



Universidade de Brasília - UnB

Faculdade de Medicina - FM

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Imunologia Aplicada

**Imunopatologia da cromoblastomicose: modulação da resposta
inflamatória por formas do fungo *Fonsecaea pedrosoi* e seu impacto
na cromoblastomicose murina**

ISAQUE MEDEIROS SIQUEIRA

Brasília - DF,

Fevereiro/2016

ISAQUE MEDEIROS SIQUEIRA

**Imunopatologia da cromoblastomicose: modulação da resposta
inflamatória por formas do fungo *Fonsecaea pedrosoi* e seu impacto na
cromoblastomicose murina**

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília - DF

Fevereiro/2016

ISAQUE MEDEIROS SIQUEIRA

**Imunopatologia da cromoblastomicose: modulação da resposta
inflamatória por formas do fungo *Fonsecaea pedrosoi* e seu impacto na
cromoblastomicose murina**

Banca examinadora:

Presidente: Prof.^a Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca, UnB;

Membro: Prof.^o Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcante Neto, UnB;

Membro: Prof.^a Dra. Kelly Grace Magalhães, UnB;

Membro: Prof.^o Dr. Marcelo de Macedo Brigido, UnB;

Membro: Prof.^a Dra. Simone Gonçalves Fonseca, UFG;

Suplente: Prof.^o Dr. Aldo Henrique F. P. Tavares, UnB;

Este trabalho foi desenvolvido majoritariamente no Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA), da Universidade de Brasília (UnB), contando com o apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF). Parte do trabalho foi desenvolvida no laboratório do professor Dr. Bruce Klein da Universidade de Wisconsin – Madison (UW), no âmbito do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), fomentado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Apoio:



Agradecimentos

À **Deus** pelo dom da vida e pelas constantes bênçãos.

A toda minha família, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

À professora Dra. **Anamélia Bocca**, por ter acreditado e confiado no meu trabalho ao longo desses anos. Agradeço, ainda, pelos constantes incentivos e valorosos ensinamentos.

Aos mestres da minha vida acadêmica, em especial aos professores: **Carlos Inácio, Jaime Santana, Sônia Bão, Sueli Felipe e Ildinete Pereira**.

Aos amigos de longa data da Pós-Graduação: **Ana Camila, Márcio Jerônimo, Karina Simon e Yanna Karla**, por todo o companheirismo e apoio.

A todos os integrantes do LIA pela maravilhosa companhia durante esses anos. Em especial à **Luiza Leonhardt**, por todo o auxílio na execução do trabalho, e ao **Raffael Castro**, cujas contribuições neste trabalho são incomensuráveis, pela parceria e dedicação ímpar a este projeto.

Aos professores: **Aldo Tavares, Florêncio Figueiredo, Kelly Magalhães, Marcelo Brígido e Simone Foseca**, pelas valiosas sugestões.

Ao professor **Bruce Klein** e todos os integrantes do seu laboratório junto à Universidade de Wisconsin-Madison (USA), pelo acolhimento, pela generosidade e por todo o aprendizado durante o doutorado sanduíche. Agradeço, ainda, ao **Marcel Wüthrich, Huafeng Wang e Mengyi Li**, pelas significativas contribuições neste trabalho.

Ao Laboratório de Imunopatologia - LIB, especialmente à **Viviane Montanaro Leal** pelo auxílio técnico no desempenhar deste trabalho.

Ao **Christian Hoffmann** pela colaboração e valorosas sugestões.

À **Tainá Raiol** e a todos os integrantes do grupo de bioinformática do Departamento de Biologia Celular: **Christiane Nishibe, Nalvo Almeida e Maria Emília Walter** pela parceria na análise dos dados de sequenciamento de alto desempenho.

À Coordenação e à Secretaria da Pós - Graduação em Patologia Molecular pelo apoio.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - **IBAMA**, pelo incentivo e por ter possibilitado a conclusão do presente trabalho, assim como a participação no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE.

À Diretoria de Proteção Ambiental - **DIPRO** do **IBAMA** e a todos os integrantes da Coordenação Geral de Fiscalização - **CGFIS**, pela força, companheirismo e compreensão.

Ao Fundo de Apoio à Pesquisa do DF (**FAP/DF**) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pelo fomento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela oportunidade de participar do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - **PDSE**.

A todos que participaram, de forma direta ou indireta, na execução deste trabalho, ou que me apoiaram de alguma forma: **MEU MUITO OBRIGADO!**

“Ouse ir além e o poder lhe será dado”

(José Roberto Marques)

SUMÁRIO

Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XV
Lista de Abreviaturas	XVI
Resumo	XVIII
Abstract	XX
Introdução	1
Cromoblastomicose.....	1
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	6
Diagnóstico e tratamento.....	7
Imunidade aos Fungos.....	11
Imunopatologia da cromoblastomicose e respota inflamatória.....	18
Objetivos	23
Capítulo I - Análise do desenvolvimento da CBM murina após infecção com diferentes formas do fungo <i>F. pedrosoi</i>	24
1.1 Materiais e Métodos	25
1.1.1 Cultivo e isolamento das formas fúngicas de <i>F. pedrosoi</i>	25
1.1.2 Preparação do inóculo e infecção.....	27
1.1.3 Animais de experimentação e <i>design</i> experimental	27
1.1.4 Histopatologia	28
1.1.5 Quantificação de formas fúngicas na lesão e recuperação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	29
1.1.6 Quantificação de citocinas no macerado de lesão	29
1.1.7 Análise estatística.....	30
1.2 Resultados e Discussão	32
1.2.1 Infecção com diferentes formas do fungo <i>F. pedrosoi</i> acarreta em manifestações distintas da CBM.....	32
1.2.2 Infecção com células muriformes promove o estabelecimento de CBM murina mais duradoura em comparação à infecção com as demais formas fúngicas.....	36
1.2.3 Presença de hifas e, principalmente, de células muriformes na lesão, mas não de conídios, está relacionada com a alta produção de citocinas pro-inflamatórias durante o estabelecimento da CBM experimental.....	37
Capítulo II - Análise ex vivo de interação entre as diferentes formas do fungo <i>F. pedrosoi</i> e fagócitos murinos, e seu impacto na imunopatologia da CBM.	42

2.1	Materiais e Métodos	43
2.1.1	Obtenção de macrófagos peritoniais.	43
2.1.2	Extração e sequenciamento de alto desempenho do RNA (<i>High Throughput RNA Sequencing</i> , RNA-seq)	43
2.1.3	Validação por RT-PCR de genes diferencialmente expressos	44
2.1.4	Obtenção de macrófagos e células dendríticas derivados da medula óssea (BMDM e BMDC).....	46
2.1.5	Co-cultura de fagócitos com formas do fungo <i>F. pedrosoi</i> e índice de fagocitose. 47	
2.1.6	Quantificação de óxido nítrico, citocinas e quimiocinas em sobrenadante de cultura. 48	
2.1.7	Avaliação da CBM murina em modelo de inflamação crônica induzida por zimosan 49	
2.1.8	Análise estatística.....	49
2.2	Resultados e Discussão.....	51
2.2.1	Células muriformes, ao contrário de conídios, promovem grande expressão diferencial de genes em macrófagos peritoniais.....	51
2.2.2	Interação com células muriformes, mas não com conídios, acarreta em intensa regulação positiva de genes relacionados com a resposta inflamatória	53
2.2.3	Células muriformes induzem intensa produção de citocinas pró-inflamatórias em co-cultivo com macrófagos peritoneais, ao passo que inibem óxido nítrico.....	59
2.2.4	Componentes da parede de células muriformes respondem por parte da produção de citocinas pro-inflamatórias em culturas com macrófagos peritoniais.	65
2.2.5	BMDM e BMDCs também produzem altas concentrações de TNF- α e IL-1 β quando da interação com células muriformes.	68
2.2.6	O processo de internalização de conídios, mas não de células muriformes, independe de reconhecimento por FC e Dectina 1.....	70
2.2.7	Resposta inflamatória intensa no curso da CBM murina está correlacionada com a persistência do fungo na lesão.....	73
Capítulo III - Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4+ na CBM murina e sua relevância para o processo de remissão da doença observado no modelo experimental		77
3.1	Materiais e Métodos	78
3.1.1	Modelo animal e infecção	78
3.1.2	Obtenção e isolamento de células do linfonodo drenante e do coxim plantar	79
3.1.3	Marcação de moléculas de superfície.....	79
3.1.4	Marcação intracelular	80
3.1.5	Citometria de fluxo.....	81
3.1.6	Ensaio de neutralização/depleção com anticorpos monoclonais.....	82

3.1.7	Ensaio com células repórteres e estimulação com formas do fungo <i>F. pedrosoi</i> .	83
3.1.8	Análise estatística.....	83
3.2	Resultados e Discussão.....	85
3.2.1	Infecção com propágulos de <i>F. pedrosoi</i> induz intensa migração de Linfócitos T auxiliares para o sítio de infecção	85
3.2.2	Grande parte dos linfócitos T CD4+ no linfonodo drenante expressam Foxp3 durante a CBM murina.....	87
3.2.3	Predominância de Th17 no sítio da infecção é observada nos estágios iniciais da CBM murina, enquanto que a prevalência de Th1 ocorre nos estágios mais tardios	91
3.2.4	Neutralização de IL-17A e IFN- γ prejudica a eliminação do fungo no curso da CBM murina.....	92
3.2.5	Dectina-2 e Dectina-1 são os principais CLRs capazes de reconhecer as diferentes formas do fungo <i>F. pedrosoi</i>	95
3.2.6	Animais dectina-2 KO tem redução da carga fúngica prejudicada nos primeiros 15 dias de infecção sem, contudo, afetar a resolução da doença.....	97
3.2.7	Depleção de células CD25+ repercute em maior redução da carga fúngica nos primeiros 15 dias de infecção, todavia se opõe ao processo de remissão da doença observado no modelo murino	102
	Considerações Finais, Conclusões e Perspectivas.....	108
	Referências Bibliográficas	114
	Anexo I	150
	Anexo II.....	151

Índice de Figuras

Figura 1. Lesões características da CBM	5
Figura 2. Macro e micromorfologia do <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	6
Figura 3. Morfologias do <i>Fonsecaea pedrosoi</i> observados no Microscópio Eletrônico de Varredura e no microscópio de luz	7
Figura 4. Produção de citocinas e sub-populações de linfócitos T auxiliares nas infecções fúngicas	13
Figura 5. Microscopia ótica das formas do fungo <i>F. pedrosoi</i> purificadas.	26
Figura 6. Esquematização dos experimentos realizados no âmbito do Capítulo I	31
Figura 7. Progressão da CBM murina induzida por diferentes formas do fungo <i>F. pedrosoi</i>	34
Figura 8. Quantificação de unidades formadoras de colônia e análises histopatológicas	35
Figura 9. Quantificação das formas do fungo nas lesões	38
Figura 10. Quantificação de citocinas no curso da CBM murina após infecção com conídios, hifas, células muriformes ou propágulos do fungo <i>F. pedrosoi</i>	40

Figura 11. Esquematização dos experimentos ex vivo realizados no âmbito do Capítulo II	50
Figura 12. Identificação dos genes diferencialmente expressos.....	52
Figura 13. Heatmap mostrando todos os genes diferencialmente expressos na interação de macrófagos peritoniais com células muriformes ou conídios de <i>F. pedrosoi</i>	54
Figura 14. Heatmap mostrando os 90 genes de maior fold change na interação com células muriformes.	56
Figura 15. RT-PCR em tempo real de genes importantes para o reconhecimento de células fúngicas e estabelecimento do processo inflamatório	58
Figura 16. Perfil de expressão de genes que participam da via de sinalização dos receptores do tipo Toll.....	60
Figura 17. Quantificação de citocinas, quimiocina e NO ₂ no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoniais com formas fungo <i>F. pedrosoi</i>	62
Figura 18. Quantificação de TNF- α e IL-6 em diferentes concentrações de conídios ...	63
Figura 19. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando camadas da parede celular de <i>Cândida albicans</i>	65
Figura 20. Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura na interação de macrófagos peritoniais e diferentes formas do fungo <i>F. pedrosoi</i>	67

Figura 21. Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura na interação de BMDM e BMDC com diferentes formas do fungo.....	69
Figura 22. Expressão diferencial de genes relacionados com o processo de fagocitose	71
Figura 23. Índice de fagocitose bloqueando-se os receptores dectina-1 e Fc γ	72
Figura 24. Progressão da CBM murina em modelo inflamatório induzido por zimosan	75
Figura 25. Estratégia de seleção para análise de sub-populações de linfócitos T.	82
Figura 26. Esquematização dos experimentos realizados no âmbito do Capítulo III.....	83
Figura 27. Quantificação do percentual da população de linfócitos T presentes no linfonodo drenante e coxim plantar	86
Figura 28. Análise da subpopulação de linfócitos T CD4 ⁺ ativados no linfonodo poplíteo	88-89
Figura 29. Análise da subpopulação de linfócitos T CD4 ⁺ ativados presentes no coxim plantar	93-94
Figura 30. Quantificação de CFU em animais tratados com anti-IL-17A e anti-IFN- γ .	95
Figura 31. Ensaio de interação entre formas do fungo com células repórteres expressando CRLs e portando construção NFAT-lacZ.....	97
Figura 32. Análise da subpopulação de linfócitos T CD4 ⁺ em animais dectina-2 KO .	99

Figura 33. Análise morfométrica e quantificação de CFU no curso da CBM em animais dectina-2 KO.....	100
Figura 34. Avaliação do percentual de linfócitos T CD4+ ativos expressando Foxp3 no linfonodo de animais tratados com anti-CD25	103
Figura 35. Confirmação da redução da população de Treg no linfonodo drenante de animais tratados com anti-CD25	105
Figura 36. Análise morfométrica (A e C) e quantificação de CFU (B) no curso da CBM em animais com redução na população de Treg.....	106

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais agentes etiológicos da cromoblastomicose	3
Tabela 2. Relação dos anticorpos e respectivos fluoróforos utilizados na marcação exclusiva de moléculas de superfície.	80
Tabela 3. Relação dos anticorpos e respectivos fluoróforos utilizados na marcação de superfície em conjunto com a marcação intracelular (ICS).	81

Lista de Abreviaturas

°C - Graus Celsius

µl - Microlitro

µg - Micrograma

µM - Micromolar

ANOVA - Análise de Variância

ATCC- *American Type Culture Collection* (Coleção de espécimes em cultura da América)

BD - Batata Dextrose

BSA - *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)

CBM – Cromoblastomicose

CFU – Colony Forming Units (Unidades Formadoras de Colônia)

CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CP – Coxim plantar

DAMP - *Danger associated molecular pattern* (padrões moleculares associados ao perigo)

DNA - Deoxyribonucleic acid (Ácido Dexorribonucléico)

D.P.I – Dias pós infecção

D.P.T – Dias pós tratamento

RNA - Ribonucleic acid (Ácido Ribonucleico)

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio de Ligação Imunoenzimática)

FC – *Fold Change*

Fc – porção constante de imunoglobulinas

HE - Hematoxilina-eosina

IFN-γ - Interferon gama

IL - Interleucina

iNOS - Nitric Oxide Synthase (Óxido Nítrico Sintase)

Kg - Quilograma

LN - Linfonodo

LPS - Lipo-polissacarídeo

mg - Miligrama

MHC-I e II - *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade I e II).

mRNA - Messenger Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucléico mensageiro)

NEED - N-1(1-Naphthyl)ethyl-enedinamina

NO - *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)

ng – nanograma

PAMP - Pathogen-associated molecular pattern (Padrões moleculares associados ao patógeno)

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Salino Fosfato)

pg - Picograma

pH - Potencial hidrogeniônico

RNA-Seq – *High throughput RNA sequencing* (sequenciamento de alto desempenho do RNA)

RPM - Rotações por Minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

SDA - Sabouraud Dextrose Ágar

SEM - *Standart Error of the Mean* (Desvio Padrão da Média)

Th - *T helpers* (Linfócito T auxiliar)

Treg – Linfócitos T regulatórios

TLR - *Toll Like Receptor* (Receptores do Tipo Toll)

TNF α - *Tumoral Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)

Resumo

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea, crônica, de distribuição cosmopolita, causada por vários fungos demáceos, pigmentados e dimórficos. Pacientes com a doença ainda são tidos como desafio terapêutico, principalmente devido à sua natureza recalcitrante. Tendo em vista a persistência do fungo no tecido e a cronicidade das lesões, a ativação do sistema imunológico do hospedeiro apresenta grande relevância nessa micose. Após infecção com diferentes formas do fungo *Fonsecaea pedrosoi* (conídios, hifas e células muriformes) isoladamente foi observado manifestações distintas da CBM murina experimental de modo que a infecção com células muriformes promoveu o estabelecimento de doença mais duradoura em comparação à infecção com as demais formas do fungo. Ademais, foi visto que a presença de hifas e, principalmente, de células muriformes na lesão, mas não de conídios, está relacionada com alta produção de citocinas pro-inflamatórias durante o estabelecimento da CBM experimental. Sequenciamento de alto desempenho do RNA (RNA-seq) de macrófagos recém-migrados para o peritônio em co-cultivo com conídios ou células muriformes do fungo mostraram que a interação com células muriformes, mas não com conídios, acarreta em intensa regulação positiva de genes relacionados com a resposta inflamatória do hospedeiro repercutindo em alta produção de citocinas pró-inflamatórias, de modo que o estabelecimento de inflamação exacerbada foi correlacionado com a persistência do fungo na lesão. Mecanismos efetores e a expressão de genes importantes na ativação da resposta imune adaptativa estão inibidos na interação com as formas do fungo. Análise das subpopulações de linfócitos T no linfonodo drenante e no sítio de infecção no curso da CBM murina experimental por citometria de fluxo mostraram polarização de linfócitos T com perfil regulatório no linfonodo poplíteo ao passo que no coxim plantar foi observada a predominância de

Th17 nos estágios iniciais da doença, sendo sucedida por uma polarização Th1 nos estágios mais tardios, relacionados com a remissão da doença. Ensaio *in vivo* de neutralização de IL-17A e IFN- γ obstará o processo de eliminação do fungo no curso da doença. De modo semelhante, animais dectina-2 KO, os quais apresentaram redução na população de Th17 no curso da doença, mostrou redução da carga fúngica prejudicada nos primeiros 15 dias de infecção sem, contudo, afetar a resolução da doença. Por fim, depleção *in vivo* de células CD25+, a qual leva à redução de células Treg presentes no linfodo drenante, repercutiu em maior redução da carga fúngica nos primeiros 15 dias de infecção, todavia se opôs ao processo de remissão da doença observado no modelo experimental murino. Assim, de modo geral, o presente trabalho traz novos elementos na compreensão da imunopatologia da doença, de forma que trabalhos futuros envolvendo a imunomodulação da resposta do hospedeiro para aquela mais efetiva pode representar uma estratégia promissora no tratamento, não só da CBM, como das demais micoses.

Palavras chaves: Cromoblastomicose, *Fonsecaea pedrosoi*, imunopatologia, inflamação, RNA-Seq, formas do fungo, linfócitos T auxiliares, Treg, Th17 e Th1.

