*. Contudo, isso não foi observado, mesmo com o fornecimento de ATP no intuito de amplificar a ativação do inflamassoma e seus mecanismos efetores. De fato, tal resposta já era esperada para a infecção com conídios, visto que mesmo na presença de LPS ou ATP, BMDMs falharam em ativar o inflamassoma quando desafiados com conídios. Com base nisso, ensaios posteriores com a adição combinada desses dois estímulos – o que resulta na indução robusta de IL-1 β – seriam relevantes para confirmar se a ativação do inflamassoma em macrófagos murinos não tem papel na morte dos conídios.

De acordo com os resultados obtidos por Tavares e colaboradores (2013), a ativação do inflamassoma em BMDMs não induz a produção de óxido nítrico, que é um importante mecanismo fungicida. O presente trabalho corrobora esses resultados. Porém,

a parca atividade fungicida ao *F. pedrosoi* verificada não se deve à baixa produção dessa molécula pelas BMDMs. Isto porque, mesmo promovendo-se a produção de óxido nítrico por meio do tratamento das células com IFN- γ , não houve impacto na eliminação do fungo, o que corrobora com estudos prévios que descrevem que macrófagos ativado desenvolvem apenas uma atividade fungistática ao *F. pedrosoi*, ficando principalmente à cargo dos neutrófilos a eliminação direta do fungo (ROZENTAL *et. al.*, 1996).

Em seguida, para investigar a influência dos componentes do inflamassoma em um modelo experimental murino *in vivo* da CBM, animais selvagens ou deficientes para caspase-1/11 ou NLRP3 foram infectados com conídios ou propágulos fúngicos do *F. pedrosoi*. Foi verificado na infecção com conídios que, embora o diâmetro das lesões foi maior em camundongos nocautes em alguns tempos analisados, não foram encontradas alterações na carga fúngica entre os grupos experimentais. Interessantemente, animais nocautes para caspase-1/11 e NLRP3 foram os únicos que apresentaram a persistência do fungo nas lesões até o último dia de análise, embora não mostraram diferença estatística nos níveis de CFU em relação aos animais selvagens. Embora não foi investigado como esses componentes do inflamassoma contribuíram para a eliminação do *F. pedrosoi*, existem relatos na literatura de importantes mecanismos antifúngicos promovidos por componentes do inflamassoma e que poderiam ser compartilhados por este modelo da cromoblastomicose. Assim, já foi visto que o nocaute de NLRP3 em um modelo de criptococose murina promove um aumento da carga fúngica pulmonar associado à diminuição do recrutamento de leucócitos no sítio de infecção (GUO *et. al.*, 2014). Em outro modelo, foi observado um papel essencial da ASC e da caspase-1 na resposta adaptativa antifúngica e na sobrevivência do hospedeiro à disseminação da candidíase por meio da montagem de respostas Th1 e Th17 (VAN DE VEERDONK *et. al.*, 2011). Em adição, a deficiência na montagem do inflamassoma de NLRP3/Aim2 na infecção por *A. fumigatus* leva à diminuição não só de IL-1 β e IL-18, como também no IFN- γ , acompanhada da disseminação da infecção no hospedeiro (KARKI *et. al.*, 2015).

Nesse contexto, e considerando que as caspase-1 e -11 e o NLRP3 não se mostraram importantes no controle da infecção com conídios, decorrente da fraca capacidade do conídio em ativar o inflamassoma, como verificado *in vitro*, é corroborado aqui o papel do conídio na persistência do *F. pedrosoi* no hospedeiro através da ativação inadequada da resposta imune e seus mecanismos efetores.

Por fim, foi avaliado se a ativação do inflamassoma por *F. pedrosoi* se estenderia a um modelo com células humanas, quando então observamos, igualmente nos ensaios com células primárias murinas, a habilidade de hifas do fungo e sua melanina induzirem a secreção de IL-1 β . Ademais, por meio do fornecimento exógeno de um agonista de TLR4, até mesmo a infecção com conídios foi capaz de ativar o inflamassoma, corroborando o resultado obtido na interação desses com BMDCs. A estimulação de agonistas de membros da família TLR tem se mostrado como um importante mecanismo de indução de respostas inflamatórias na infecção com *F. pedrosoi*, promovendo a secreção da TNF- α (SOUSA *et. al.*, 2011). Inclusive, a aplicação tópica de imiquimod, um agonista de TLR7, foi recentemente explorada como tratamento de lesões de pacientes com cromoblastomicose, em que promoveu a infiltração de leucócitos nos sítios das lesões e melhora clínica da doença (SOUSA *et. al.*, 2014). O papel imunomodulador do imiquimod parece não se restringir à indução de TNF- α (mediante co-estímulo da célula com o fungo) via ativação do TLR7, uma vez que há indícios de que o imiquimod também ativa o inflamassoma canônico de NLRP3 e induz a secreção de IL-1 β e IL-18 (SOUSA *et. al.*, 2011; HU *et. al.*, 2013).