Abstract

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic worldwide subcutaneous mycosis, caused by several dimorphic, pigmented dematiaceous fungi. Patients with the disease are still considered as therapeutic challenge, mainly because of its recalcitrant nature. Due to fungal persistence in the tissue and lesions chronicity, the immune system activation in the host is highly relevant in this mycosis. After infection with different *Fonsecaea pedrosoi* fungal forms alone (conidia, hyphae and muriform cells), it was observed distinct manifestations of experimental murine CBM so that infection with muriformes cells promoted the establishment of longer lasting disease compared to infection with other fungal forms. Moreover, the presence of hyphae and especially muriformes cells in skin lesions, but no conidia, is related with high production of pro-inflammatory cytokines during the establishment of experimental CBM. High throughput RNA sequencing (RNA-seq) of Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages co-cultivated with conidia or muriformes fungal cells showed that the interaction with muriformes cells, but not with conidia, results in strong upregulation of genes related to inflammatory response leading to a high production of proinflammatory cytokines, while exacerbated inflammation was correlated with the persistence of the fungus on the lesion. Effector mechanisms and the expression of genes important to adaptive immune response activation are inhibited in the interaction with the fungal cells. Analysis of T lymphocyte subpopulations in draining lymph node and in the site of infection during the course of experimental CBM by flow cytometry showed polarization of T lymphocytes with regulatory status in the popliteal lymph node while in the footpad was observed predominance of Th17 in the early stages of disease, being succeeded by Th1 popularization in the later stages, which is associated with disease remission. *In vivo* analysis with IL-17A and IFN- γ neutralization hindered fungal cell elimination in the

course of the disease. Similarly, dectin-2 KO animals, Th17 contraction in the course of the disease showed fungal burden impairment in the first 15 days of infection, but did not affected the disease resolution. Finally, in vivo depletion of CD25+ cells, which leads to reduction of Treg cells in the draining lymph node, reflected in greater reduction in fungal burden in the first 15 days of infection, however it opposes to disease remission observed in the experimental CBM. Thus, in general, this study brings new elements in the understanding of the immunopathology of CBM, so that future work involving immunomodulation of the host response to a more effective pattern can represent a promising strategy for the treatment, not only of CBM, but to other mycoses as well.

Key words: Chromoblastomycosis, *Fonsecaea pedrosoi*, immunopathology, inflammation, RNA-Seq, fungal forms, T helper lymphocytes, Treg, Th17 e Th1.

Introdução

Cromoblastomicose

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea crônica, granulomatosa, supurativa, por vezes debilitante, causada por fungos filamentosos, dimórficos, pertencentes à antiga família dos *Dematiaceous*^a [1–3]. Os membros dessa família são caracterizados por apresentarem coloração variável de verde escuro à marrom e negro devido à presença de melaninas. Essas, por sua vez, são importantes por estarem associadas à virulência^b de vários microorganismos reduzindo sua suscetibilidade face aos mecanismos de defesa do hospedeiro [4,5].

A doença foi estudada pela primeira vez em 1911 por Alexandrino Pedroso (São Paulo, Brasil), embora os seis primeiros casos tenham sido descritos somente em 1914, pelo médico alemão Max Rudolph. Radicado no Brasil, Rudolph descreveu uma doença exótica de nome “figueira” em trabalhadores rurais nas divisas do Estado de Minas Gerais e São Paulo [6,7]. No ano seguinte, Lane e Medlar publicaram os primeiros aspectos clínicos da doença com o isolamento de fungos pigmentados [8,9]. Mais tarde, Terra e colaboradores (1922) estabeleceram o termo “cromoblastomicose”

^a Os fungos dematiáceos formam um grupo de inúmeros gêneros e espécies intimamente relacionadas, tornando a sua taxonomia controversa e polêmica. As técnicas de biologia molecular, associadas aos caracteres morfológicos, bioquímicos e fisiológicos têm dado novos rumos à taxonomia desses fungos. Dessa forma, a família Dematiaceae deixa de existir e os fungos negros patógenos humanos passam a integrar a família *Herpotrichiellaceae* [30,218].

^b No presente trabalho, entenda-se por “Virulência”, a capacidade patogênica de um agente biológico, medida pela mortalidade que ele produz e/ou por seu poder de invadir tecidos, bem como pela sua capacidade de evasão frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro.

para designar essa doença [10]. Tal termo foi validado em 1992, embora outros nomes também tenham sido empregados^c [2,11].

A maioria dos casos da micose é reportada no Brasil, Madagascar^d, África do Sul e Costa Rica. No continente americano também foram diagnosticados casos: no México, Cuba, República Dominicana, Colômbia, Equador e Venezuela [12]. Apesar de apresentar características climáticas similares, o continente asiático registra baixos índices da doença, sendo a maioria dos casos observados no Sri Lanka, Índia, China e Japão [13–15]. Pequeno número de casos tem sido descrito nos Estados Unidos e Europa [16].

No Brasil, também são consideradas áreas endêmicas o Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e a região amazônica (Espadim & Pinto, 1997). Foram diagnosticados: entre 1985 e 1996, 71 casos no estado do Paraná [18]; entre 1963-1998, 100 casos diagnosticados no estado do Rio Grande do Sul [19] e, após um estudo, entre 1942-1997, 325 casos foram diagnosticados na região Amazônica [20].

Vários fungos demácios estão relacionados com a etiologia da doença (natureza multietiológica). No entanto, *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* são as espécies identificadas com maior frequência. Ambos são encontrados em regiões tropicais e subtropicais, embora o *F. pedrosoi* seja encontrado preferencialmente em áreas úmidas enquanto o *C. carrionii* é prevalente em áreas de clima semi-áridos [12,19–22].

^c Vários nomes já foram atribuídos à doença descrita inicialmente por Rudolph: figueira, formigueiro, dermatite verrucosa blastomicótica, dermatite verrucosa cromomicótica, cromomicose, cromomicose cutânea, cromoblastomicose cutânea, doença de Medlar, doença de Gomes, doença de Pedroso, doença de Carrion, doença de Pedroso e Carrion, micose de Lane e Pedroso, doença de Fonseca, sundra, susna, blastomicose negra e moléstia de guiteras são alguns exemplos [2,8].

^d Madagascar é considerada área endêmica da CBM com elevado número de ocorrências, sendo registrados cerca de 1400 casos entre os anos de 1955 a 1996. Estudos retrospectivos, na região, mostraram que a incidência anual da infecção é de 1:200.000 habitantes, com sub-áreas de elevada ocorrência, como o distrito de Ambovombe, onde os índices chegam a 1:480 habitantes [21].

Com menor frequência, a CBM pode ser causada por *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa* ou *Exophiala dermatitidis* [2,23–26]. *E. jeanselmei* e *E. spinifera* também foram observados formando células muriformes em lesões típicas da CBM [27–29]. Todos esses agentes etiológicos pertencem à mesma ordem de ascomicetos, a *Chaetothyriales*. Estudos taxonômicos moleculares revelaram que *F. compacta* representa uma variante morfológica de *F. pedrosoi* e, recentemente, *F. monophora* foi descrita como uma nova espécie com fenótipo similar à *F. pedrosoi*, porém, geneticamente distinta [30,31]. Embora *F. monophora* seja considerada espécie oportunista, pouco relacionada à CBM, estudos moleculares revelaram ser o agente predominante em casos da doença no sul da China, conforme demonstrado na **tabela 1** [14,32].

Tabela 1. Principais agentes etiológicos da cromoblastomicose.

<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	É o agente da CBM mais frequente no mundo (70-90%). Responsável pela maioria dos casos no Brasil, México, Norte de Madagascar e Japão.
<i>Cladophialophora carrionii</i>	Predominante em regiões endêmicas de clima seco. Compreende a maioria das espécies encontradas na Austrália, Sul de Madagascar, África do Sul e Cuba.
<i>Phialophora verrucosa</i>	Também é um importante causador de feohifomicoses.
<i>Fonsecaea compacta</i>	Raros agentes etiológicos da CBM.
<i>Exophiala jeanselmei</i>	
<i>Exophiala spinifera</i>	
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	

Adaptado de Ameen (2008) [33].

Comumente, a CBM desenvolve-se após a inoculação transcutânea de propágulos fúngicos (fragmentos de hifas e conídios), geralmente em decorrência de

traumas por fragmentos vegetais contaminados, como espinhos e lascas de madeira [34]. No entanto, embora os relatos sejam raros, outras vias de infecção também foram descritas, as quais incluem: inalação de esporos e disseminação hematogênica [35]. O local frequentemente acometido é a extremidade dos membros inferiores, seguido de membros superiores, região glútea, tronco e face. Entretanto, a doença já foi igualmente identificada em outras partes do corpo como na axila e na córnea [36,37]. Uma vez instalado no tecido, o fungo adere-se às células epiteliais e diferencia-se em estruturas parasitárias características, denominadas células muriformes^{e,f}, as quais resistem à destruição pelas células efectoras do hospedeiro (**Figura 1, B**), permitindo assim o estabelecimento crônico da doença [16,38].

A manifestação clínica é predominante em homens caucasianos, com idade entre 30 e 60 anos, atingindo principalmente trabalhadores rurais de países subtropicais e tropicais como o Brasil [12,19,20]. O período médio de incubação para o desenvolvimento da CBM ainda não é conhecido, embora na maioria dos casos a progressão da doença é lenta podendo levar anos ou até mesmo décadas para se estabelecer [2,39].

Clinicamente, a CBM é caracterizada pelo desenvolvimento lento de lesões polimórficas como: nódulos, verrugas, tumores, placas e cicatrizes [25,40]. Essas lesões se iniciam como erupções papulosas, nódulos (**Figura 1, A**) ou lesões verrucosas, formada nos pontos de inoculação do fungo. As placas verrucosas apresentam-se com aspecto crostoso e às vezes com características papilomatosas. As lesões ulceram-se podendo formar uma crosta aderente e espessa em sua superfície (**Figura 1, C**). Outras

^e Além de corpos muriformes, outras denominações também são empregadas para se referir a essas estruturas parasitárias: corpos fumagóides, escleróticos ou células de Medlar [16].

^f De acordo com Matsumoto e colaboradores (1993)[26], o termo “Muriforme” deve prevalecer sobre o “Esclerótico”, uma vez que esse último se refere à “escleródio”, massa compacta, geralmente arredondada, de hifas dormentes [219].

vezes apresentam um aspecto vegetante, evoluindo e tornando-se papilomatosas. Devido ao aumento dos vasos sanguíneos nas lesões, essas podem sangrar com facilidade [25,40,41]. Durante a fase inicial da doença é comum ocorrer a eliminação transepitelial ou dermoepitelial espontânea do fungo, em que o tecido conectivo lesado, pela inoculação de lascas de madeira ou espinhos, pode expelir o fungo através da epiderme, resultando em pontos negros na superfície da lesão [42]. Tais pontos negros representam uma forma de resistência do fungo, que é capaz de sobreviver por longos períodos e recidivar a lesão. Ao mesmo tempo, também estão relacionados à auto-inoculação do fungo, bem como ao seu retorno à natureza [43,44].



Figura 1. Lesões características da CBM, com a presença de aspectos nodulares (A) e placas extensas com áreas ulcerativas e de ceratose (C). Aspectos histopatológicos também são mostrados (B) evidenciando célula gigante multinucleada contendo várias células muriformes do *F. pedrosoi* (HE, x1000) [2].

Fonsecaea pedrosoi

O *F. pedrosoi*, cuja classificação taxonômica é posicionada no reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Euascomycetes*, ordem *Chaetothyriales* e família *Herpotrichiellaceae*, é o principal agente etiológico da CBM no mundo, sendo o fungo frequentemente isolado das lesões [2,45]. Ele é um fungo dimórfico, pigmentado, que vive na natureza como saprófita (**Figura 2, A-D**), sendo encontrado no solo, nos vegetais e em troncos de madeira apodrecidos [41,46]. O *F. pedrosoi* foi isolado de algumas fontes como os espinhos da planta *Mimosa pudica* e do coco babaçu (*Orbignya phalerata*) [47,48].

O *F. pedrosoi* é considerado um fungo dimórfico por apresentar duas formas de desenvolvimento, como os conídios, hifas ou micélios, consideradas as formas saprofíticas e as células muriformes isoladas ou ligadas às hifas, que são consideradas a forma patogênica (**Figura 3, A-D**) [45,49,50].

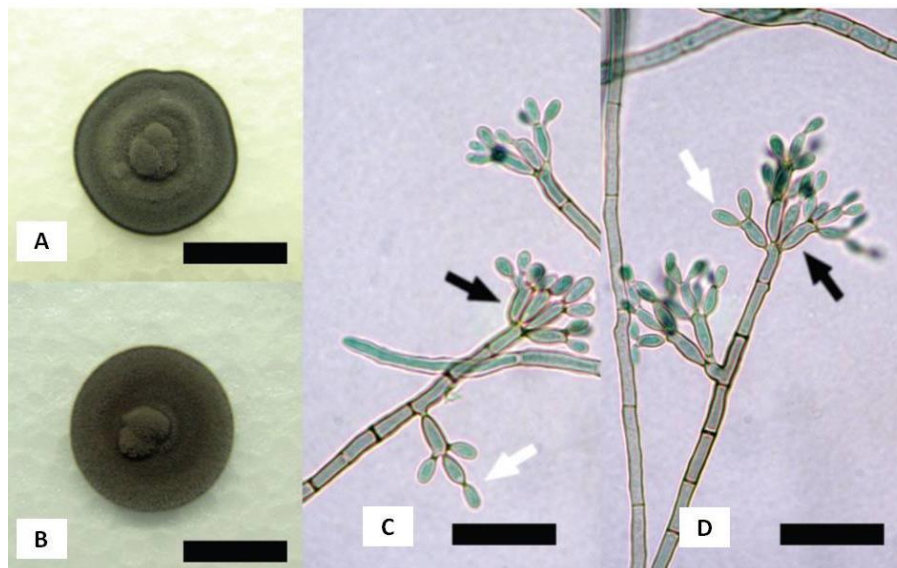


Figura 2. Macro e micromorfologia do *Fonsecaea pedrosoi* crescendo em meio rico em nutrientes. Aspectos macroscópicos da cultura do fungo (**A-B**), que apresenta coloração negra e aspecto cotonoso. Micromorfologia de hifas, com a presença de conidióforos terminais (setas pretas) e conídios (seta branca) (**C-D**) [47].

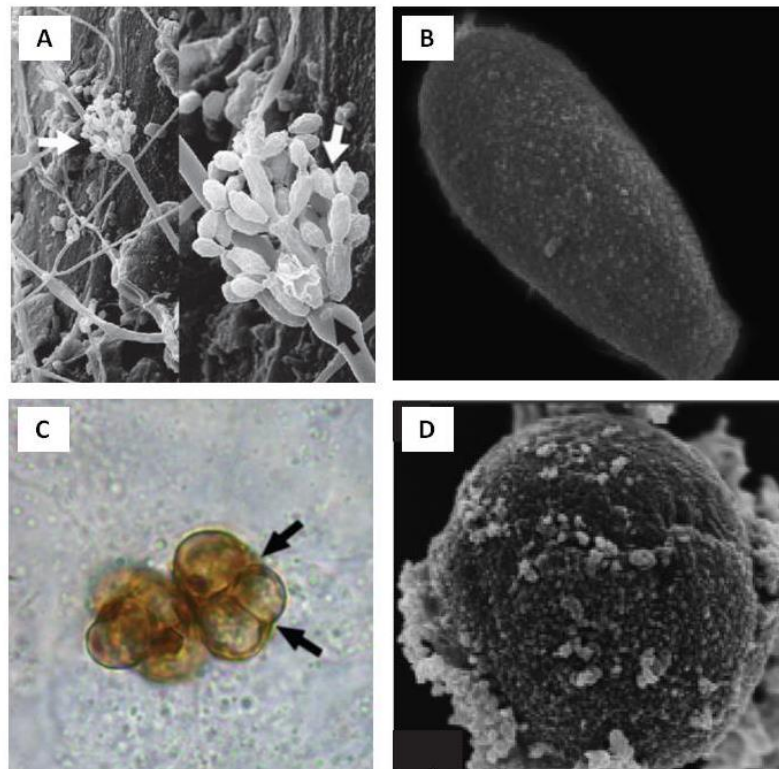


Figura 3. Morfologias do *F. pedrosoi* observados no Microscópio Eletrônico de Varredura (A-B e D) e no microscópio de luz (C). (A) Ultramicrografias de varredura das hifas, conidióforo (seta preta), células conidiogênicas, (A-B) conídios; (C-D) células muriformes do *F. pedrosoi* (seta preta). A,C [47]; B,E [45].

Diagnóstico e tratamento

Comumente, o diagnóstico da CBM advém de exames micológicos diretos (utilizando KOH 20-40%) e da cultura da lesão. Associados a esses, exames histopatológicos de fragmentos do tecido lesionado podem ser utilizados supletivamente no diagnóstico, bem como para a avaliação do curso da doença [16]. Todos os agentes da CBM, ao serem cultivados em meios de cultura para micologia (geralmente Sabouraud Dextrose Agar), após 7 dias de cultura, formam colônias inicialmente verdes escuras, tornando-se negras com o passar do tempo [2].

As células melanizadas do fungo são facilmente identificadas nos cortes histopatológicos corados com hematoxilina-eosina (HE), não necessitando de colorações especiais, embora essas possam ser empregadas nos casos em que a presença do fungo seja escassa (**Figura 1, B**) [16]. A visualização de células muriformes é imprescindível para a confirmação da CBM. Essas possuem estruturas globosas ou poliédricas de paredes espessas e acastanhadas, medindo de 4 a 12 μm de diâmetro, multiplicando-se por septação em dois planos distintos (**Figura 3, C**), em meio à reação inflamatória granulomatosa exsudativa. Tais estruturas fúngicas aparecem envoltas por células do hospedeiro, muitas vezes, no citoplasma de células gigantes, estando também presentes em microabscessos situados na interface da epiderme [16,34]. Apesar das células muriformes serem frequentemente observadas em microabscessos, por vezes essas células passam por transformação e apresentam-se como hifas próximas às camadas mais superficiais da lesão [51].

Histologicamente, os aspectos teciduais são similares a outras micoses profundas nas quais, hiperqueratose e hiperplasia pseudoepiteliomatosa são os principais aspectos observados no estrato córneo e na epiderme. Todavia, os padrões histológicos apresentados na CBM variam de acordo com o aspecto da doença. Análises histopatológicas da lesão em pacientes com a forma verrucosa mostram reação granulomatosa supurativa com a presença de várias células do fungo, estando associadas a uma resposta do tipo Th2. Por outro lado, em biopsias de pacientes com a forma eritematosa há a presença de granulomas tuberculóides bem formados, com redução na carga fúngica, indicando resposta do tipo Th1 [16,52].

Pacientes com CBM ainda são tidos como desafio terapêutico, principalmente devido à natureza recalcitrante da doença, sobretudo nas formas clínicas mais severas. Não obstante à ausência de um tratamento de escolha, são utilizadas, atualmente, várias

possibilidades de terapia, as quais envolvem tratamentos físicos ou químicos e a combinação de ambos. Amputações raramente são indicadas, não havendo relatos de resolução espontânea da doença em humanos [2,16]. O sucesso terapêutico depende da gravidade da doença, de forma que as graves, geralmente, são acompanhadas de edema, fibrose e infecção secundária. Essas condições reduzem os níveis tissulares das drogas antifúngicas, impossibilitando a completa resolução da infecção [16].

Calor local, raios laser com luz de dióxido de carbono, crioterapia e excisão cirúrgica, nos casos de lesões pequenas e em estágios iniciais, são os métodos físicos mais utilizados no tratamento da CBM, embora os resultados ainda sejam paliativos, podendo haver recorrência e/ou recrudescimento [53–56].

As alternativas de quimioterapia incluem: 5-flucitosina (50-150 mg/kg, por dia, em 4 doses; itraconazol (100-400 mg, por dia); terbinafina (250-500 mg, por dia); fluconazol (200-600 mg, por dia); tiabendazol (25 mg/kg, por dia, em 3 doses); cetoconazol (200-400 mg, por dia); anfotericina B (mais de 1 mg/kg, por dia). Todos esses fármacos estão associados à efeitos adversos, em decorrência de longos períodos de tratamento, as quais incluem toxicidade renal e hepática [57–59].