Nesse contexto, e considerando o papel protetor da ativação do inflamassoma no modelo experimental murino da CBM verificado no presente trabalho, é sugerido aqui que a ativação conjunta do inflamassoma por um agonista de TLR, juntamente aos sinais de ativação fornecidos pelo fungo, seja benéfica para a defesa contra a CBM. Desta forma, o presente trabalho serve como base para estudos futuros acerca do potencial terapêutico da modulação do inflamassoma na cromoblastomicose. Além disso, será necessária também a avaliação do papel do inflamassoma na infecção de curso crônico com as células muriformes do *F. pedrosoi*, haja vista que o inflamassoma pode apresentar um papel deletério para o hospedeiro em modelos de doenças crônicas, inclusive em modelos de doenças fúngicas (SAAVEDRA *et. al.*, 2015; BORGHI *et. al.*, 2015).

VI. Conclusões

Dentre as formas saprofíticas de *F. pedrosoi*, as hifas são as melhores indutoras da secreção de IL-1 β , por meio da sinalização via NF- κ B independente de Myd88; da atividade das caspases-1 e caspase-8; e da ativação do inflamassoma NLRP3. Essa ativação, por sua vez, decorreu da indução da liberação de catepsina B, produção de espécies reativas de oxigênio e efluxo de potássio. Ademais, a melanina presente na parede do fungo contribui para a secreção dessa citocina. Além disso, nossos dados sugerem que, apesar de não apresentarem papel funcional direto na defesa na infecção *in vitro*, as proteínas caspase-1 e -11, bem como o NLRP3, auxiliam na contenção da infecção por propágulos fúngicos de *F. pedrosoi*. Porém, elas são dispensáveis na resposta à infecção com conídios, confirmando o papel do conídio na persistência do *F. pedrosoi* no hospedeiro através da ativação inadequada da resposta imune e seus mecanismos efetores.

VII. Referências Bibliográficas

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; DE SOUZA, W.; ANGLUSTER, J.; TRAVASSOS, L. R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Journal of general microbiology**, v. 137, n. 4, p. 837–44, abr. 1991.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J.; DE SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, v. 119, n. 1, p. 17–23, jul. 1992.

ALVIANO, D. S.; FRANZEN, A. J.; TRAVASSOS, L. R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, M. L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infect Immun.**, v. 72, n. 1, p. 229–37, 2004.

AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 459–89, jan. 2012.

ANAND, P. K.; MALIREDDI, R. K. S.; KANNEGANTI, T. D. Role of the nlrp3 inflammasome in microbial infection. **Frontiers in microbiology**, v. 2, jan. 2011.

ANTONOPOULOS, C.; RUSSO, H. M.; EL SANADI, C.; MARTIN, B. N.; LI, X.; KAISER, W. J.; MOCARSKI, E. S.; DUBYAK, G. R. Caspase-8 as an effector and regulator of NLRP3 inflammasome signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 33, p. 20167–84, ago. 2015.

ATTAPATTU, M. C. Chromoblastomycosis: a clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 145-51, 1997.

BAUERNFEIND, F. & HORNUNG, V. Of inflammasomes and pathogens-sensing of microbes by the inflammasome. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 6, p. 814–26, 2013.

BAUERNFEIND, F. G.; HORVATH, G.; STUTZ, A.; ALNEMRI, E. S.; MACDONALD, K.; SPEERT, D.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; WU, J.; MONKS, B. G.; FITZGERALD, K. a; HORNUNG, V.; LATZ, E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **Journal of immunology**, v. 183, n. 2, p. 787–91, 15 jul. 2009.

BAYLES, M. A. Chromomycosis. In: HAY, R. J. Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. **Tropical Fungal Infections**. Londres: WB Saunders, p. 45-70, 1986.

BOCCA, A. L.; BRITO, P. P. M. S.; FIGUEIREDO, F.; TOSTA, C. E. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 195–203, abr. 2006.

BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; SAUL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. **Mycoses**, v. 7, p. 1-7, 2001.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. **Journal of the German Society of Dermatology : JDDG**, v. 8, n. 8, p. 619–27; quiz 628, ago. 2010.

BORELLI, D. *Acrotheca aquaspersa* nova, new species agent of chromomycosis. *Acta. Cient. Venez.*, v. 23, n. 6, p. 193-96, 1972.

BORGHI, M.; DE LUCA, A.; PUCETTI, M. JAEGER, M.; MENCACCI, A.; ... ROMANI, L. Pathogenic NLRP3 inflammasome activity during *Candida* infection is negatively regulated by IL-22 via activation of NLRC4 and IL-1Ra. **Cell Host Microbe**. V.18 p. 198–209, Ago, 2015.

BOURGEOIS, C.; KUCHLER, K. Fungal pathogens-a sweet and sour treat for toll-like receptors. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n., p. 142, jan. 2012.

CARRIÓN, A. L. Chromoblastomycosis. **Ann. N. Y. Acad. Sc.** v. 50, N. 10, P. 1255-82, 1950.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. **Journal of water and health**, v. 7 Suppl 1, p. S2–S18, jan. 2009.

CHAI, L. Y. A.; NETEA, M. G.; SUGUI, J.; VONK, A. G.; VAN DE SANDE, W. W. J.; WARRIS, A.; KWON-CHUNG, K. J.; KULLBERG, B. J. *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. **Immunobiology**, v. 215, n. 11, p. 915–20, nov. 2010.

CHAKRABARTI, A. Microbiology of systemic fungal infections. **J. Postgrad. Med.** 51 Suppl 1: S16-20, 2005.