As opções mais recorrentes de quimioterápicos abrangem o itraconazol e a terbinafina. O itraconazol, derivado triazólico de primeira geração, com ação fungistática, atuando principalmente na inibição da enzima 14- α -demetilase, a qual está envolvida na síntese do ergosterol[§], é geralmente considerado a primeira opção no tratamento da CBM, devido aos excelentes resultados obtidos com esse fármaco nos tratamentos de diferentes formas (leve, moderada e severa) da doença [60,61]. Nas formas leves, a resposta clínica e microbiológica pode ser obtida em até 90% dos casos

[§] O ergosterol é um análogo do colesterol nos mamíferos e compreende o esteroide mais abundante nos fungos, amebas e outros protozoários. Os esteróides são componentes essenciais das membranas biológicas e são responsáveis, entre outras, pela manutenção da estrutura celular [220,221].

após uma média de 12 meses de tratamento contínuo. Já nas formas graves, com extensas lesões e complicações adicionais, como linfedema, fibrose e infecção secundária, a resposta completa pode ser obtida em apenas 40% dos pacientes, em média após 30 meses de tratamento contínuo [34,40,61]. A segunda droga mais utilizada é a terbinafina, um composto antifúngico do grupo das alilaminas, a qual possui, segundo alguns autores, ação fungicida [62]. Em pacientes não responsivos à monoterapia com itraconazol ou com terbinafina, a combinação das duas drogas pode ser empregada [63]. Finalmente, em pacientes não responsivos ao itraconazol e/ou terbinafina, pode ser experimentada a anfotericina B, 1mg/kg/dia, até uma dose acumulativa de 2 a 2,5 mg. A prescrição de anfotericina B, intravenosa, como único quimioterápico, raramente é bem sucedida, devendo ser acompanhada de inoculações intralesionais para garantir a sua eficácia [34,64].

Mesmo sendo o agente etiológico mais comum, o *F. pedrosoi* mostra-se o menos suscetível às terapias antifúngicas quando comparado com *C. carrionii* ou *P. verrucosa*. [33]. Nesse sentido, novas estratégias de tratamento fazem-se necessárias, de modo que vacinas de DNA (DNA-hsp65) já foram testadas com sucesso em modelo animal e mostraram-se promissoras no tratamento da CBM [65].

De modo geral, a forma de tratamento escolhida deve ser guiada conforme critérios clínicos, micológicos e histopatológicos, frequentemente re-avaliados [16].

Imunidade aos Fungos

As barreiras físicas da pele e as superfícies das células epiteliais da mucosa do trato respiratório, gastrointestinal e genito-urinário constituem o primeiro conjunto de defesa do hospedeiro contra as infecções fúngicas [66]. Defensinas, colectinas e componentes do sistema complemento também promovem o reconhecimento e a opsonização de células fúngicas [67]. O reconhecimento dessas células é mediado por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células do hospedeiro, como os receptores do tipo toll (TLRs) e os receptores de lectina tipo C (como dectina-1, dectina-2, mincle), os quais interagem com estruturas conservadas entre os microorganismos denominados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Após o reconhecimento dos PAMPs pelo PRRs, ocorre a ativação de sinais intracelulares os quais levam à ativação das células de defesa [68].

Além de PAMPs, os PRRs de mamíferos são capazes de reconhecer, ainda, padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) que são liberados durante o estresse e lesão celular, como ácidos nucleicos e alarminas^h [69]. A depender dos PAMPs ou DAMPs, bem como dos PRRs e das células da imunidade inata envolvidas, o conjunto dessa interação direcionará um padrão de resposta relativamente específico conforme as peculiaridades de cada patógeno [68].

A parede celular dos fungos variam sua composição dependendo de sua morfologia, estágio e ambiente de crescimento, possuindo a maior concentração de PAMP. Os três componentes mais abundantes na parede celular de fungos importantes clinicamente são: β -glucanas, quitina e mananas [67,70]. Outro componente geralmente encontrado em fungos patogênicos é a melanina, a qual promove a sobrevivência do

^h Alarminas são moléculas secretadas pelas células que morrem ou por células de defesa. São consideradas como padrões moleculares associadas ao perigo (DAMPs) e podem induzir um processo inflamatório local, e até mesmo, sistêmico. ATP e ácido úrico são exemplos de alarminas [69].

fungo em diferentes microambientes, aumentando sua resistência aos mecanismos efetores da resposta imune do hospedeiro bem como reduzindo a sua suscetibilidade aos antifúngicos [71]. Tais componentes podem se apresentar em diferentes concentrações dependendo da espécie e, por vezes, dependendo da forma fúngica em questão, acarretando em profundas mudanças na interação parasito-hospedeiro [72].

Monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, além de células epiteliais e endoteliais, participam da resposta imune inata aos fungos por meio de fagocitose ou eliminação direta do patógeno, bem como pela produção de mediadores capazes de ativar mecanismos efetores da imunidade inata e adaptativa (**Figura 4, A-C**) [67]. A fagocitose do fungo por células apresentadoras de antígenos profissionais (APC), como macrófagos e células dendríticas, induz a maturação dessas células e promove a diferenciação de células T naive em células T auxiliares (Th) efetoras.

As citocinas atuam como importantes mediadores da resposta inflamatória e também respondem por danos teciduais decorrentes de eventual desordem em sua produção. A indução, progressão e resolução de processo inflamatório exacerbado são resultados do balanço entre ambas as citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como entre subpopulações patogênicas e protetoras de células T (**Figura 4, A-C**) [73].

Uma resposta imune adaptativa predominantemente do padrão Th1 está diretamente associada à proteção contra fungos e à efetividade de vacinas antifúngicas [74]. O perfil de ativação de linfócitos Th1 decorre da interação de células fúngicas com TLRs e receptores de lectina tipo C (CLR), levando a produção de $\text{IFN}\gamma$, importantíssimo no processo de ativação de fagócitos no sítio de infecção [75–77].

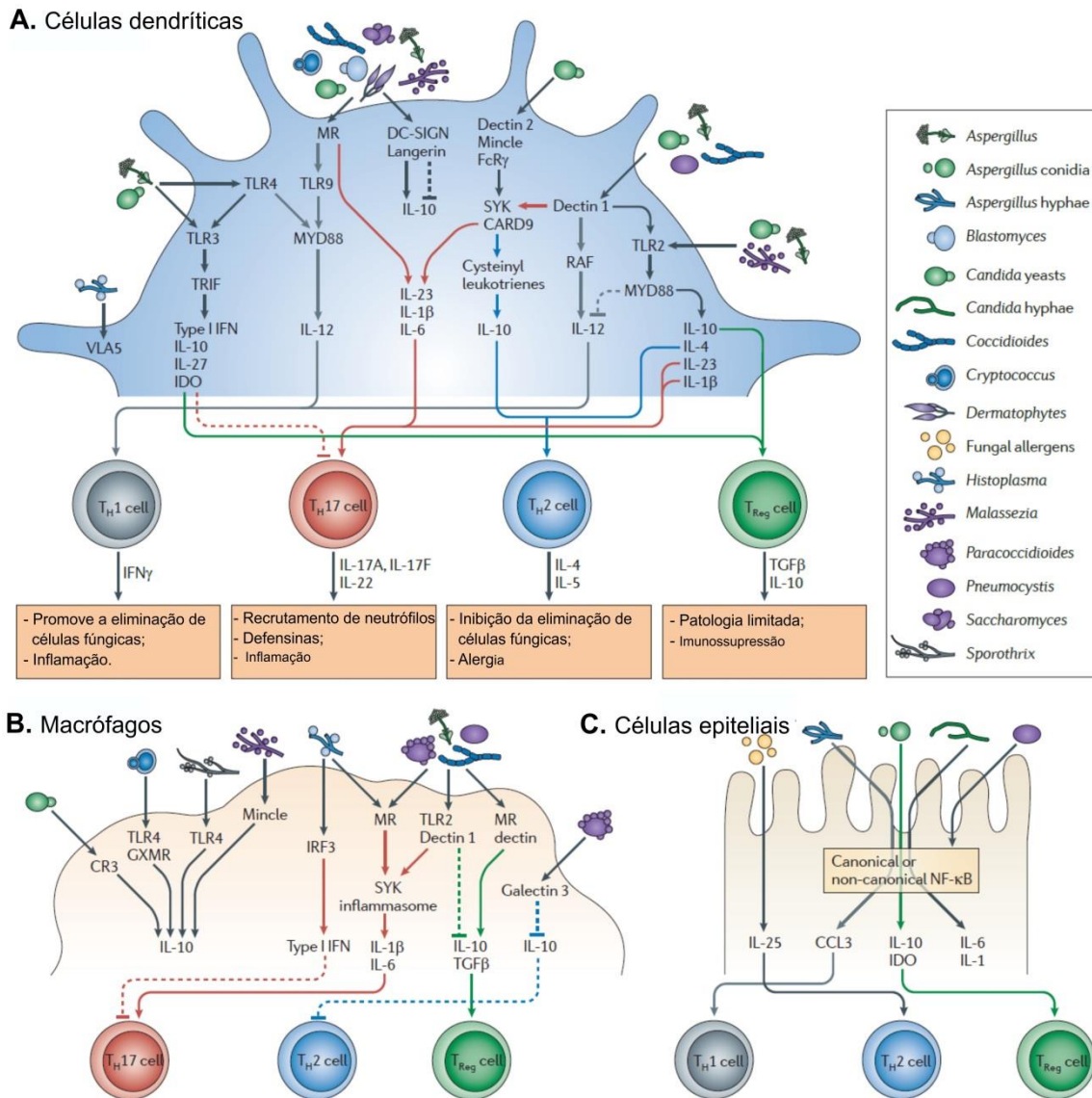


Figura 4. Produção de citocinas e sub-populações de linfócitos T auxiliares nas infecções fúngicas, conforme interação com células dendríticas (A), macrófagos (B) e células epiteliais (C). Adaptado de Romani (2011) [66].

IL-4 e IL-13 direcionam a diferenciação de células T naive em linfócitos do padrão Th2 os quais em geral atenuam a resposta imunológica induzida pelo padrão Th1 e favorecem a ativação alternativa dos macrófagos, acarretando eventualmente no favorecimento das infecções fúngicas, na recidiva da doença e, ainda, no desenvolvimento de reações alérgicas mediadas pela presença de células fúngicas [78,79]. Por outro lado, certo nível de proteção nas infecções causadas por fungos pode ser conferido pela resposta Th2 quando do favorecimento de resposta do tipo Th1

[80,81] ou por meio da alteração do tráfico intracelular de fungos dentro de macrófagos [82].

Imunoglobulinas específicas são capazes de conferir proteção contra microorganismos, promovendo a fagocitose, a ativação do complemento, a neutralização de toxinas e vírus, bem como a potencialização da citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos. Ligação de anticorpos à cápsula de polissacarídeo do fungo *Cryptococcus neoformans* é capaz tanto de promover a sua opsonização quanto de inibir a liberação de polissacárido e formação de biofilmes [83,84]. Mais ainda, estudos recentes mostram que a interação com anticorpos capazes de reconhecer a parede do fungo pode afetar o seu metabolismo, de modo que a ligação de anticorpos monoclonais às células de *C. neoformans* foi associada com mudanças na expressão gênica, fosforilação de proteínas, metabolismo lipídico, taxa metabólica e suscetibilidade a antifúngicos por parte desse patógeno [85].

Junto com a resposta Th1, a população de linfócitos Th17 também está associada ao padrão de resposta protetora contra infecções fúngicas [86,87]. Linfócitos Th17 desempenham papel importante na resposta do hospedeiro contra patógenos extracelulares, embora também estejam associados à patogenia decorrente de desordens de cunho autoimune e alérgicas. Células Th17 estão presentes no repertório de linfócitos T fungo-específicos de memória em humanos [88–90] e mediam a proteção induzida por vacina em camundongos [91].

Células Th17 e linfócitos T reguladores (Treg) são frequentemente encontrados na superfície de mucosas onde atuam na proteção contra microorganismos patogênicos e limitam as respostas excessivas de células T, respectivamente. A diferenciação de

células T *naive* em Th17 e Treg é finamente regulada por mediadores chaves como TGF- β , IL-6 e ácido retinóico [92].

Em infecções causadas por fungos, o processo de tolerância imunológica observado na mucosa respiratória ou gastrointestinal está intimamente relacionado à atividade das Treg. No entanto, com o objetivo de reduzir os impactos de uma resposta imune celular exacerbada, o padrão de resposta induzido pelas células Treg pode limitar a eficácia de resposta imune protetora, acarretando na eventual persistência de células fúngicas nos hospedeiros [93] e, finalmente, a imunossupressão [94]. Assim, ao mediar a qualidade e a magnitude das respostas efetoras tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, as células Treg podem ser responsáveis por uma gama de perfis de resposta imunológica, variando desde a indução de tolerância à intensa imunossupressão.

De modo geral, as doenças fúngicas representam um paradigma importante em imunologia, uma vez que podem resultar tanto da falta de reconhecimento pelo sistema imunitário quanto da superativação da resposta imunológica com indução de resposta inflamatória exacerbada [67]

De todas as doenças causadas por fungos a aspergilose tem sido uma das mais investigadas. Em humanos, a aspergilose invasiva afeta indivíduos altamente imunocomprometidos, progredindo rapidamente podendo levar o paciente à óbito. Essa doença é caracterizada pela destruição tecidual associada com a abundante presença de hifas em tecido necrótico [95]. Falhas na resposta imunológica do hospedeiro envolvendo neutropenia, tratamento com corticosteróides e tratamento imunossupressivo para transplantes resultam em predisposição à aspergilose invasiva [96]. A resposta imune do hospedeiro na aspergilose compreende a seguinte sequência de eventos: (1) o reconhecimento do patógeno; (2) o estabelecimento de resposta efetora

da imunidade inata; (3) resposta adaptativa robusta com a formação de células de memória.

Queratinocitos, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e basófilos compreendem a primeira linha de defesa contra a infecção de *Candida albicans*. Neutrófilos são considerados as células efetoras que primeiramente atuam na eliminação do fungo *in vivo*. Essas células possuem, ainda, papel imunomodulador no desenvolvimento da resposta de linfócitos T auxiliares. O fato de que neutrófilos são abundantes nos sítios de infecção com *C. albicans* e capazes de produzir seletivamente citocinas como IL-12 e IL-10, sugerem que essas células são importantes na determinação do padrão de resposta imune adaptativa no curso da infecção [97,98]. Resistência à infecção com *C. albicans* está associada com o padrão de resposta Th1, enquanto a imunidade mediada por Th2 é associada com a susceptibilidade à infecção.

Por sua vez, a resolução da criptococose pulmonar requer o desenvolvimento de um padrão de resposta do tipo Th1 seguido de recrutamento e ativação de leucócitos no pulmão. O infiltrado leucocitário em resposta à infecção com *Cryptococcus neoformans* inclui um mix de células de origem linfoide e mieloide, capazes de matar ou inibir o crescimento do fungo [66,97]. Neutrófilos e macrófagos são as duas principais células fagocíticas responsáveis pela eliminação do fungo no tecido. Populações de linfócitos T CD4+ são essenciais no controle do fungo. A resposta antígeno específica de linfócitos T CD4+ ocorre após o reconhecimento pelo receptor de linfócitos T de antígenos apresentado por células apresentadoras de antígeno em contexto de MHC II. Na hipótese de disseminação do fungo para o cérebro, foi demonstrado que a resistência do hospedeiro na criptococose cerebral é mediada por linfócitos T CD4+, de modo que a depleção de linfócitos T CD8+ não tiveram efeitos detectáveis na doença *in vivo*.

Entretanto, essas populações de linfócitos participam ativamente na contenção da infecção no pulmão [99].

A resposta imune do hospedeiro desempenha um papel fundamental também na progressão da paracoccidioidomicose (PCM), já que direciona a evolução da doença para uma das formas clínicas. O granuloma é um componente essencial na defesa contra infecção com *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo constituído principalmente por macrófagos. Vários estudos clínicos e experimentais sugerem que macrófagos ativado pelos linfócitos T têm papel fundamental na resistência a esse fungo. Nos granulomas, as células T, que se localizam periféricamente, formam um manto ao redor dos macrófagos que estão agregados no centro. A relação das células apresentadoras de antígenos com linfócitos resultam na liberação de fatores estimuladores de célula T, como interleucina 2 (IL-2). Estes linfócitos ativados secretam IL-2 e IFN- γ que atraem, e ativam os macrófagos nos focos inflamatórios. Além disso, a diferenciação dos macrófagos em células epitelióides nos granulomas, também é estimulada por IL-2 e IFN- γ [100–103].

O papel de proteção da resposta imune humoral na paracoccidioidomicose é controverso. Embora possa facilitar a opsonização de fungos e mediar sua lise via complemento em soro de pacientes com a doença ativa [104] a superprodução de anticorpos em pacientes com PCM reflete na desregulação do balanço da resposta humoral, sendo relacionada com um mau prognóstico da doença. A produção de anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA é induzida pela infecção por *P.brasiliensis* [105,106]. Com a disseminação da doença, observa-se a ativação policlonal de células B (com produção de altos níveis de anticorpos das classes IgG, IgE e IgA) e resposta imune celular comprometida [107]. O alto nível de anticorpos nestes

casos deve-se à multiplicação e à disseminação das leveduras no interior de fagócitos [108].

Imunopatologia da cromoblastomicose e resposta inflamatória

Devido à persistência do fungo no tecido e a cronicidade das lesões, a ativação do sistema imunológico do hospedeiro apresenta grande relevância nessa micose. A virulência, viabilidade e quantidade de inóculo do parasita, além dos fatores relacionados ao hospedeiro como idade e condições imunológicas são fatores determinantes do curso da infecção. Os mecanismos de defesa influenciam no surgimento e na severidade das infecções fúngicas, assim como a forma clínica da doença depende da resposta imune do hospedeiro [38,66].

A reação granulomatosa, característica das lesões na CBM, associada com abscessos ricos em neutrófilos, demonstra a incapacidade das células fagocíticas em eliminar completamente o fungo. Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do hospedeiro seguido por macrófagos ativados, às vezes na forma de células epitelióides e/ou células multinucleadas gigantes [109]. Tais fagócitos destroem as células fúngicas pela produção de reativos intermediários do oxigênio, produção de mieloperoxidase ou outros componentes secretados por essas células, atuando de forma fungistática, embora haja evidências de que estruturas do fungo (como a melanina) possam modular negativamente a capacidade do macrófago em eliminar o fungo *in vitro* [110–112]. Além da ação de fagocitose, essas células podem desempenhar a função de células apresentadoras de antígeno aos linfócitos T, estimulando a produção de interferon gama (IFN- γ) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como participando da formação da resposta inflamatória granulomatosa [113].

Estudos envolvendo componentes de parede do *F. pedrosoi* e de outros agentes da CBM ainda são insipientes, contudo, já foi descrito na literatura que moléculas como as β -glucanas presentes na parede celular do fungo estimulam a resposta dos *TLRs* indicando que tal mecanismo esteja envolvido na resposta imune inata contra a CBM [114]. β -glucanas estão também envolvidas na ativação da capacidade fungicida de neutrófilos, ao se ligarem à dectina-1, tendo sido recentemente associadas ao controle de infecções fúngicas [115,116].

De forma análoga, estruturas semelhantes à manose, dentre outros componentes da parede do fungo como a fração F1 (constituída basicamente de quitina e β -1,3-glucana), são capazes de auxiliar o hospedeiro no controle da cromoblastomicose [117,118]. De Medeiros Nobrega e colaboradores (2010) mostraram que a fração F1 do *F. pedrosoi* é capaz de estimular a produção de IL-12, estando relacionada com a ativação da resposta imune protetora no combate ao fungo [118].