CHAVAN, S. S.; KULKARNI, M. H.; MAKANNAVAR, J. H. “‘Unstained’ and ‘de Stained’ sections in the diagnosis of chromoblastomycosis: A clinico-pathological study.” **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 53, n. 4, p. 666–71, 2010.

CHEN, K. W.; SCHRODER, K. Antimicrobial functions of inflammasomes. **Current Opinion in Microbiology**, p. 1–8, 2013.

CHEN, M.; XING, Y.; LU, A.; FANG, W.; SUN, B.; CHEN, C.; LIAO, W.; MENG, G. Internalized *Cryptococcus neoformans* activates the canonical caspase-1 and the noncanonical caspase-8 inflammasomes. **Journal of immunology**. v. 195, n. 10, p. 4962–72, nov. 2015.

CHIANI, P.; BROMURO, C.; TOROSANTUCCI, A. Defective induction of interleukin-12 in human monocytes by germ-tube forms of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 10, p. 5628–34, 2000.

CIRACI, C.; JANCZY, J. R.; SUTTERWALA, F. S.; CASSEL, S. L. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. **Microbes and infection/Institut Pasteur**, v. 14, n. 14, p. 1263–70, nov. 2012.

COLLETTE, J. R.; LORENZ, M. C. Mechanisms of immune evasion in fungal pathogens. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 6, p. 668–75, dez. 2011.

COLLOPY-JUNIOR, I.; KNEIPP, L. F.; DA SILVA, F. C.; RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; MEYER-FERNANDES, J. R. Characterization of an ecto-ATPase activity in *Fonsecaea pedrosoi*. **Arch. Microbiol.**, v. 185, n. 5, p. 355–62, 2006.

CORRÊA, S.; PIRES, G.; PAGLIARI, C.; IRMA, M.; DUARTE, S. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms. **Mycopathologia**, v. 156, p. 51–60, 2003.

CUNHA, M. M. L. Melanina como fator de virulência em *Fonsecaea pedrosoi*: Atividade antioxidante, sequestro de óxido nítrico, resistência a antifúngicos e a estresses ambientais. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)) – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

CUNHA, M. M. L.; FRANZEN, A. J.; ALVIANO, D. S.; ZANARDI, E.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. **Microscopy research and technique**, v. 68, n. 6, p. 377–84, 15 dez. 2005.

CUNHA, M. M. L.; FRANZEN, A. J.; SEABRA, S. H.; HERBST, M. H.; VUGMAN, N. V.; BORBA, L. P.; SOUZA, W. De; ROZENTAL, S. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. **BMC Microbiol.**, v. 10, n. 80, 2010.

D'OSTIANI, C. F.; DEL SERO, G.; BACCI, a; MONTAGNOLI, C.; SPRECA, a; MENCACCI, a; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; ROMANI, L. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 10, p. 1661–74, maio 2000.

DA SILVA, J. P.; DA SILVA, M. B.; SALGADO, U. I.; DINIZ, J. A. P.; ROZENTAL, S.; SALGADO, C. G. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 50, n. 1, p. 104–11, jun. 2007.

DE AZEVEDO, C. M. P. S.; GOMES, R. R.; VICENTE, V. a; SANTOS, D. W. C. L.; MARQUES, S. G.; DO NASCIMENTO, M. M. F.; ANDRADE, C. E. W.; SILVA, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea pugnacius*, a Novel Agent of Disseminated Chromoblastomycosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2674–85, ago. 2015.

DE HOOG, G. S.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V. A.; VAN DEN ENDE, A. H.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea pedrosoi* species. **Med. Mycol.** V.42, n. 5, p. 405-16, 2004.

DJORDJEVIC, J. T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development – lessons from *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology**. v. 1, n. 125, p. 1–13, 2010.

DONG, B.; LI, D.; LI, R.; CHEN, S. C.; LIU, W.; LIU, W.; CHEN, L.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; TONG, Z.; XIA, Y.; XIA, P.; WANG, Y.; DUAN, Y. A Chitin-Like Component on sclerotic cells of *Fonsecaea pedrosoi* inhibits dectin-1-mediated murine Th17 development by masking β -glucans. **PLoS one**, v. 9, n. 12, p. e114113, jan. 2014.

DOSTERT, C.; PÉTRILLI, V.; BRUGGEN, R. Van; STEELE, C.; MOSSMAN, B. T.; TSCHOPP, J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, v. 320, p. 674–77, Maio, 2008.

DUPAUL-CHICOINE, J.; SALEH, M. A new path to IL-1 β production controlled by caspase-8. **Nature immunology**, v. 13, n. 3, p. 211–2, mar. 2012.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931–40, fev. 2012.

EISENMAN, H. C.; NOSANCHUK, J. D.; WEBBER, J. B. W.; EMERSON, R. J.; CAMESANO, T. A.; CASADEVALL, A. Microstructure of Cell Wall-Associated Melanin in the Human Pathogenic Fungus. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3683–93, 2005.

ELINAV, E.; FLAVELL, R. A. Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 1, p. 4-13, 2012.
ESTERRE, P. & RICHARD-BLUM, S. Chromoblastomycosis: new concepts in physiopathology. **J Mycol Med**, v. 12, p. 21-4, 2002.

ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RAMARCEL, E. R.; PECARRERE, J., L. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 55, n. 1, p. 45-7, 1996.