Os mecanismos da imunidade adaptativa na CBM incluem tanto a resposta imune mediada por linfócitos Th1 quanto Th2. Em pacientes com a doença, ocorre a produção de anticorpos específicos (IgG1, IgM e IgA), identificados tanto por ELISA quanto por *immunoblotting* [119,120]. Assim como em outras doenças crônicas, causadas por infecções fúngicas, a resposta Th2 não parece desempenhar papel protetor quando comparada com a imunidade mediada Th1 [16]. Gimenes e colaboradores (2005) demonstraram que, em pacientes com a forma severa da CBM, ocorre a produção, preponderante, de IL-10 e baixos níveis de IFN- γ , acompanhadas de proliferação celular (de células T) ineficiente (características da resposta do tipo Th2) [121]. De forma contrária, em pacientes com a forma branda, há intensa produção de IFN- γ , baixos níveis de IL-10 e proliferação celular eficiente (típico de resposta do tipo Th1). Estudos em camundongos atímicos, infectados com *F. pedrosoi*, mostraram que,

durante a infecção, os granulomas tornavam-se difusos e confluentes com distribuição aleatória do fungo, reforçando o papel da resposta imune celular na CBM [122].

A resposta imune do hospedeiro também interfere com o tipo de lesão predominante da doença. Na forma verrucosa, há a prevalência de citocinas do padrão Th2, com a presença de reação granulomatosa supurativa. Já na forma eritematosa há a ocorrência de granulomas tuberculóides bem formados, associados à produção de citocinas do padrão Th1 [16,52].

Estudos recentes identificaram, por meio de imunohistoquímica, uma participação maciça de linfócitos T secretores de IL-17 em infiltrados inflamatórios de lesão de pacientes com CBM, ao passo que poucas células expressando o fenótipo regulatório foram observadas [123]. Expansão de células Th17 também foi observada em linfonodos de camundongos infectados com conídios de *F. pedrosoi*, tendo sido relacionada com o reconhecimento do fungo pelos receptores dectina-1 e dectina-2 [124]. Todavia, camundongos infectados com conídios foram incapazes de induzir produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α após 7 dias de infecção, de modo que essa só é reestabelecida após a co-estimulação com agonistas de TLRs [125].

O processo inflamatório é a resposta imediata do organismo a danos teciduais e infecção por patógenos. O processo inflamatório possui basicamente duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por febre, dor e edema, enquanto que a fase crônica é caracterizada por proliferação celular. A inflamação aguda, com duração relativamente curta, apresenta eventos vasculares como exsudação plasmática e migração de neutrófilos, sendo mediada pela liberação de mediadores químicos além de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Infiltrado leucocitário na região podem remover o estímulo e iniciar o processo de reparação tecidual [126,127]. A inflamação

crônica apresenta duração mais longa e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e necrose tecidual [127]. A inflamação crônica pode estar associada à desregulação de resposta inflamatória ativa, com lesão tecidual. Inflamação persistente está associada com várias condições crônicas em humanos, incluindo alergias, aterosclerosis, câncer, artrite e doenças autoimunes [126].

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos irritativos, vasculares, exsudativos e celulares. Alguns autacóides como a histamina e a serotonina, considerados mediadores de ação rápida, e a plasmina, bradicinina, prostaglandina, tromboxano e leucotrieno, mediadores de ação prolongada, agem promovendo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, enquanto que quimiocinas, selectinas e integrinas participam do processo de migração celular dos leucócitos para o local da inflamação [128].

Muito embora a inflamação nos estágios iniciais do processo de infecção se mostre benéfica e eficiente em sua contenção, uma resposta inflamatória exacerbada pode ser perniciosa e eventualmente se opor à erradicação do agente infeccioso. Ao menos em casos clínicos específicos, a cronicidade da doença pode ser resultado de uma resposta inflamatória exagerada a qual provavelmente compromete a habilidade do hospedeiros em lidar com o agente infeccioso, não se tratando de uma suscetibilidade intrínseca do hospedeiro frente a infecção [67].

Embora os modelos experimentais utilizando conídios de *F. pedrosoi* descritos acima contribuam sobremaneira no entendimento da interação parasito - hospedeiro na CBM, esses não são capazes de elucidar completamente a patogenia da doença deixando uma lacuna em sua compreensão, principalmente no que diz respeito à

resposta inflamatória crônica característica da CBM observada em humanos [2,16,34,129].

Considerando a crescente incidência de micoses sistêmicas e oportunistas no mundo inteiro, principalmente em pacientes imunossuprimidos, cada vez mais se tornam necessárias novas pesquisas no intuito de ampliar o conhecimento existente sobre a interação parasito-hospedeiro e, conseqüentemente, sobre a imunopatologia das micoses. Assim, e considerando, ainda, que a maioria dos estudos relacionados à CBM é realizada em pacientes com a doença já estabelecida, este trabalho foi executado visando ampliar as informações existentes acerca da patogenia da doença.

Objetivos

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo geral de elucidar a interação parasito-hospedeiro na CBM murina e seu impacto na imunopatologia da doença. Para tal, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- i. compreender o papel das diferentes formas do fungo no desenvolvimento da CBM experimental;
- ii. analisar a interação parasito-hospedeiro das diferentes formas do fungo e fagócitos murinos, bem como o seu impacto na imunopatologia da doença;
- iii. identificar e avaliar a participação das subpopulações de linfócitos T CD4+ na CBM murina e sua relevância para o processo de remissão da doença, observada no modelo experimental.

Para melhor compreensão do presente trabalho, este foi dividido em três capítulos, de modo a abranger cada um dos tópicos elencados acima.

Capítulo I

Análise do desenvolvimento da CBM murina após infecção com diferentes formas do fungo *F. pedrosoi*.

No presente capítulo será avaliada, por meio de análises morfométricas, quantificação de unidades formadoras de colônia, quantificação de citocinas e análises histopatológicas, a capacidade das diferentes formas do fungo *F. pedrosoi* (conídios, hifas e células muriformes) em desenvolver a CBM murina com lesões semelhantes àsquelas observadas em humanos com a doença.

1.1 Materiais e Métodos

1.1.1 Cultivo e isolamento das formas fúngicas de *F. pedrosoi*

Colônias de *F. pedrosoi* (ATCC 46428) foram mantidas inicialmente a 37° C, em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA, Himedia) contendo 100mg/mL de Cloranfenicol. Com o objetivo de maximizar a produção de conídios, fragmentos de hifas oriundos do meio SDA, foram cultivados em meio Batata Dextrose (BD, 10% batata e 1% dextrose) por sete dias.

No intuito de aumentar a virulência do fungo e adaptar a cepa às condições de sobrevivência em animal, o cultivo de *F. pedrosoi* (ATCC 46428) em BD, foi inoculado no coxim plantar dos animais de experimentação sob a concentração de 2×10^7 células/mL (50µl por pata). Após 15 dias de infecção, o tecido lesionado foi divulsionado e o fungo foi recuperado em meio SDA (Himedia), contendo 100mg/mL de cloranfenicol. Esse procedimento foi repetido por duas vezes.

Para a obtenção de conídios e hifas purificadas, foram utilizados propágulos virulentos do fungo *F. pedrosoi*, cultivados em meio BD, a 37° C, sob rotação de 180 rpm. Após 7 a 14 dias de cultivo, a suspensão do fungo contendo fragmentos de hifas e conídios foi inicialmente filtrada em lã de vidro estéril para remover grumos maiores. Em seguida, a suspensão foi submetida à filtração em *cell strainer* (BD) de 70µm, seguido de filtração em *cell strainer* de 40 µm. Fragmentos de hifas retidas no *cell strainer* de 40 µm (medindo cerca de 40 a 70 µm) foram ressuspensos em tampão salino fosfato (PBS) e centrifugados duas vezes a 1000g, proporcionando uma suspensão de fragmentos de hifas com mais de 98% de pureza (**Figura 5, B**).

A suspensão de células fúngicas contendo conídios e fragmentos de hifas menores que 40 μm foi submetida à filtração em membrana de celulose com porosidade de 14 μm (J Prolab) e em seguida centrifugada duas vezes a uma velocidade de 3000g e ressuspensa em PBS, proporcionando suspensão de conídios com no mínimo 98% de pureza (**Figura 5, A**). Os propágulos para inoculação nos animais de experimentação foram preparados misturando-se fragmentos de hifas e conídios purificados, na proporção de 3:1 (**Figura 5, D**).

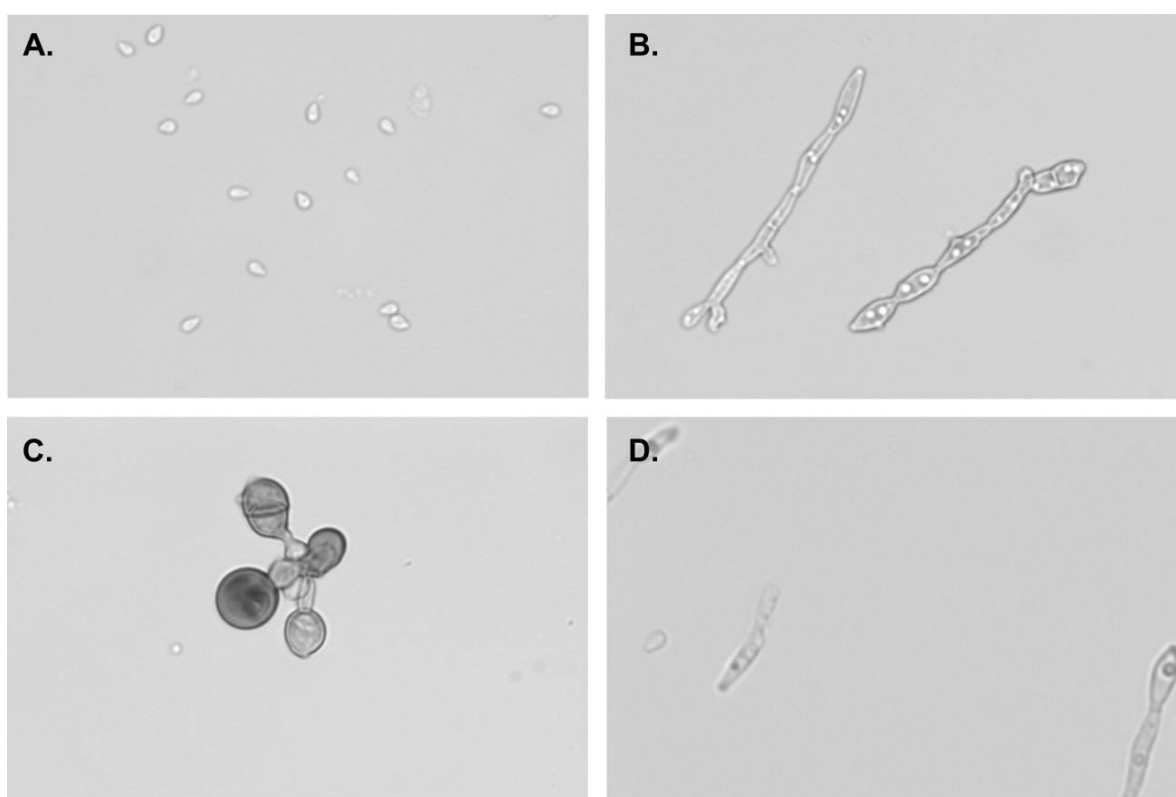


Figura 5. Microscopia ótica das formas do fungo *F. pedrosoi* purificadas. Conídios (**A**) e fragmentos de hifas (**B**) cultivados em meio BD, pobre em nutrientes. Células muriformes cultivadas em meio Butterfield suplementado com propranolol (**C**). Propágulo fúngico constituído por fragmentos de hifas e conídios (**D**). Aumento de 400x (**A-D**).

As células muriformes, por sua vez, foram obtidas por meio de cultura de propágulos do fungo *F. pedrosoi* em meio quimicamente definido Butterfield (BF), suplementado com propranolol a 37°C, pH 2,7 sob 150 rpm, conforme previamente

descrito [130]. Após 45 dias de cultura, células muriformes foram coletadas e lavadas três vezes com PBS, seguidas de centrifugação a 1000g. A suspensão contendo células muriformes foi então filtrada com o auxílio de *cell strainer* de 40µm, proporcionando células muriformes com mais de 90% de pureza (**Figura 5, C**).

1.1.2 Preparação do inóculo e infecção

Os conídios, fragmentos de hifas, células muriformes e propágulos (fragmentos de hifas + conídios na proporção de 3:1) do fungo *F. pedrosoi* foram quantificados em câmara de Neubauer e, em seguida, ajustados em uma suspensão contendo 2×10^7 células viáveis/mL em PBS estéril. A viabilidade das células foi determinada utilizando o corante azul de algodão (*Lactophenol cotton blue staining*) [131].

Os animais de experimentação foram então infectados com o inóculo de *F. pedrosoi* no coxim plantar, de forma que cada pata foi inoculada com 50µL contendo 1×10^6 conídios, fragmento de hifas, células muriformes ou propágulos do fungo.

1.1.3 Animais de experimentação e *design* experimental

Camundongos da linhagem BALB/cⁱ, machos, de 6 a 8 semanas de idade foram adquiridos da Universidade de São Paulo (USP) e mantidos em condições apropriadas, com fornecimento de água e ração *ad libitum*, no biotério da Faculdade de Medicina da UnB.

ⁱ Ensaios prévios do grupo mostraram que camundongos da linhagem BALB/c são capazes de desenvolver CBM experimental após inoculação com propágulos do fungo *F. pedrosoi*. As lesões desenvolvidas nesses animais são semelhantes às observadas em pacientes com a doença.

Além do grupo de animais saudáveis, os animais foram divididos em outros quatro grupos experimentais, contando com 32^j animais por grupo:

- I. animais infectados com conídios;
- II. animais infectados com fragmentos de hifas;
- III. animais infectados com células muriformes;
- IV. animais infectados com propágulos (contendo fragmentos de hifas e conídios na proporção de 3:1).

A cada três dias, o diâmetro da área acometida com a infecção foi mensurado com o auxílio de um paquímetro, de modo que após 3, 15, 30 e 45 dias de infecção, os animais de cada grupo foram eutanasiados por exposição prolongada ao CO₂, seguidos da excisão cirúrgica do coxim plantar para análises posteriores de histopatologia, quantificação de unidades formadoras de colônia (CFU) e quantificação de citocinas (**Figura 6**).

Todos os procedimentos realizados no presente trabalho estão de acordo com os aceitos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram analisados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (**Anexo 1**).

1.1.4 Histopatologia

Fragmentos da área lesionada foram fixados em formol tamponado a 10%, incluídos em parafina e os cortes consecutivos de 4 µm foram obtidos para as análises histopatológicas. Para a análise das lesões, os cortes foram corados primariamente: i) pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para a identificação dos tecidos de granulação,

^j 32 animais por grupo representa a soma de dois ensaios independentes os quais contaram com 16 animais por grupo.

ii) seguidos de coloração pela técnica do Tricrômio de Masson para a identificação de colágeno.

1.1.5 Quantificação de formas fúngicas na lesão e recuperação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Para a quantificação de células fúngicas na lesão, os cortes histológicos descritos acima foram analisados em microscópio óptico e, com o auxílio de um retículo acoplado à ocular, foi possível determinar a concentração das formas do fungo *F. pedrosoi* por mm² de lesão. Foram analisados 3 cortes histológicos por grupo e vinte campos escolhidos aleatoriamente. Para a obtenção da concentração por mm² de lesão, foi utilizada a seguinte fórmula: $C=Ct/0,0625$, onde C representa a contagem em mm², Ct a contagem obtida no retículo e 0,0625 o fator de conversão para a objetiva de 100x.

Para a recuperação das unidades formadoras de colônia presentes na lesão, fragmentos do tecido das patas foram pesados, divulsionados em 1 mL de PBS estéril e plaqueados em placas de Petri contendo meio SDA, seguidos de incubação a 37 °C, por 7 dias. Foram contadas as unidades formadoras de colônias em todas as placas e os resultados foram expressos em UFC por grama de lesão ± desvio padrão da média (SEM).

1.1.6 Quantificação de citocinas no macerado de lesão

A quantificação de IL-1 β , IL-6, TNF α e MCP-1 presentes no macerado da lesão foi realizada pelo método imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ELISA), utilizando-se o kit Ready-Set-Go da empresa eBioscience e conforme os procedimentos estabelecidos pelo fabricante. O nível absoluto de citocinas presentes no

macerado de lesão foi calculado com base na curva padrão fornecida com o *kit* comercial.

1.1.7 Análise estatística

Os resultados foram obtidos considerando a soma de dois experimentos independentes \pm desvio padrão da média (SEM), de forma que em ambos os experimentos os dados foram similares. Para determinar as diferenças entre os grupos experimentais foi utilizado o teste t, para comparação entre duas populações, ou análise da variância (ANOVA), seguida pelo método *Bonferroni post-tests* (pós teste), realizado no programa estatístico GraphPad Prism, versão 6.0, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

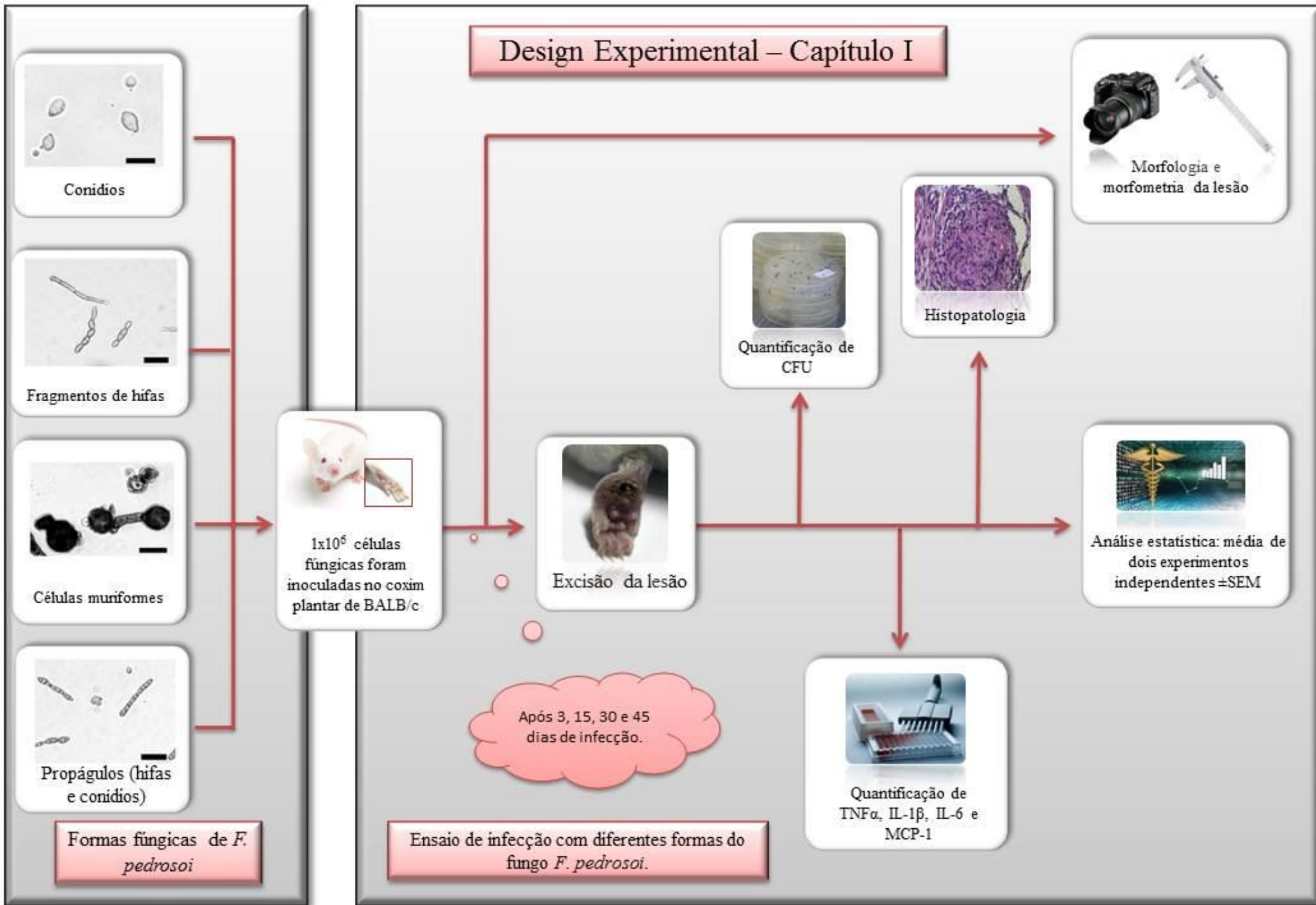


Figura 6. Esquemática dos experimentos realizados no âmbito do Capítulo I.