ESTERRE, P.; JAHEVITRA, M.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 3, p. 497–500, maio 2000.

ESTERRE, P.; PEYROL, S.; PRADINAUD, R.; GRIMAUD, J. A.; PARASITOLOGIE, L. De; GUYANE, I. P. De; DERMATOLOGIE, D. De; MARTIAL, H. J. Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesion of chromomycosis. **Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.**, v. 422, n. 4, p. 285-91, 1993.

ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 2, p. 148–52, abr. 2006.

ESTERRE, P.; RICHARD-BLUM, S. Chromoblastomycosis: new concepts in physiopathology and treatment. **J Mycol Med.**, v. 12, n. 1, p. 21-4, 2002.

FRANZEN, A. J.; CUNHA, M. M. L.; BATISTA, E. J. O.; SEABRA, S. H.; SOUZA, W. D. E.; ROZENTAL, S. Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4] benzothiazole), a specific DHN–melanin Inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. **Microsc. Res. Tech.** v. 69, n. 9, p. 729–37, 2006.

FRANZEN, A. J.; CUNHA, M. M. L.; MIRANDA, K.; HENTSCHEL, J.; PLATTNER, H.; DA SILVA, M. B.; SALGADO, C. G.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of structural biology**, v. 162, n. 1, p. 75–84, abr. 2008.

FREEMAN, S. A.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunological reviews**, v. 262, n. 1, p. 193–215, nov. 2014.

FREITAS-MESQUITA, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R. Biochemical properties and possible roles of ectophosphatase activities in fungi. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 2, p. 2289–304, jan. 2014.

GABRIELLI, E.; PERICOLINI, E.; LUCIANO, E.; SABBATINI, S.; ROSELLETTI, E.; PERITO, S.; KASPER, L.; HUBE, B.; VECCHIARELLI, A. Induction of caspase-11 by aspartyl proteinases of *Candida albicans* and implication in promoting inflammatory response. **Infection and immunity**, v. 83, n. 5, p. 1940–8, maio 2015.

GAO, F.; CHEN, D.; HU, Q.; WANG, G. Rotenone directly induces BV2 cell activation via the p38 MAPK pathway. **PLoS one**, v. 8, n. 8, p. e72046, jan. 2013.

GAUTHIER, G. M. Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004608, fev. 2015.

GAUTHIER, G.; KLEIN, B. S. Insights into Fungal Morphogenesis and Immune Evasion: Fungal conidia, when situated in mammalian lungs, may switch from mold to pathogenic yeasts or spore-forming spherules. **Microbe Wash.** v. 3, n. 9, p. 416–23, 2008.

GERSUK, G. M.; UNDERHILL, D. M.; ZHU, L.; MARR, K. a. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3717–24, 3 mar. 2006.

GIMENES, V. M.; CRIADO, P. R.; MARTINS, J. E.; ALMEIDA, S. R. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. **Mycopathologia**, v. 152, n. 2, p. 97-101, 2006.

GIMENES, V.; DA GLÓRIA DE SOUZA, M.; FERREIRA, K. S.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; VAGNER DE CASTRO LIMA SANTOS, D.; PEDROSO E SILVA, C. D. M.; ALMEIDA, S. R. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 7, n. 4, p. 708–13, abr. 2005.

GÓMEZ, B. L. NOSANCHUK, J. D.; DIEZ, S.; YOUNGSHIM, S.; AISEN, P.; CANO, L. E.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Detection of melanin-

like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infect Immun** v. 69, n. 9, p. 5760–7, 2001.

GOW, N. A. R. Yeast-Hyphal Dimorphism. In: GOW, N. A. R. & GADD, G. M. **The Growing Fungus**. 1 ed. Londres: Chapman & Hall. p. 403-22, 1994.

GRINGHUIS, S. I.; KAPTEIN, T. M.; WEVERS, B. A.; THEELEN, B.; VAN DER VLIST, M.; BOEKHOUT, T.; GEIJTENBEEK, T. B. H. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome. **Nature immunology**, v. 13, n. 3, p. 246–54, mar. 2012.

GUO, C.; CHEN, M.; FA, Z.; LU, A.; FANG, W.; SUN, B.; CHEN, C.; LIAO, W.; MENG, G. Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. **Microbes and infection/Institut Pasteur**, v. 16, n. 10, p. 845–54, out. 2014.

HA, S. D.; MARTINS, A.; KHAZAIE, K.; HAN, J.; CHAN, B. M. C.; KIM, S. O. Cathepsin B is involved in the trafficking of TNF-containing vesicles to the plasma membrane in macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 1, p. 690–7, 2008.

HAYAKAWA, M.; GHOSN, E. E. B.; DA GLORIA TEIXERIA DE SOUSA, M.; FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous [correction of dematiaceus] fungi that cause chromoblastomycosis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 64, n. 4, p. 382–7, out. 2006.

HISE, A. G.; TOMALKA, J.; GANESAN, S.; PATEL, K.; HALL, B. a; BROWN, G. D.; FITZGERALD, K. a. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 5, p. 487–97, 8 maio 2009.

HOHL, T. M.; VAN EPPS, H. L.; RIVERA, A.; MORGAN, L. a; CHEN, P. L.; FELDMESSER, M.; PAMER, E. G. *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. **PLoS pathogens**, v. 1, n. 3, p. e30, nov. 2005.

HU, J.; YANG, R.; WEN, C.; LI, H.; ZHAO, H.; Expression of NLRP3 inflammasome in BALB/c mice with imiquimod-induced psoriasis-like inflammation and therapeutic effect of mustard seed (*Sinapis Alba* Linn). **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**. v. 33, n. 9, p. 1394-8, 2013.

HUNT, G. & FOGEL, R. Fungal hyphal dynamics in a western Oregon Douglas-fir stand. **Soil Biol. Biochem.**, v. 15, n. 6, p. 641–9, 1983.

JOLY, S.; MA, N.; SADLER, J. J.; SOLL, D. R.; CASSEL, S. L.; SUTTERWALA, F. S. Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the NLRP3 inflammasome. **Journal of immunology**, v. 183, n. 6, p. 3578–81, 15 set. 2009.

KARKI, R.; MAN, S. M.; MALIREDDI, R. K. S.; GURUNG, P.; VOGEL, P.; LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. D. Concerted activation of the AIM2 and NLRP3

inflammasomes orchestrates host protection against *Aspergillus* infection. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 3, p. 357–68, 11 mar. 2015.

KAYAGAKI, N.; WARMING, S.; LAMKANFI, M.; VANDE WALLE, L.; LOUIE, S.; DONG, J.; NEWTON, K.; QU, Y.; LIU, J.; HELDENS, S.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; ROOSE-GIRMA, M.; DIXIT, V. M. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 117–21, 3 nov. 2011.

KELLY, R. M.; CHEN, J.; YAUCH, L. E.; LEVITZ, S. M. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 592–8, jan. 2005.

KENNEDY, A. D.; WILLMENT, J. A.; DORWARD, D. W.; WILLIAMS, D. L.; BROWN, G. D.; DELEO, F. R. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. **European journal of immunology**, v. 37, n. 2, p. 467–78, fev. 2007.

KERRIDGE, D. Fungal Dimorphism: A sideways look. In: BOSSCHE, H. V.; ODDS, F. C.; KERRIDGE, D. **Dimorphic Fungi In Biology and Medicine**. 1 ed, Springer US, p. 3-12, 1993.

KHAN, S.; KUMAR, A.; VINOD, V.; PRABHAKAR, V.; EAPEN, M.; THOMAS, J.; DINESH, K.; KARIM, S. Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*: an old wine in a rare bottle. **Journal of infection in developing countries**, v. 9, n. 3, p. 325–9, mar. 2015.

KNEIPP, L. F.; PALMEIRA, V. F.; PINHEIRO, A. A. S.; ALVIANO, C. S.; ROZENTAL, S.; TRAVASSOS, L. R.; MEYER-FERNANDES, J. R. Phosphatase activity on the cell wall of *Fonsecaea pedrosoi*. **Medical Mycology**, v. 41, n. 6, p. 469–77, jan. 2003.

KNEIPP, L. F.; RODRIGUES, M. L.; HOLANDINO, C.; ESTEVES, F. F.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R.; MEYER-FERNANDES, J. R. Ectophosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3355–62, out. 2004.

KRZYŚCIAK, P. M.; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M.; PIASZCZYŃSKI, M. Chromoblastomycosis. **Postępy dermatologii i alergologii**, v. 31, n. 5, p. 310–21, out. 2014.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013–22, 22 maio 2014.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes **Nature reviews. Immunology**. v. 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013.

LEE, M. W.; HSU, S., & ROSEN, T. Spores and mycelia in cutaneous chromomycosis. **J Am Acad Dermatol**, v. 39, p. 850-2, 1998.

LESLIE, D. F.; BEARDMORE, G. L. Chromoblastomycosis in Queensland: a retrospective study of 13 cases at the Royal Brisbane Hospital. **Australas. J. Dermatol.**, v. 20, n. 1, p. 23-30, 1979.

LI, H.; WU, S.; MAO, L.; LEI, G.; ZHANG, L.; LU, A.; AN, L.; YANG, G.; ABLIZ, P.; MENG, G. Human pathogenic fungus *Trichophyton schoenleinii* activates the NLRP3 inflammasome. **Protein & cell**, v. 4, n. 7, p. 529–38, jul. 2013.

LU, S.; LU, C.; ZHANG, J.; HU, Y.; LI, X.; XI, L. Chromoblastomycosis in Mainland China: a systematic review on clinical characteristics. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5-6, p. 489-95, 2013.

LUPI, O.; TYRING, S. K.; MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 53, v. 6, p. 931–51, 2003.

LUTHER, K.; TOROSANTUCCI, A.; BRAKHAGE, A. a; HEESEMANN, J.; EBEL, F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 2, p. 368–81, fev. 2007.

LUTZ, M. B.; KUKUTSCH, N.; OGILVIE, A. L. J.; ROSSNE, S.; KOCH, F.; ROMANI, N.; SCHULER, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **J. Immunol. Meth.**, v. 223, n. 1, p. 77–92, 1999.

MAO, L.; ZHANG, L.; LI, H.; CHEN, W.; WANG, H.; WU, S.; GUO, C.; LU, A.; YANG, G.; AN, L.; ABLIZ, P.; MENG, G. Pathogenic fungus *Microsporium canis* activates the NLRP3. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 882–92, 2014.

MARTÍNEZ, R. L., & TOVAR, L. J. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 188- 94, 2007.