1.2 Resultados e Discussão

1.2.1 Infecção com diferentes formas do fungo *F. pedrosoi* acarreta em manifestações distintas da CBM

Embora a CBM tenha sido descrita pela primeira vez no início do século XX, ainda hoje persistem dúvidas acerca de sua patogenia. Ainda não há consenso, por exemplo, acerca de qual forma fúngica (conídios, hifas ou células muriformes) consegue de fato penetrar a barreira física da pele e seria responsável por desencadear a doença [132]. Em 2004, foi demonstrada a presença de hifas e conídios de *F. pedrosoi* em espinhos de *Mimosa pudica*, tendo sido correlacionada com o desenvolvimento da doença em pacientes [47]. Foi observado, ainda, células muriformes no interior desses espinhos, com aspectos semelhantes ao observado em cortes histológicos.

Já foi descrito que, para diversos fungos, diferentes formas fúngicas têm sido associadas com diferentes padrões de resposta imune, de modo que a habilidade de existir em diferentes formas ou de alterná-las durante o processo de infecção representa um importante fator de virulência, favorecendo a sobrevivência do fungo e sua persistência no hospedeiro [66,133,134]. Visando avaliar o papel de cada uma das formas do fungo *F. pedrosoi* na patogenia da CBM, camundongos da linhagem BALB/c foram infectados em cada coxim plantar com 1×10^6 conídios ou fragmentos de hifas ou células muriformes. Infecção com propágulos do fungo, constituídos por fragmentos de hifas e conídios na proporção de 3:1, foi empregada como controle, uma vez comprovada a sua eficácia no estabelecimento da CBM experimental [65]. Aspectos clínicos da doença foram avaliados por meio de análise morfométrica, a cada três dias, e por análises histopatológicas após 3, 15, 30 e 45 dias de infecção.

Após 6 dias de infecção, todos os animais infectados mostraram a presença de processo inflamatório agudo no local de inoculação, com formação de edema, sendo esse de menor intensidade naqueles inoculados com conídios (**Figura 7, A**). Após esse período, e ao contrário daqueles infectados com hifas, células muriformes ou propágulos, animais inoculados com conídios apresentaram redução significativa do edema formado (**Figura 7, A-B**). Após 15 dias, a exceção do grupo infectado com conídios, foram observadas lesões ulcerativas no coxim plantar dos demais animais, semelhantes às observadas em humanos (**Figura 7, B**). Transcorridos 30 dias de infecção, evidencia-se progressiva redução das lesões formadas nos animais infectados com hifas, células muriformes e propágulos, não sendo mais detectado qualquer edema em animais infectados com conídios (**Figura 7, B**). Após 45 dias, apenas os animais infectados com células muriformes ainda exibiam a presença de edema, em contraste com os demais grupos que apresentaram coxim plantar semelhante ao encontrado em animais não infectados (**Figura 7, A-B**).

A análise histopatológica mostrou-se consistente com os dados morfométricos descritos acima, com intenso infiltrado inflamatório neutrofílico e histiocitário nos primeiros 3 dias de infecção. Inoculação com hifas, células muriformes e propágulos, mas não com conídios, exibiram, após 15 dias, ulceração de áreas exsudativas, com a presença de material necrótico e células fúngicas, bem como infiltrado linfocítico multifocal delineando um aspecto de lesão granulomatosa. Após 30 dias de infecção, intenso processo de reparação tecidual pôde ser observado em animais infectados com conídios, sendo essa mesma característica evidente apenas após 45 dias em animais infectados com hifas e propágulos, os quais exibiram proliferação de fibroblastos e intensa deposição de colágeno. Após 45 dias, apenas animais infectados com células muriformes ainda exibiam áreas exsudativas (**Figura 8, B**).

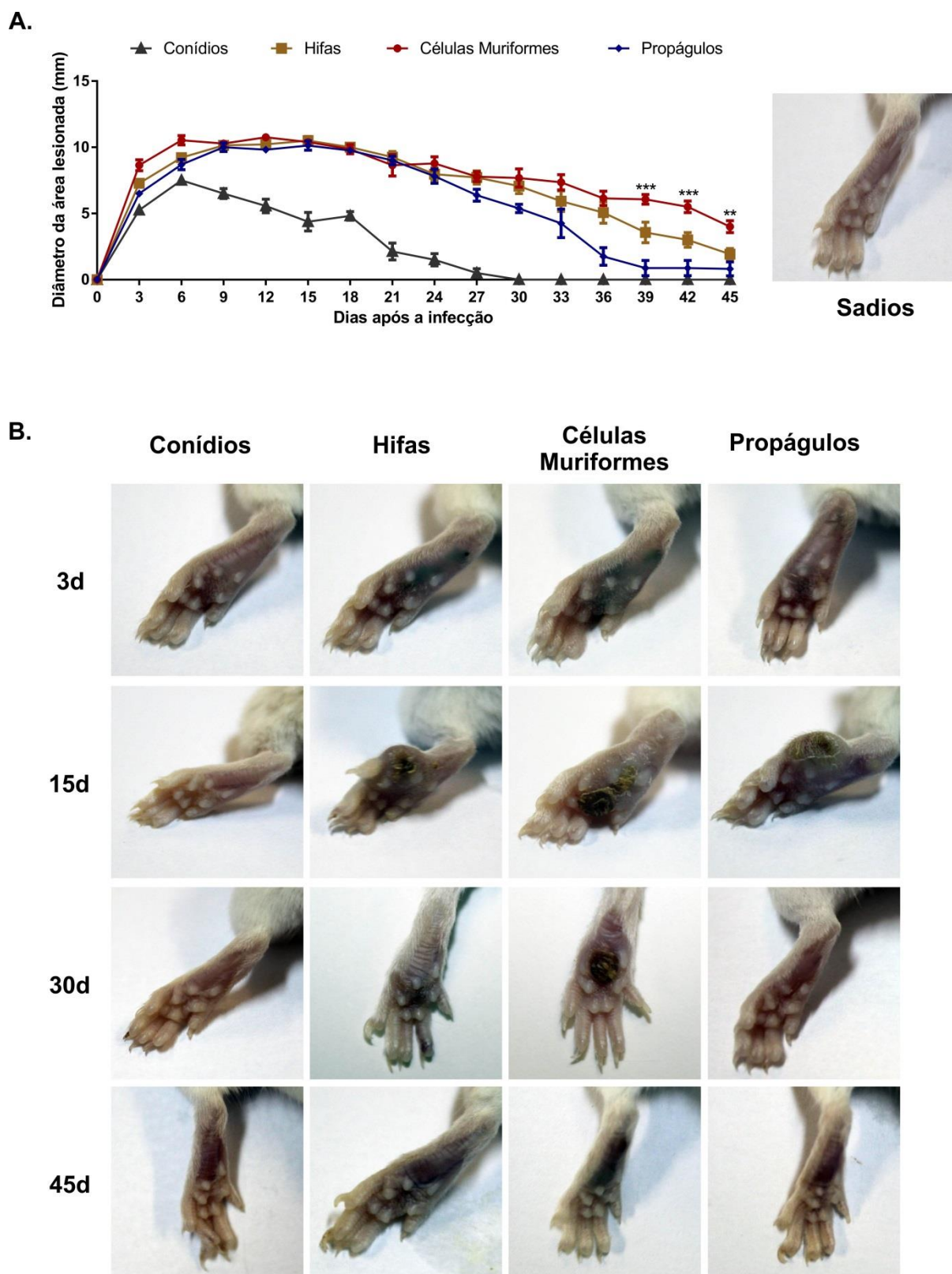
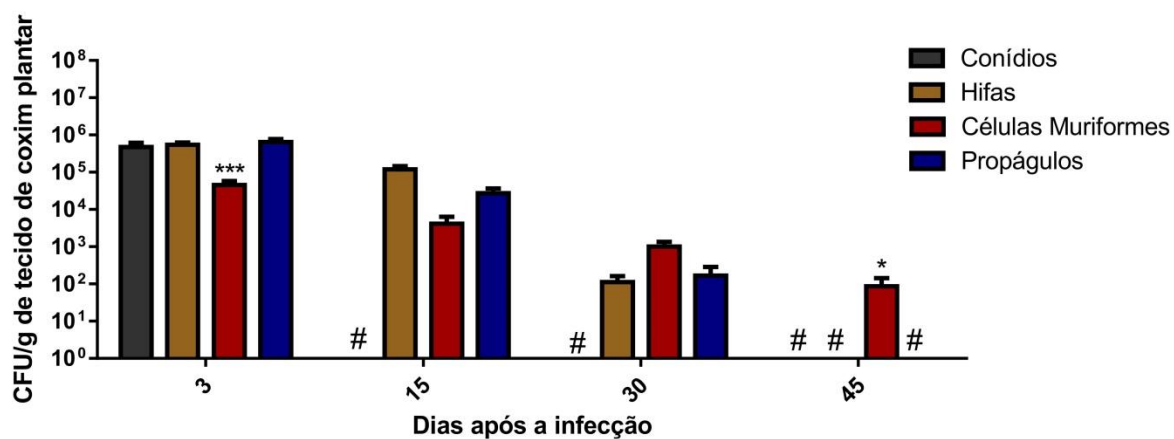


Figura 7. Progressão da CBM murina induzida por diferentes formas do fungo *F. pedrosoi*. Análise morfométrica a cada três dias (A) e fotografia (B) das patas dos camundongos infectados com conídios, fragmentos de hifas, células muriformes ou propágulos, após 3, 15, 30 e 45 dias de infecção. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo infectado com propágulos.

A.



B.

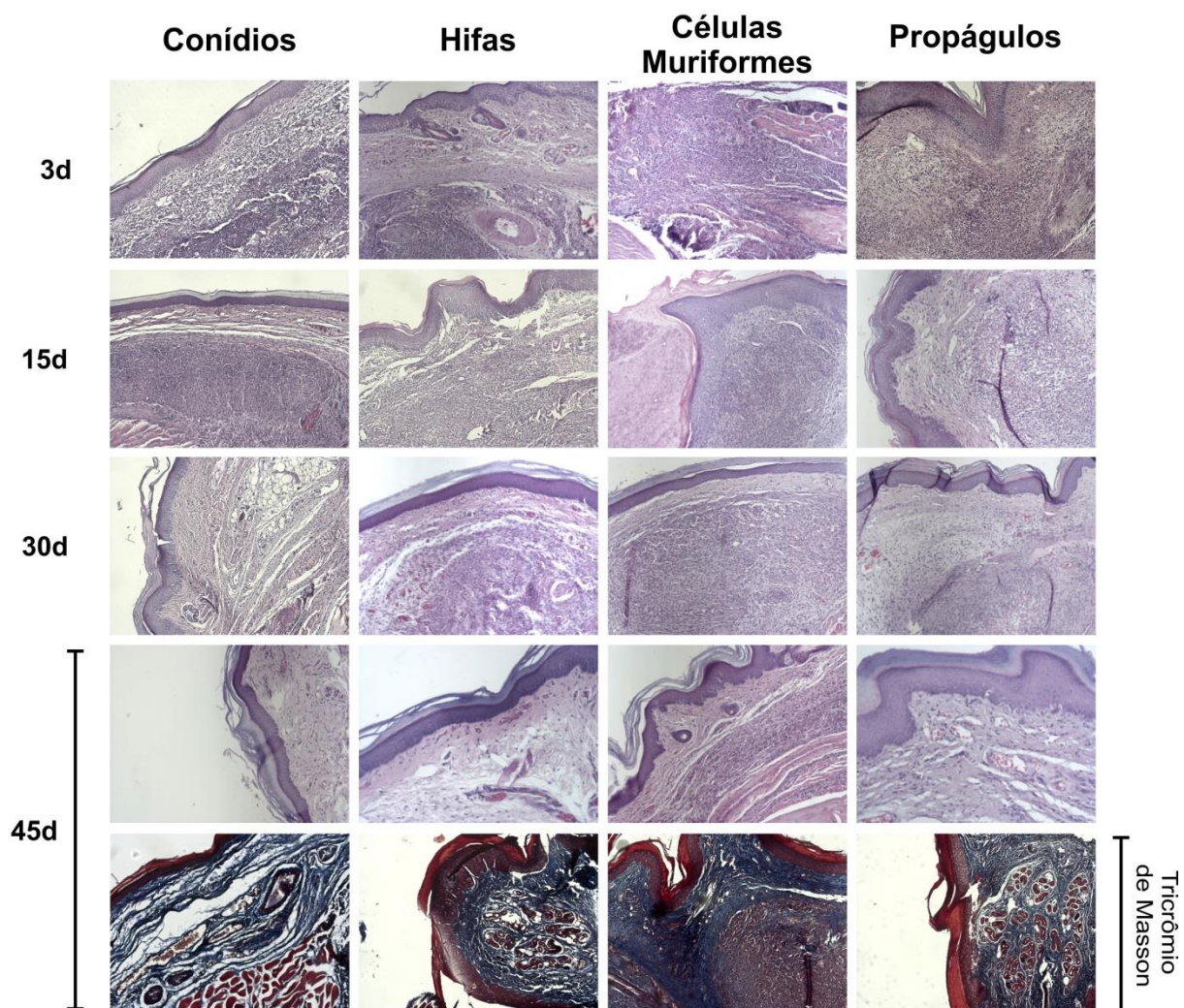


Figura 8. Quantificação de unidades formadoras de colônia - CFU (A) e cortes histopatológicos (B) após 3, 15, 30 e 45 dias de infecção com conídios, fragmentos de hifas, células muriformes ou propágulos. Aumento de 100x (B) e coloração HE ou tricrômio de masson quando indicado. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ em comparação com o grupo infectado com propágulos.

Em suma, no presente modelo utilizando camundongos BALB/c, a infecção com 1×10^6 conídios não foi capaz de induzir lesões ou processo inflamatório crônico. Tal resultado é consistente com o descrito na literatura, onde modelos análogos utilizando conídios do fungo *F. pedrosoi* também não foram capazes de estabelecer por si só a CBM experimental [135]. Por outro lado, infecção com hifas e células muriformes foi capaz de estabelecer lesões semelhantes às aquelas observadas em humanos, as quais cursam com resposta inflamatória crônica característica, muito embora tendam ao processo de remissão após 45 dias de infecção.

Importante salientar que a falha no estabelecimento da CBM murina em animais infectados com conídios não decorre necessariamente de uma incapacidade intrínseca dessas células em estabelecer a infecção e sim da habilidade do hospedeiro murino em eliminar essas células na fase inicial do processo infeccioso.

1.2.2 Infecção com células muriformes promove o estabelecimento de CBM murina mais duradoura em comparação à infecção com as demais formas fúngicas.

A evolução da doença nos animais infectados com diferentes formas do fungo *F. pedrosoi* foi também avaliada pela recuperação e quantificação das unidades formadoras de colônia presentes na lesão, mostrando redução progressiva da carga fúngica no tecido ao longo do tempo (**Figura 8, A**).

Ao contrário da infecção com hifas ou propágulos, na inoculação com células muriformes foi observado um menor número de CFU nos tempos iniciais, o que pode ser explicado por uma menor capacidade proliferativa dessas células em comparação às demais. Entretanto, após 45 dias de infecção apenas animais infectados com células muriformes ainda apresentaram CFU em níveis detectáveis (**Figura 8, A**).

Células muriformes são tidas como estruturas fúngicas extremamente resistentes aos mecanismos efetores da imunidade inata e adaptativa, não apenas por sua espessa parede celular, mas também pela intensa deposição de melanina em sua parede, já descrita como potente inibidora de intermediários reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico [112].

Na infecção com conídios, por sua vez, já não foi possível detectar CFU após 15 dias de infecção, indicando que tais células não foram capazes de resistir à resposta inflamatória aguda estabelecida pelo hospedeiro nos estágios iniciais de infecção (**Figura 8, A**).

Analisando os resultados de CFU em conjunto com os dados de morfometria e histopatologia, é possível concluir, ainda, que a infecção com células muriformes é capaz de desenvolver CBM murina mais duradoura em comparação à infecção com as demais formas fúngicas.

1.2.3 Presença de hifas e, principalmente, de células muriformes na lesão, mas não de conídios, está relacionada com a alta produção de citocinas pro-inflamatórias durante o estabelecimento da CBM experimental.

Uma vez instalado no tecido, o fungo adere-se às células epiteliais e diferencia-se em células muriformes, as quais resistem à destruição pelas células efectoras do hospedeiro, permitindo assim a progressão da infecção [16,44].

Ao contrário do descrito por Machado e colaboradores (2011) [135], quantificação das formas do fungo nas lesões mostrou que tanto conídios quanto hifas são capazes de se transformarem-se em células muriformes (**Figura 9, A-B, setas vermelhas**). Mais ainda, foi possível observar germinação de células muriformes

gerando hifas no tecido (**Figura 9, C, setas marrons**). A presença concomitante de células muriformes com hifas e conídios do fungo já foi descrita anteriormente em lesões de pacientes com a doença [51] e torna mais complexa a compreensão de sua imunopatologia, uma vez que o hospedeiro precisa responder de maneira adequada a todas as formas do fungo presentes na infecção.

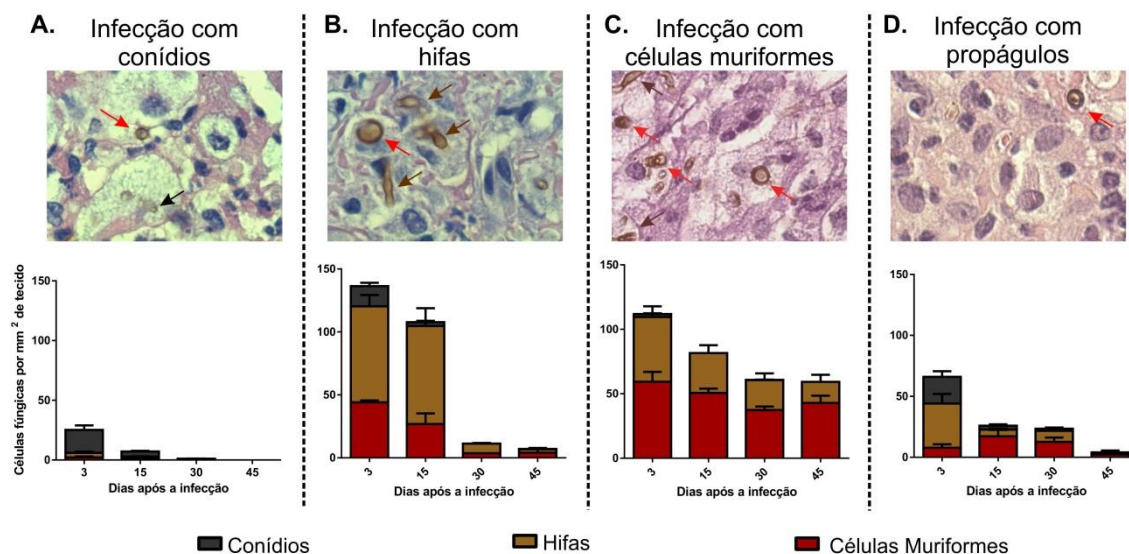


Figura 9. Quantificação das formas do fungo nas lesões após infecção com conídios (A), fragmentos de hifas (B), células muriformes (C) ou propágulos de *F. pedrosoi* (D). A presença de conídios (seta preta), hifas (setas marrons) e células muriformes (setas vermelhas) foram quantificadas em 20 campos escolhidos aleatoriamente, com o auxílio de um retículo, e em três cortes distintos. O resultado está expresso em células fúngicas por mm² de tecido.

Embora alguns poucos conídios tenham se transformado em células muriformes (**Figura 9, A, seta vermelha**), a infecção com conídios induziu níveis significativamente menores de citocinas pro-inflamatórias quando comparada com a infecção com as demais formas do fungo (Figura 10). Ensaios *in vivo*, após 7 dias de infecção, e *ex vivo* utilizando APC e conídios do fungo *F. pedrosoi* mostraram que essas células são reconhecidas principalmente por receptores lectina tipo C (CLRs), mas não

por TLRs, o que resulta na baixa indução de citocinas pró-inflamatórias. A resposta inflamatória só foi reestabelecida após co-estimulação com agonistas de TLR como LPS e Pam₃CSK₄^k [125]. Tal falha no reconhecimento do fungo pelas células da imunidade inata foi correlacionada, pelos autores do trabalho, com a cronicidade da doença.

Ocorre que a CBM humana é caracterizada justamente pela resposta inflamatória crônica acentuada em lesões supurativas granulomatosas [2,16,34,129]. Nesse sentido, os dados descritos no trabalho acima, utilizando modelo de infecção com conídios, não podem ser extrapolados para a doença como um todo, pois diverge do observado em humanos com a doença.

Por outro lado, infecções com fragmentos de hifas e células muriformes induziram altos níveis de TNF- α (**Figura 10, A**), IL-1 β (**Figura 10, B**), IL-6 (**Figura 10, C**) e MCP-1 (**Figura 10, D**) durante a fase de estabelecimento da doença (até 15 dias de infecção), sendo observada redução somente após 30 dias, considerada a fase de remissão da doença para o presente modelo murino. Apenas animais infectados com células muriformes mostraram níveis significativamente altos de IL-1 β nesse período (**Figura 10, B**).

^k Pam₃CSK₄ é um lipopeptídeo sintético, agonista dos receptores TLR1 e TLR2, atuando como potente ativador do fator de transcrição de mediadores pró-inflamatório, o NF- κ B.

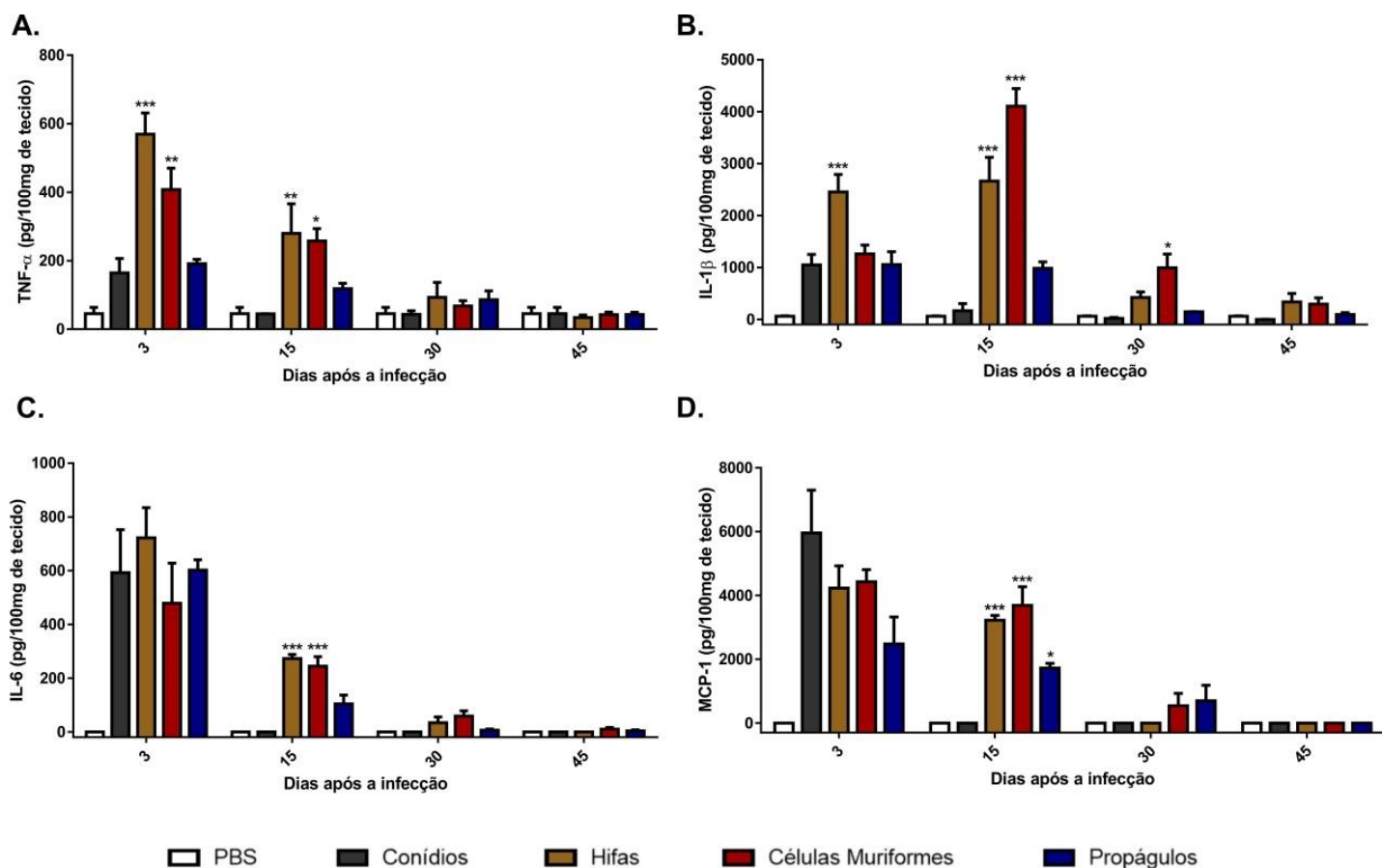


Figura 10. Quantificação de citocinas no curso da CBM murina após infecção com conídios, hifas, células muriformes ou propágulos do fungo *F. pedrosoi*. Após 15 dias de infecção, altos níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and MCP-1 (D) foram observados e, lesões dos grupos infectados com hifas e células muriformes. A produção de citocina foi quantificada por ELISA a partir do homogeneizado da lesão. O resultado foi expresso em pictogramas por 100mg de tecido * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao grupo infectado com conídios.

Em infecções tanto com hifas quanto com células muriformes, cortes histológicos mostraram uma maior presença de células muriformes após 15 dias de infecção, seguidos de hifas (Figura 9, B-C). Nesse mesmo período são observados lesões semelhantes às observadas em pacientes, além de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Figura 7, B e Figura 10). Em conjunto com o descrito na literatura [125], esses resultados demonstram que a presença de hifas e, principalmente, de células

muriformes na lesão, mas não de conídios, está correlacionada com uma produção intensa de citocinas pró-inflamatórias durante o estabelecimento da CBM experimental.

Visando confirmar os distintos perfis de ativação das células do hospedeiro, conforme interação com diferentes formas do fungo, ensaios *ex vivos* utilizando células APC foram realizados e serão apresentados no próximo capítulo.

Capítulo II

Análise *ex vivo* de interação entre as diferentes formas do fungo *F. pedrosoi* e fagócitos murinos, e seu impacto na imunopatologia da CBM.

Neste capítulo será avaliada a interação das diferentes formas do fungo *F. pedrosoi* com macrófagos recém migrados para o peritônio, além de células dendríticas e macrófagos derivados da medula óssea. Por meio de sequenciamento de alto desempenho do RNA, rtPCR em tempo real e ELISA, será analisado o perfil de ativação dos fagócitos murinos, correlacionando-o com a imunopatologia da doença.

2.1 Materiais e Métodos

2.1.1 Obtenção de macrófagos peritoniais.

Para a obtenção de macrófagos peritoniais, os animais de experimentação foram inoculados intraperitonealmente com 2 ml de tioglicolato (BD biosciences). Após 72 horas, esses foram eutanasiados por exposição prolongada ao CO₂ e os macrófagos recém-migrados para o peritônio foram coletados com o auxílio de uma seringa de 10ml, lavando-se a cavidade peritoneal com meio RPMI (Sigma-Aldrich) gelado. A suspensão de células obtida foi então centrifugada a 300g e ressuspensa em RPMI, suplementado com 2% de soro fetal bovino (Gibco – Thermo Fisher Scientific) e 80 µg/ml de gentamicina.

Os macrófagos foram quantificados em Câmara de Neubauer e a viabilidade foi aferida com azul de tripan. Em seguida, foram plaqueados na concentração de 5x10⁵ macrófagos por poço, em placa de 24 poços, e incubados a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, visando permitir a adesão dos macrófagos à placa de cultura.

2.1.2 Extração e sequenciamento de alto desempenho do RNA (*High Throughput RNA Sequencing, RNA-seq*)

Macrófagos recém-migrados para o peritônio foram co-cultivados com conídios ou células muriformes do fungo *F. pedrosoi* em placa de 6 poços, na concentração de 1:1. Após 6h de co-cultivo, os poços foram lavados com RPMI aquecido para a remoção de células fúngicas não fagocitadas ou fracamente aderidas aos fagócitos. Os macrófagos foram então lisados e o RNA extraído utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. O RNA obtido foi quantificado por fluorometria (Qubit) e submetido ao Bioanalyzer 2100 no intuito de verificar a sua integridade.

Fragmentos de 100pb de cDNA foram gerados e sequenciados no HiSeq 2000 (Illumina) junto ao *Scripps DNA Sequencing Facility*, Califórnia, EUA, conforme procedimento padrão estabelecido pelo fabricante. A análise da expressão diferencial de genes foi realizada pelo grupo de Bioinformática do Laboratório de Biologia Molecular da UnB, conforme descrito abaixo:

A verificação da qualidade dos *paired-end reads*^l foi procedida utilizando o FASTQC [136], de modo que o *clipping* e o *trimming*^m foram realizados por meio dos *softwares* CUTADAPT [137] e PRINSEQ [138], respectivamente. Em seguida, os *reads* foram alinhados ao genoma murino, obtido a partir do Ensembl database [139], utilizando o programa *open source* TopHat 2.0.9 [140]. Os arquivos com os dados alinhados foram organizados e indexados utilizando-se o Samtools [141], seguido da quantificação de *reads* por HTSeq-count [138]. A análise estatística foi feita usando o ambiente R para computação estatística [142]. Quantificação gênica foi realizada utilizando o pacote Bioconductor EdgeR [143]. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando *False Discovery Reads* (FDR) <0,05 e Fold Change (FC) > 1,4. *Hetmaps* dos genes diferencialmente expressos foram gerados utilizando-se o pacote Gplots. Genes considerados diferencialmente expressos foram, ainda, anotados utilizando o pacote org.Mm.eg.db [144] e organizados em vias metabólicas utilizando o pacote Pathview [145].

2.1.3 Validação por RT-PCR de genes diferencialmente expressos

A expressão diferencial de genes importantes no estabelecimento de processo inflamatório e na resposta imune aos fungos como Tnf, Il1b, Il6, Il12, Ccl2, Casp1,

^l Seguimentos pareados de leitura.

^m Seleção e processamento das sequencias brutas obtidas durante o sequenciamento, onde as leituras de baixa qualidade são excluídas por algoritmos, garantindo a qualidade e a confiabilidade da análise.

Nlrp3, Dectin1, Tlr2 e Tlr4ⁿ, foi validada por RT-PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção por SYBR Green^o.

Após tratamento com DNase I (Invitrogen), na presença de inibidor de RNase (Invitrogen), quantidades iguais de RNA (0,5 µg) foram transcritos de forma reversa (Superscript II, Invitrogen) utilizando oligo(dT)12-18 e submetidos a PCR em tempo real. Os ensaios de amplificação foram realizados no aparelho 7900HT Sequence Detection System ABI PRISM (Applied Biosystems) em reações de 12 µl contendo 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 6 µl de solução completa para PCR contendo SYBR Green (2X) (Applied Biosystems) e 0,2µl da reação síntese de cDNA como molde. Após a desnaturação inicial a 95°C por 10 min, as amplificações foram realizadas por 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

A fim de confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise da curva de desnaturação ou *melting curve*^p. O método de comparação do ciclo limiar (CT) ou *crossing threshold*^q [146], utilizando o gene constitutivo em macrófagos murinos Rps9 para normalização, foi empregado para a avaliação da variação da expressão (*fold-change*) de cada gene de interesse nos macrófagos infectados com conídios ou hifas, comparados com aqueles sem estímulo adicional.

ⁿ Por padrão, a nomenclatura dos genes de camundongos será descrita no presente trabalho com a primeira letra em maiúsculo e as demais em minúsculo.

^o Molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA.

^p Nessa curva, analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de dissociação ou *melting temperature* de cada fragmento de DNA presente na reação de amplificação. Cada fragmento de DNA amplificado possui um T_m específico, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes (específicos ou não).

^q O método de comparação do CT tem como base de cálculo a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ onde $\Delta\Delta CT = (\Delta CT_{\text{experimento}} - \Delta CT_{\text{controle}})$, sendo que $\Delta CT_{\text{experimento}} = CT_{\text{do gene de interesse no experimento}} - CT_{\text{do gene constitutivo no experimento}}$ e $\Delta CT_{\text{controle}} = CT_{\text{do gene de interesse no controle}} - CT_{\text{do gene constitutivo no controle}}$.

Todos os *primers* utilizados para RT-PCR em tempo real foram baseados em sequências obtidas a partir da base de dados do transcriptoma murino [147] e personalizados com Primer3, disponível online [148].

2.1.4 Obtenção de macrófagos e células dendríticas derivados da medula óssea (BMDM e BMDC).

A geração de macrófagos e células dendríticas derivados da medula óssea (*bone marrow derived macrophages* - BMDM e *bone marrow derived dendritic cells* - BMDC, respectivamente) foi realizada a partir da diferenciação de células tronco hematopoiéticas murinas conforme descrito previamente [149]. Para a extração das células precursoras da medula óssea, o interior de fêmures e tíbias dos animais de experimentação 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 300g durante 5 minutos e, após o descarte do sobrenadante, o precipitado celular foi submetido à ação de solução de lise de hemácias (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 (Gibco), além de fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos GM-CSF (eBioscience), β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e gentamicina. A suspensão foi colocada em placas de petri e acondicionada em estufa a 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 300g durante 5 minutos, de modo que o pellet formado foi ressuspendido 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 “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, as BMDMs e BMDCs foram ressuspensas em meio de experimentação (RPMI-1640 acrescido de 10 % de SFB) e colocadas em placas de cultura para repousar durante 24 horas. Após esse período, o meio foi renovado e deu-se início aos experimentos de co-cultura com formas do fungo *F. pedrosoi*.

2.1.5 Co-cultura de fagócitos com formas do fungo *F. pedrosoi* e índice de fagocitose.

Macrófagos peritoneais, BMDMs e BMDCs cultivados em placa de 24 poços foram infectados com conídios, fragmentos de hifas ou células muriformes de *F. pedrosoi*, vivo ou morto por exposição ao calor em temperatura de ebulição por 20 min (HK), na concentração de 1:1 e incubados por 6, 12, 24 e 48 horas em estufa à 37 °C, sob atmosfera de 5 % de CO₂. Como controle positivo foi utilizado 1 µg/ml LPS (*Escherichia coli* sorotipo 0111:B, Sigma-Aldrich) e 100 U/ml interferon-gama (IFN-γ, Sigma-Aldrich). Para a indução de IL-1β, foram utilizados 500 ng/ml de LPS e 5 mM de ATP (InvivoGen) individualmente, em conjunto ou em associação com as formas do fungo. O sobrenadante de cultura foi coletado e submetido à quantificação de citocinas, quimiocinas e nitrito.

A avaliação do índice de fagocitose foi realizada em co-cultura de macrófagos peritoneais com conídios ou células muriformes do fungo *F. pedrosoi* por 24 horas, com ou sem Fcblock (BD biosciences) ou laminarina (Invivogen), bloqueador do receptor FC e agonista de dectina-1, respectivamente. As células foram lavadas com meio RPMI para remover as células fúngicas não fagocitadas, fixadas com metanol absoluto e

coradas com solução de Giemsa tamponada a 20%. O número de células fúngicas aderidas e/ou fagocitadas a cada 200 macrófagos foi auferido com o uso de microscópio ótico, avaliando-se as amostras em triplicata. O índice de fagocitose foi calculado levando-se em consideração o número médio de células fúngicas ingeridas pelos macrófagos, multiplicado pela percentagem de macrófagos envolvidos no processo de fagocitose.

2.1.6 Quantificação de óxido nítrico, citocinas e quimiocinas em sobrenadante de cultura.

A concentração de NO_2 presente no sobrenadante de cultura foi utilizado como indicador da produção de NO e quantificado utilizando-se o reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato, 2.5% H_3PO_4) conforme descrito anteriormente [150]. Em síntese, 50 μl de reagent de Griess foi acrescentado em volume igual de sobrenadante de cultura e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em leitora de microplaca utilizando-se o comprimento de onda de 540 nm. A concentração final de NO_2 em cada amostra foi obtida com base em curva padrão de NO_2 .

A quantificação de IL-1 β , IL-6, TNF α e MCP-1 presentes no macerado da lesão foi realizada pelo método imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ELISA), utilizando-se o kit Ready-Set-Go da empresa eBioscience e conforme os procedimentos estabelecidos pelo fabricante. A quantificação de IL-12 foi obtida utilizando kit para Elisa disponibilizado pela empresa BD Biosciences. O nível absoluto de citocinas presentes no macerado de lesão foi calculado com base na curva padrão fornecida com o *kit* comercial.

2.1.7 Avaliação da CBM murina em modelo de inflamação crônica induzida por zimosan

Camundongos, BALB/c, machos, entre 6 e 8 semanas de idade foram infectados no coxim plantar com 1×10^6 propágulos do fungo *F. pedrosoi*, contendo fragmentos de hifas e conídios, conforme descrito na metodologia do Capítulo I. Após 15 dias de infecção, os animais foram tratados intralesionalmente (I.L.) no coxim plantar, a cada três dias, com 20 μ l da suspensão contendo 5 mg/ml de zimosan (ZYM) ou PBS, até 15 dias após o início do tratamento (d.p.t.)^r.

2.1.8 Análise estatística

Para os ensaios *ex vivo*, foram realizados ao menos três ensaios independentes, cada um em triplicata, de modo que os resultados mostram os dados representativos de todas as replicatas experimentais. Para determinar as diferenças entre os grupos experimentais foi utilizado o teste t, para comparação entre duas populações, ou análise da variância (ANOVA), seguida pelo método *Bonferroni post-tests* (pós teste), realizado no programa estatístico GraphPad Prism, versão 6.0, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

^r Modelo de inflamação induzida por zimosan encontra-se bem descrito na literatura como opção para o teste de medicamentos com potencial anti-inflamatório [178,179].