MARTINON, F., BURNS K, TSCHOPP J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL-beta. **Mol Cell**. v. 10, p. 417–26, 2002.

MARTINON, F., MAYOR, A., TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 229–65, jan. 2009.

MATTE, S. M.; LOPES, J. O.; MELO, I. S.; ESPADIM, L. E.; PINTO, M. S. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 4, p. 309-11, 1997.

McGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 1983.

MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2012–9, abr. 2005.

MINOTTO, R.; BERNARDI, C. D.; MALLMANN, L. F.; EDELWEISS, M. I.; SCROFERNEKER, M. L. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 44, n. 4, p. 585-92, 2001.

MOHRENSCHLAGER M, SEIDL HP, RING J, ABECK, D. Pediatric tinea capitis: recognition and management. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 6, n. 4, p. 203–13, 2005.

MORETTI, S., BOZZA, S., OIKONOMOU, V., RENGA, G., CASAGRANDE, A., IANNITTI, R. G., PUC CETTI, M., GARLANDA, C., KIM, S., LI, S., VAN DE VEERDONK, F. L., DINARELLO, C. a, ROMANI, L. IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 11, p. e1004462, nov. 2014.

MORRIS-JONES, R.; GOMEZ, B. L.; DIEZ, S.; URAN, M.; MORRIS-JONES, S. D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D.; HAMILTON, A. J. Synthesis of melanin pigment by *Candida albicans* in vitro and during infection. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 6147–50, set. 2005.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; KLAASSEN, C. H.; BONIFAZ, A.; GERRITS, VAN DEN ENDE, A. H. G.; MENKEN, S. B. J.; DE HOOG, G. S. Molecular Epidemiology of *Fonsecaea* Species. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, n. 3, p. 464-69, 2011.

NIMRICHTER, L., BARRETO-BERGTER, E., MENDONÇA-FILHO, R. R., KNEIPP, L. F., MAZZI, M. T., SALVE, P., FARIAS, S. E., WAIT, R., ALVIANO, C. S., RODRIGUES, M. L. A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. **Microbes and Infection**. v. 6, p. 657–65, 2004.

NIMRICHTER, L.; CERQUEIRA, M. D.; LEITA, E. A.; MIRANDA, K.; NAKAYASU, E. S.; ALMEIDA, S. R.; ALMEIDA, I. C.; ALVIANO, C. S.; BARRETO-BERGTER, E.; RODRIGUES, M. L. Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. **Infection and Immunity**. 73, n. 12, p. 7860–68, 2005.

NOBREGA, J. P. S.; ROSEMBERG, S.; ADAMI, A. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; LACAZ, C. da SILVA; DE BRITO, T. *Fonsecaea pedrosoi* cerebral phaeohyphomycosis (chromoblastomycosis): first human culture-proven case reported in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 45, n. 4, p. 217-20, 2003.

NÓBREGA, Y. K. D. M.; LOZANO, V. F.; DE ARAÚJO, T. S.; DE CARVALHO, D. D.; BOCCA, A. L. The cell wall fraction from *Fonsecaea pedrosoi* stimulates production of different profiles of cytokines and nitric oxide by murine peritoneal cells in vitro. **Mycopathologia**, v. 170, n. 2, p. 89–98, ago. 2010.

NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: what do we know about structure? **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. p. 1–7, 22 dez. 2015.

O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A; MONCALVO, J.-M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544–50, set. 2005.

PATSAKAS, A.; DEMETRIOU, N.; ANGELOPOULOS, a. Melanin pigmentation and inflammation in human gingiva. **Journal of periodontology**, v. 52, n. 11, p. 701–4, nov. 1981.

PEREIRA, M. S. F.; MORGANTETTI, G. F.; MASSIS, L. M.; HORTA, C. V; HORI, J. I.; ZAMBONI, D. S. Activation of NLRC4 by flagellated bacteria triggers caspase-1-dependent and -independent responses to restrict *Legionella pneumophila* replication in macrophages and *in vivo*. **Journal of immunology**, v. 187, n. 12, p. 6447–55, 15 dez. 2011.

PEREZ-BLANCO, M.; HERNÁNDEZ VALLES, R.; GARCIA-HUMBRIA, L.; YEGRES, F. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. **Med Mycol**, v. 44, n. 5, p. 467-71, 2006.

PHILIP, N. H.; DILLON, C. P.; SNYDER, A. G.; FITZGERALD, P.; WYNOSKY-DOLFI, M. a; ZWACK, E. E.; HU, B.; FITZGERALD, L.; MAULDIN, E. a; COPENHAVER, A. M.; SHIN, S.; WEI, L.; PARKER, M.; ZHANG, J.; OBERST, A.; GREEN, D. R.; BRODSKY, I. E. Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF- κ B and MAPK signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 20, p. 7385–90, 20 maio 2014.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**. v. 53, n. 3, p. 429–43, 2006.

QUEIROZ-TELLES, F. A cromoblastomicose no estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 4, p. 345-46, 1997.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: A neglected tropical disease. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 57, n. 1, p. 46–50, 2015.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, M.; VITALE, R. G.; SALGADO, C. G.; BONIFAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Med. Mycol.**, v. 47, n. 1, p. 3–15, fev. 2009.

QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Med. Mycol.**, v. 49, n. 3, p. 225-36, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. D. C. L. Challenges in the therapy of chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5-6, p. 477–88, jun. 2013.

RAJENDRAN, C.; RAMESH, V.; MISRA, R. S.; KANDHARI, S.; UPRETI, H. B.; DATTA, K. K. Chromoblastomycosis in India. **Int. J. Dermatol.**, v. 36, n. 1, p. 29-33, 1997.

RAST, D. & HOLLENSTEIN, G. Architecture of the *Agaricus bisporus* spore wall. **Can. J. Bot.**, v. 55, n. 16, p. 2251–62, 1977.

RATHINAM, V. a K.; JIANG, Z.; WAGGONER, S. N.; SHARMA, S.; COLE, L. E.; WAGGONER, L.; VANAJA, S. K.; MONKS, B. G.; GANESAN, S.; LATZ, E.; HORNUNG, V.; VOGEL, S. N.; SZOMOLANYI-TSUDA, E.; FITZGERALD, K. a. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 395–402, maio 2010.

REVANKAR, S. G.; SUTTON, D. A. Melanized fungi in human disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 4, p. 884–928, out. 2010.

RIMESSI, A., BEZZERRI, V., PATERGNANI, S., MARCHI, S., CABRINI, G., PINTON, P. Mitochondrial Ca²⁺-dependent NLRP3 activation exacerbates the *Pseudomonas aeruginosa*-driven inflammatory response in cystic fibrosis. **Nature communications**, v. 6, 2015.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 1, p. 1–23, jan. 2004.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275–88, abr. 2011.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; DEL SERO, G.; NICOLETTI, I.; TRINCHIERI, G.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. **J. Immunol.**, v.158, n.11, p. 5349-56, jun, 1997.

ROSEN, T., & OVERHOLT, M. Persistent viability of the Medlar body. **Int. J. Dermatol.**, v. 35, n. 2, p. 96-8, 1996.

ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W. Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 34, n. 323–30, 1996.

ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. **Mycopathologia**, v. 126, n. 2, p. 85–91, maio 1994.

RUBIN, H. A.; BRUCE, S.; ROSEN T.; McBRIDE, M. E. Evidence for percutaneous inoculation as the mode of transmission for chromoblastomycosis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v 25, n. 5, p. 951-4, 1991.

RUDOLPH, M. Über brasilianische ‘Figueira’ (Vorläufige Mitteilung). **Archiv Schiffs und Tropen-Hyg.**, v. 18, p. 498-99, 1914.

SAAVEDRA, P. H. V; DEMON, D.; VAN GORP, H.; LAMKANFI, M. Protective and detrimental roles of inflammasomes in disease. **Seminars in immunopathology**, v. 37, n. 4, p. 5-7, abr. 2015.

SAÏD-SADIER, N.; PADILLA, E.; LANGSLEY, G.; OJCIUS, D. M. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10008, jan. 2010.

SALGADO, C. G. Fungal x host interactions in chromoblastomycosis: what we have learned from animal models and what is yet to be solved. **Virulence**, v. 1, n. 1, p. 3–5, 2010.

SALGADO, C. G.; DA SILVA, J. P.; DINIZ, J. A.; DA SILVA, M. B.; DA COSTA, P. F.; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 46, n. 1, p. 33–36, 2004.

SANTOS, A. L. S.; PALMEIRA, V. F.; ROZENTAL, S.; KNEIPP, L. F.; NIMRICHTER, L.; ALVIANO, D. S.; RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 5, p. 570–91, set. 2007.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–32, 19 mar. 2010.

SILVA, A. A. D. L.; CRIADO, P. R.; NUNES, R. S.; DA SILVA, W. L. F.; KANASHIRO-GALO, L.; DUARTE, M. I. S.; SOTTO, M. N.; PAGLIARI, C. *In situ* immune response in human chromoblastomycosis—a possible role for regulatory and Th17 T cells. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 9, p. e3162, set. 2014.

SILVA, J. P.; SOUZA, W. De; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, p. 171–75, 1999.

SMITH, J. R.; HART, P. H.; WILLIAMS, K. A. Basic pathogenic mechanisms operating in experimental models of acute anterior uveitis. **Immunology and cell biology**, v. 76, n. 6, p. 497–512, dez. 1998.

SOLLBERGER, G.; STRITTMATTER, G. E.; GARSTKIEWICZ, M.; SAND, J.; BEER, H.-D. Caspase-1: the inflammasome and beyond. **Innate immunity**, v. 20, n. 2, p. 115–25, fev. 2014.

SOUSA, M. D. G. T.; BELDA, W.; SPINA, R.; LOTA, P. R.; VALENTE, N. S.; BROWN, G. D.; CRIADO, P. R.; BENARD, G. Topical application of imiquimod as a treatment for chromoblastomycosis. **Clinical infectious diseases**, v. 58, n. 12, p. 1734–7, jun. 2014.

SOUSA, M. D. G.; REID, D. M.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; RULAND, J.; LANGHORNE, J.; YAMASAKI, S.; TAYLOR, P. R.; ALMEIDA, S. R.; BROWN, G. D. Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 5, p. 436–43, 19 maio 2011.