Design Experimental – Capítulo II



Formas fúngicas de *F. pedrosoi*



Ensaio *ex vivo*, de co-cultura de APC e formas do fungo *F. pedrosoi*.

6h de co-cultivo a 37°C

24 horas de co-cultivo

6, 12, 24 e 48h de co-cultivo a 37°C

Determinação dos genes diferentemente expressos. FDR < 0,05 e FC > 1,4

Extração de RNA

Índice de fagocitose

Quantificação de TNF α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 e IL-12



RT-PCR em tempo real de genes relevantes



Análise estatística: representativo de 3 experimentos em triplicata.

Figura 11. Esquematização dos experimentos *ex vivo* realizados no âmbito do Capítulo II.

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Células muriformes, ao contrário de conídios, promovem grande expressão diferencial de genes em macrófagos peritoniais

Considerando que diferentes formas do fungo *F. pedrosoi* são capazes de ativar padrões distintos de resposta inflamatória in vivo, ensaios *ex vivo* de co-cultura de APCs e células fúngicas foram realizados.

Macrófagos recém-migrados para o peritônio foram co-cultivados com conídios ou células muriformes do fungo *F. pedrosoi*, por 6 horas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, de modo que a expressão gênica dos macrófagos foi avaliada por RNA-Seq. Essa tecnologia permite o sequenciamento simultâneo de milhões de sequências de nucleotídeos [20-21], tornando possível, inclusive, a análise simultânea da expressão gênica tanto do parasita quanto do hospedeiro [153].

Foram identificados 11.479 genes na co-cultura de macrófagos com células muriformes de modo que 3.672 genes foram considerados diferencialmente expressos após aplicação dos filtros de FDR<0,05 e FC >1,4. Na interação com conídios, também foram identificados inicialmente 11.479 genes, todavia, somente 47 foram considerados diferencialmente expressos (**Figura 12, A**). Análise utilizando o Diagrama de Venn-Euler mostra a intersecção de 30 genes comuns em ambos os grupos de infecção, sendo que apenas 17 genes foram diferencialmente expressos exclusivamente na interação com conídios (**Figura 12, B**).

Em conjunto, os resultados apontam para uma baixa capacidade de ativação dos macrófagos pelos conídios em comparação com as células muriformes, as quais são capazes de alterar sobremaneira o perfil de expressão gênica dos macrófagos em cultura.

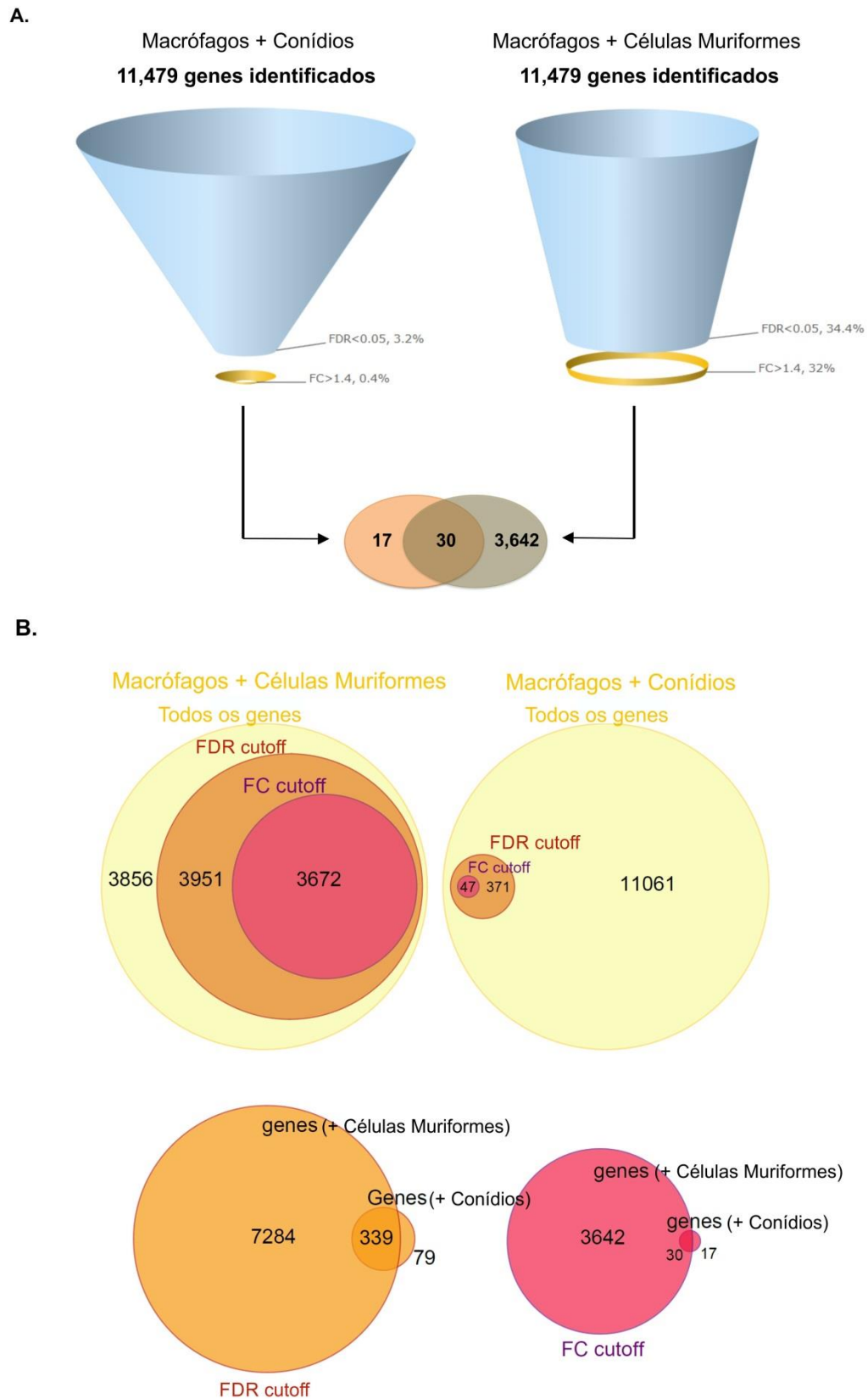


Figura 12. Identificação dos genes diferencialmente expressos. Gráfico em forma de funil (A) e diagrama de Venn Euler (B) exibindo genes diferencialmente expressos quando *False Discovery Reads* (FDR) < 0,05 e *Fold Change* (FC) > 1,4, respectivamente.

2.2.2 Interação com células muriformes, mas não com conídios, acarreta em intensa regulação positiva de genes relacionados com a resposta inflamatória

Após análise global dos genes diferencialmente expressos na interação com células muriformes é possível observar profunda alteração no perfil de expressão desses genes quando comparado ao controle não estimulado. Todavia, observando os mesmos genes na interação com conídios, esses se assemelham ao perfil de expressão de células não infectadas (**Figura 13, A**).

Avaliando-se a ontologia dos genes diferencialmente expressos na interação com conídios, identificam-se poucos genes relacionados com a resposta imune, de modo que esses estão regulados negativamente (**Figura 13, B**). De forma contrária, na interação com células muriformes é possível observar a expressão diferencial de vários genes relacionados com a resposta imune, especialmente aqueles envolvidos na resposta inflamatória, estando esses regulados positivamente (**Figura 13, C**). Dentre os genes diferencialmente expressos na interação com células muriformes, apenas aqueles relacionados com processos metabólicos possuem a maioria regulados negativamente (**Figura 13, C**).

Avaliando-se os genes diferencialmente expressos apenas na interação com conídios, observa-se que grande parte está associada com processos metabólicos da célula (Alox15, Apol9b, Bahcc1, Fam126b, Pdpr, Plac8, Plscr2, Rasgrf2, Rps13-ps2). Dentre os que participam da resposta imunológica, destacam-se: o gene H2-Ob, cujo produto participa da apresentação antigênica; e os genes Ifi441, Ifit1, Mx2, os quais codificam intermediários na via de sinalização mediada pelo interferon gama. Todos esses estão regulados negativamente. O heatmap com todos os genes diferencialmente expressos na interação com conídios constam do **Anexo 2**.

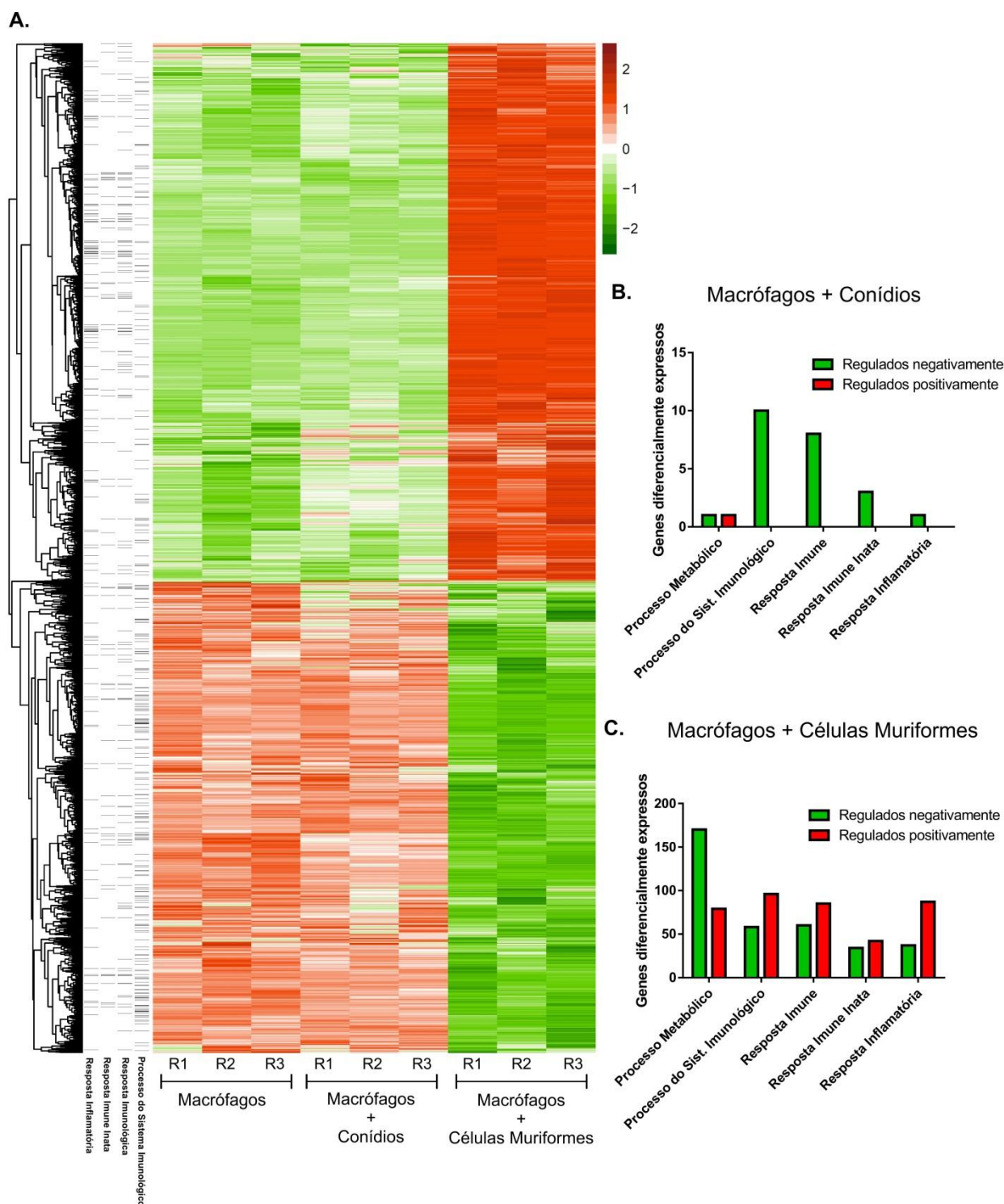


Figura 13. Heatmap mostrando todos os genes diferencialmente expressos na interação de macrófagos peritoneais com células muriformes ou conídios de *F. pedrosoi* (A). O heatmap foi construído com base no *Zscore* considerando todas as três replicatas. Análise de ontologia gênica mostram poucos genes diferencialmente expressos relacionados com a resposta imune na interação com conídios (B). Já na interação com células muriformes, observar-se vários genes relacionados com a resposta imune regulados positivamente, principalmente aqueles envolvidos na resposta inflamatória (C).

Os fungos produzem vários fatores que podem atuar como potentes reguladores da resposta inflamatória do hospedeiro [154,155]. Ao se mascarar ou subverter o sistema de reconhecimento, alguns fungos são capazes de evitar o processo inflamatório, contribuindo para o processo de adaptação e oportunismo [156,157].

Assim, a baixa imunogenicidade de conídios pode representar uma interessante estratégia visando a sua permanência em estado latente no tecido, pois conforme os ensaios realizados *in vivo*, os conídios não foram capazes de proliferar e de se estabelecer em um contexto de resposta inflamatória aguda (**Figura 8, A**). Devido a sensibilidade do método, não é possível afirmar que todos os conídios foram eliminados pelo hospedeiro ou se encontram em estado latente no sítio de infecção. Os fungos que não ativam adequadamente a resposta imune do hospedeiro podem permanecer por tempo suficiente no tecido para que possam, em condições oportunas, alterar a sua forma para aquela tida como patogênica, as quais em geral, assim como as células muriformes, são extremamente resistentes aos mecanismos efetores da imunidade inata e adaptativa, contribuindo para a sua persistência no hospedeiro e a cronificação da doença [44,109].

De maneira diversa, células muriformes do fungo *F. pedrosoi* são capazes de alterar profundamente o padrão de expressão gênica dos macrófagos peritoniais. Genes que codificam receptores importantes no reconhecimento de células fúngicas, como TLR2, Dectina 1 e Mincle (Tlr2, Clec7a e Clec4e), estão todos regulados positivamente na interação com células muriformes, assim como genes que codificam moléculas co-estimulatórias, como CD40 e CD86, as quais são importantes para o processo de proliferação de linfócitos T e produção de IL-2 (**Figura 14**) [158,159].

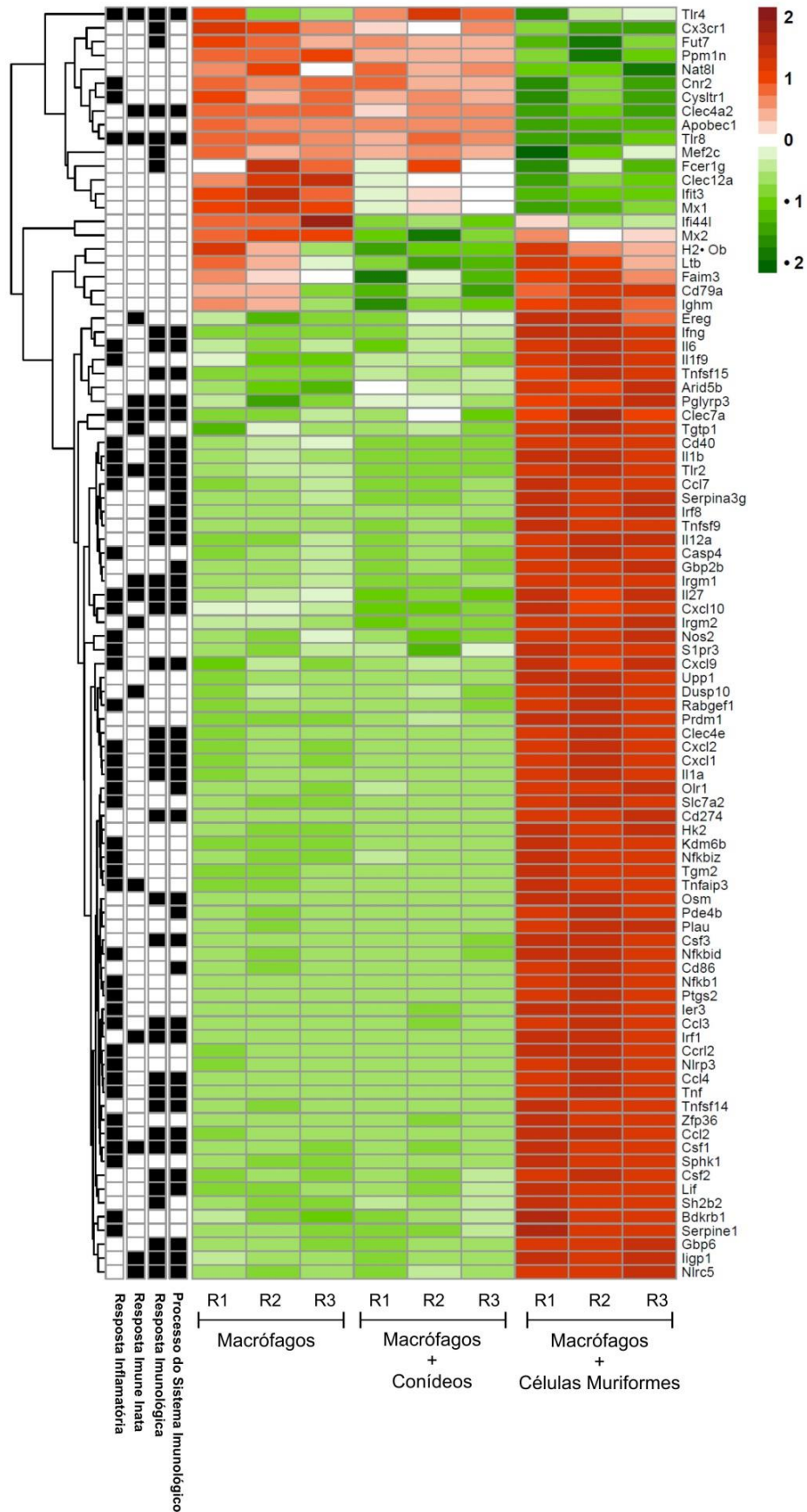


Figura 14. Heatmap mostrando os 90 genes de maior *fold change* na interação com células muriformes. O heatmap foi construído com base no Zscore considerando-se todas as replicatas.

A interação de macrófagos peritoniais com células muriformes também é capaz de induzir a expressão diferencial de genes importantes no estabelecimento de processo inflamatório (Il1a, Il1b, Il1f9, Il6, Tnf, Nfkb1, Ptgs2, Bdkrb1), na migração celular (Cxcl1, Ccl2, Ccl2, Cxcl2, Ccl3, Ccl7, Cxcl9, Cxcl10), no processo de diferenciação (Csf1, Csf2, Csf3) e proliferação celular (Ereg) (**Figura 14**). Todos esses genes estão regulados positivamente na interação com células muriformes.

Tal perfil de expressão gênica mostrado na interação com células muriformes é consistente com características histopatológicas observadas em CBM humana e murina, onde são observados infiltrados inflamatórios granulomatosos, por vezes supurativos e com a presença de micro-abscessos [109,129,160]. Ainda, a expressão de genes como Ereg e S1pr3, relacionados com o processo de angiogênese e de crescimento epidérmico, é coerente com o processo de neovascularização e hiperplasias observadas nas lesões [39,129].

Dentre os genes regulados negativamente na interação com células muriformes estão o Fcgr1g, Clec12a e Tlr8 (**Figura 14**). O Fcgr1g codifica receptor de IgE de alta afinidade, e está envolvido na ativação de plaquetas mediada por colágeno e na ativação de neutrófilos mediada por integrinas. Já o Clec12a, em humanos, codifica proteína pertencente ao domínio das lectinas do tipo C, atuando na regulação negativa da função de granulócitos e monócitos [161]. Tlr8, por sua vez, codifica PRR endossomal importante no reconhecimento de PAMPs de patógenos intracelulares. TLR-8 tem sido associado recentemente com o reconhecimento e ativação de RNA bacteriano permitindo a ativação de monócitos em resposta à infecção com *Streptococcus pyogenes* [162].