SOUSA, M. G.; GHOSN, E. E. B.; NASCIMENTO, R. C.; BOMFIM, G. F.; NOAL, V.; SANTIAGO, K.; DE MARIA PEDROZO E SILVA AZEVEDO, C.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, a G.; DE CASTRO LIMA SANTOS, D. W.; CRIADO, P. R.; COSTA MARTINS, J. E.; ALMEIDA, S. R. Monocyte-derived dendritic cells from patients with severe forms of chromoblastomycosis induce CD4⁺ T cell activation in vitro. **Clinical and experimental immunology**, v. 156, n. 1, p. 117–25, abr. 2009.

STEELE, C.; RAPAKA, R. R.; METZ, A.; POP, S. M.; WILLIAMS, D. L.; GORDON, S.; KOLLS, J. K.; BROWN, G. D. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. **PLoS pathogens**, v. 1, n. 4, p. e42, dez. 2005.

SUN, H.; XU, X.-Y.; TIAN, X.-L.; SHAO, H.-T.; WU, X.-D.; WANG, Q.; SU, X.; SHI, Y. Activation of NF-κB and respiratory burst following *Aspergillus fumigatus* stimulation of macrophages. **Immunobiology**, v. 219, n. 1, p. 25–36, 4 jul. 2013.

SURASH, S.; TYAGI, a.; DE HOOG, G. S.; ZENG, J.-S.; BARTON, R. C.; HOBSON, R. P. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*. **Med. Mycol.**, v. 43, n. 5, p. 465–72, jan. 2005.

SUTTON, D. A.; RINALDI, S. E. S. Dematiaceous fungi. In: ANAÏSSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R., PFALLER, M. D. **Clinical Mycology**. New York: Churchill-Livingstone, p. 2325–51, 2003.

TAKEI, H.; GOODMAN, J. C.; POWELL, S. Z. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora bantiana* and *Fonsecaea monophora*: report of three cases. **Clin. Neuropathol.** v. 26, n. 1, p. 21-27, 2007.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–20, 19 mar. 2010.

TAVARES, A. H., MAGALHÃES, K. G., ALMEIDA, R. D. N., CORREA, R., BURGEL, P. H., BOCCA, A. L. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 12, p. e2595, dez. 2013.

TAVARES, A. H.; BÜRGEL, P. H.; BOCCA, A. L. Turning up the heat: Inflammasome activation by fungal pathogens. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004948, jul. 2015.

TOKOUSBALIDES, M. C.; SISLER, H. D. Site of inhibition by tricyclazole in the melanin biosynthetic pathway of *Verticillium dahliae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 11, n. 1-3, p. 64–73, jul. 1979.

TOMALKA, J.; GANESAN, S.; AZODI, E.; PATEL, K.; MAJMUDAR, P.; HALL, B. a; FITZGERALD, K. a; HISE, A. G. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 12, p. e1002379, dez. 2011.

VAN DE VEERDONK, F. L.; JOOSTEN, L. A. B.; SHAW, P. J.; SMEEKENS, S. P.; MALIREDDI, S.; VAN DER MEER, J. W. M.; ... KANNEGANTI, T. D. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 8, p. 2260–68, 2011.

VAN DER GRAAF, C. A. A.; NETEA, M. G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J. Differential Cytokine Production and Toll-Like Receptor Signaling Pathways by *Candida albicans* Blastoconidia and Hyphae. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, p. 7458–64, 2005.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. Melanin , melanin “ghosts ”, and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 7, p. 2420–24, 1996.

WEVERS, B. A.; KAPTEIN, T. M.; ZIJLSTRA-WILLEMS, E. M.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; GEIJTENBEEK, T. B. H.; GRINGHUIS, S. I. Fungal engagement of the c-type lectin Mincle suppresses dectin-1-induced antifungal immunity. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 4, p. 494–505, abr. 2014.

WHEELER, M. H. & BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v.2, p.338-87. 1988.

WHITE L. P. Melanin: a naturally occurring cation exchange material. **Nature**, v. 182, p. 1427–28, nov. 1958.

WÜTHRICH, M.; WANG, H.; LI, M.; LERKSUTHIRAT, T.; HARDISON, S. E.; BROWN, G. D.; KLEIN, B. *Fonsecaea pedrosoi*-induced Th17-cell differentiation in mice is fostered by Dectin-2 and suppressed by Mincle recognition. **European journal of immunology**, v. 45, n. 9, p. 2542–52, set. 2015.

YAMAMOTO, Y.; KLEIN, T. W.; FRIEDMAN, H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 3, p. 1077–82, 1997.

ZANDER, D. S.; POPPER, H.; JAGIRDAR, J.; HAQUE, A.; BARRIOS, R. Molecular pathology of fungal lung infection. In: **Molecular pathology of lung diseases**. Springer. P. 429-41, 2007.

ZHANG, J.; WANG, L.; XI, L.; HUANG, H.; HU, Y.; LI, X.; HUANG, X.; LU, S.; SUN, J. Melanin in a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* inhibits the production of nitric oxide and Th1 cytokines of murine macrophages. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5-6, p. 515-22, 2012.

ZHONG, J.; FRASES, S.; WANG, H.; CASADEVALL, A.; STARK, R. E. Following fungal melanin biosynthesis with solid-state NMR: biopolymer molecular structures and possible connections to cell-wall polysaccharides. **Biochemistry**, v. 47, n. 16, p. 4701–10, 22 abr. 2008.