A expressão de genes importantes para o reconhecimento do fungo e o estabelecimento de resposta inflamatória, tais quais: Tnf, Il1b, Il6, Il12, Ccl2, Casp1,

Nlrp3, Dectin1, Tlr2, Tlr4, foram confirmados por RT-PCR em tempo real. Salvo raras exceções, como no caso do gene que codifica para o receptor dectina-1, os dados do RT-PCR em tempo real são semelhantes aos obtidos por meio do RNA-Seq, onde os genes descritos acima, a exceção de TLR-4, contam com grande regulação positiva na interação com células muriformes (**Figura 15**).

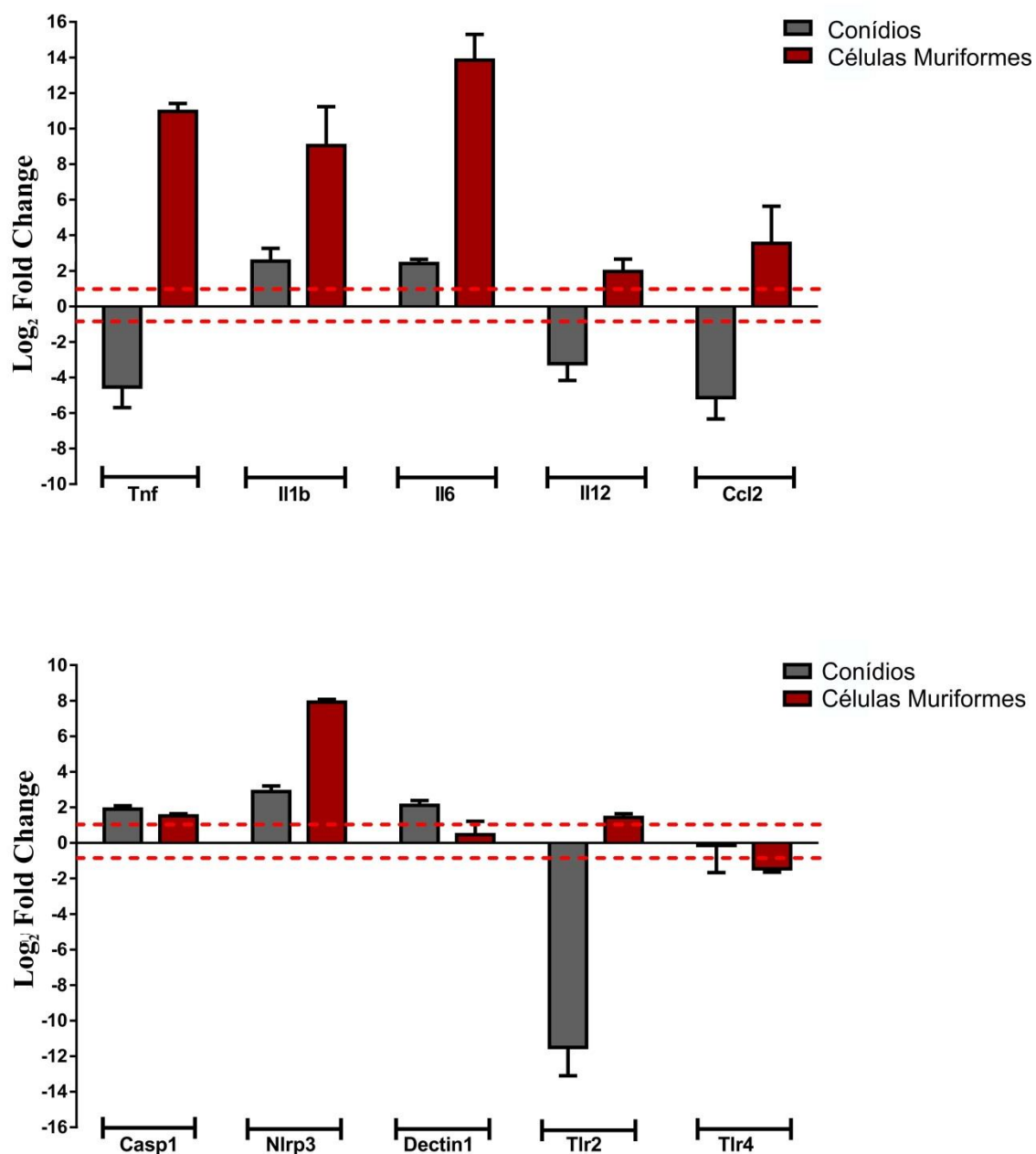


Figura 15. RT-PCR em tempo real de genes importantes para o reconhecimento de células fúngicas e estabelecimento do processo inflamatório.

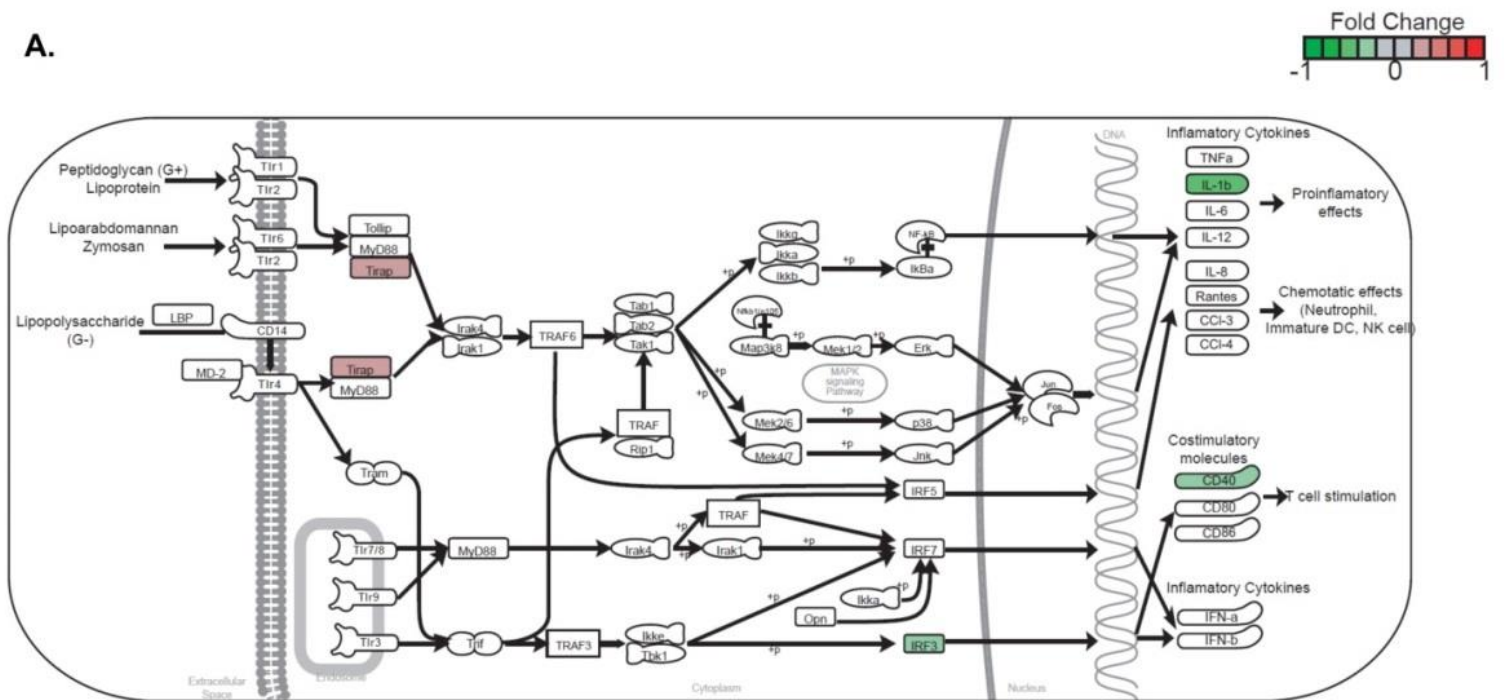
2.2.3 Células muriformes induzem intensa produção de citocinas pró-inflamatórias em co-cultivo com macrófagos peritoneais, ao passo que inibem óxido nítrico.

O perfil de expressão gênica na interação com células muriformes demonstra a modulação positiva de vários genes que codificam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias envolvidas na via de sinalização dos receptores do tipo toll (**Figura 16, B**). Interação com conídios não mostrou mudanças significativas na expressão de genes nessa via, exceto para os genes *Tirap* e *Il1b*, os quais se encontram regulados negativamente (**Figura 16, A**).

A produção de citocinas e quimiocinas envolvidas na ativação do sistema imune inato, bem como no estabelecimento do processo inflamatório foram confirmados por ELISA, utilizando-se o sobrenadante de cultura das células. Os dados mostram que de fato células muriformes são capazes de induzir a produção e a secreção de grandes quantidades $TNF-\alpha$, IL-6 e MCP-1 em comparação à co-cultura com conídios ou fragmentos de hifas, após 6, 12, 24 e 48 horas (**Figura 17, A, C-D**).

Nenhuma das formas do fungo foram capazes de induzir a liberação da forma ativa de IL-1 β sem a necessidade de co-estimulo (dados não mostrados). No entanto, cabe ressaltar que a produção de pro-IL-1 β , induzida pelo gene *Il1b*, não garante a liberação da sua forma ativa a qual depende da participação de um complexo multiproteico denominado inflamassoma. Assim, co-cultivo das formas do fungo com macrófagos peritoneais na presença de LPS foram capazes de induzir a ativação do inflamassoma e a liberação de IL-1 β ativa, após 24 horas de co-cultivo, sendo essa mais intensa na interação com células muriformes (**Figura 17, B**).

A.



B.

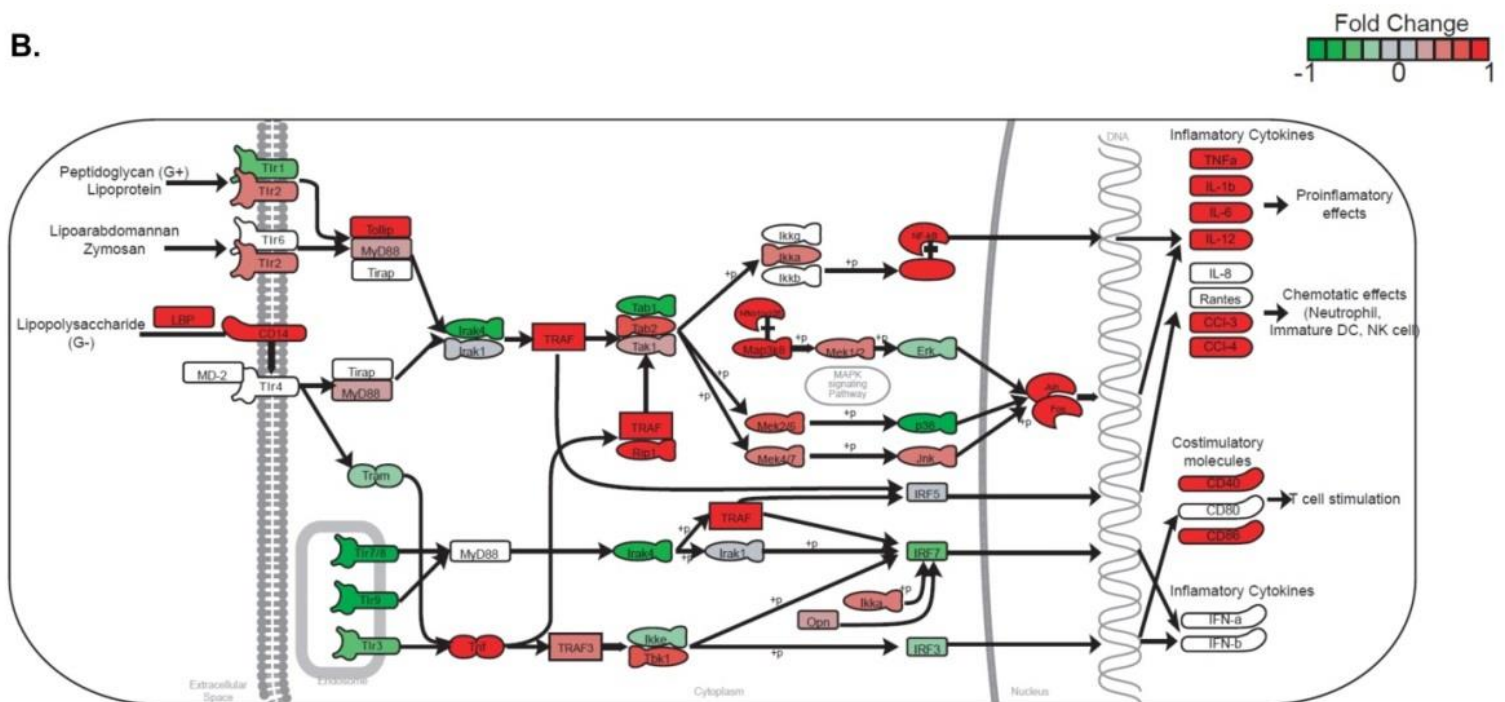


Figura 16. Perfil de expressão de genes que participam da via de sinalização dos receptores do tipo Toll, tanto na interação com conídios (A), quanto na interação com células muriformes (B).

Todavia, observando os dados da **Figura 17, F**, constata-se que a intensa ativação da imunidade inata promovida por células muriformes não repercute necessariamente no aumento de espécie reativa do nitrogênio livre, importante mecanismo efetor dos macrófagos. Ao contrário, observa-se baixa detecção desse mediador, mesmo com co-estímulo de LPS, sendo essa redução mais intensa na interação dos macrófagos com células muriformes (**Figura 17, H**). Tais dados são consistentes ao encontrado na literatura onde foi observado que estruturas do fungo como a melanina, a qual é mais expressa em células muriformes, podem modular negativamente a capacidade do macrófago em eliminar o fungo *in vitro*, mormente pela inibição da produção de NO [163].

O NO produzido como resultado da ação da imunidade adaptativa é indispensável também na modulação da resposta inflamatória exacerbada induzida por infecções persistentes. Em modelo utilizando *Mycobacterium tuberculosis* *in vivo* foi visto que tanto a produção de IL-1 β , quanto a imunopatologia da doença foram suprimidas pela ação do IFN- γ . Tal efeito foi mediado pelo NO, que foi capaz de inibir a estruturação de NLRP3 por meio de nitrosilação de grupos tiol dessa proteína [164].

A produção de IL-12 também não foi induzida por nenhuma das formas fúngicas (**Figura 17, E**). Ensaio de inibição mostraram que a produção desses mediadores está inibida quando do co-cultivo com conídios, hifas ou células muriformes do fungo *F. pedrosoi*, sendo essa última responsável pela menor produção de IL-12 em co-cultura com LPS + IFN γ (**Figura 17, G**).

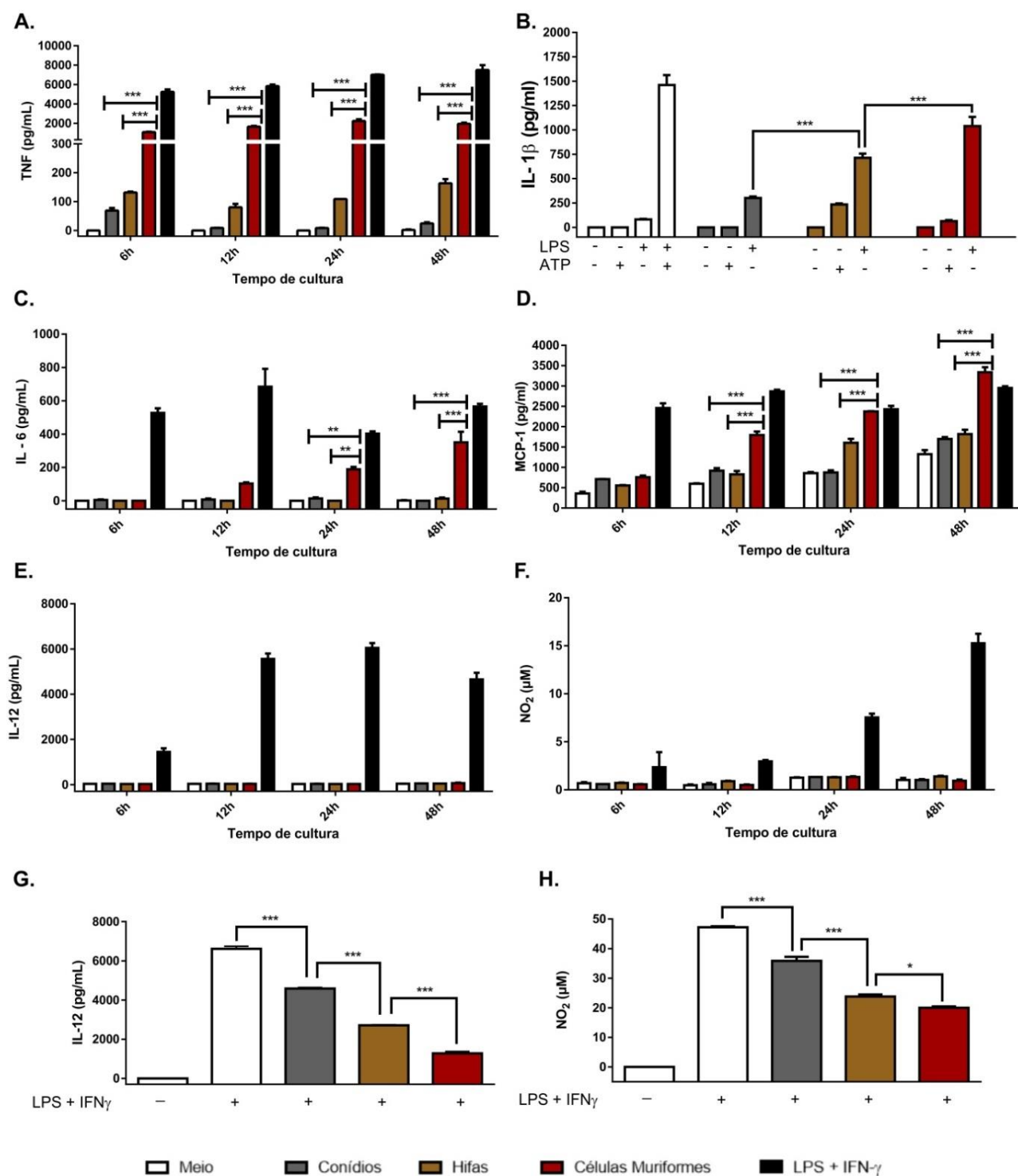


Figura 17. Quantificação de citocinas, quimiocina e NO₂ no sobrenadante de cultura de macrófagos peritonias com formas fungo *F. pedrosoi*. Altas concentrações de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) são observados na co-cultura com células muriformes em comparação àquela com conídios. Para avaliar a produção de IL-1 β após 24 horas de cultivo, foi requerido co-estímulo com LPS (B). Células muriformes também induziram altos níveis de MCP-1, principalmente após 48h em comparação com conídios (D). Produção de IL-12 (E e G) e NO (F e H) foi fortemente inibida pela presença de células muriformes. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

Importante salientar que a maior produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por células muriformes, em relação ao induzido por conídios, não decorre necessariamente das diferenças entre os tamanhos das referidas células fúngicas, o que garantiria uma maior exposição de antígeno naquelas de maior diâmetro como as células muriformes. Ensaio com diferentes concentrações de conídios, por exemplo, não implicou em aumento na liberação de TNF- α ou IL-6 (**Figura 18, A-B**).

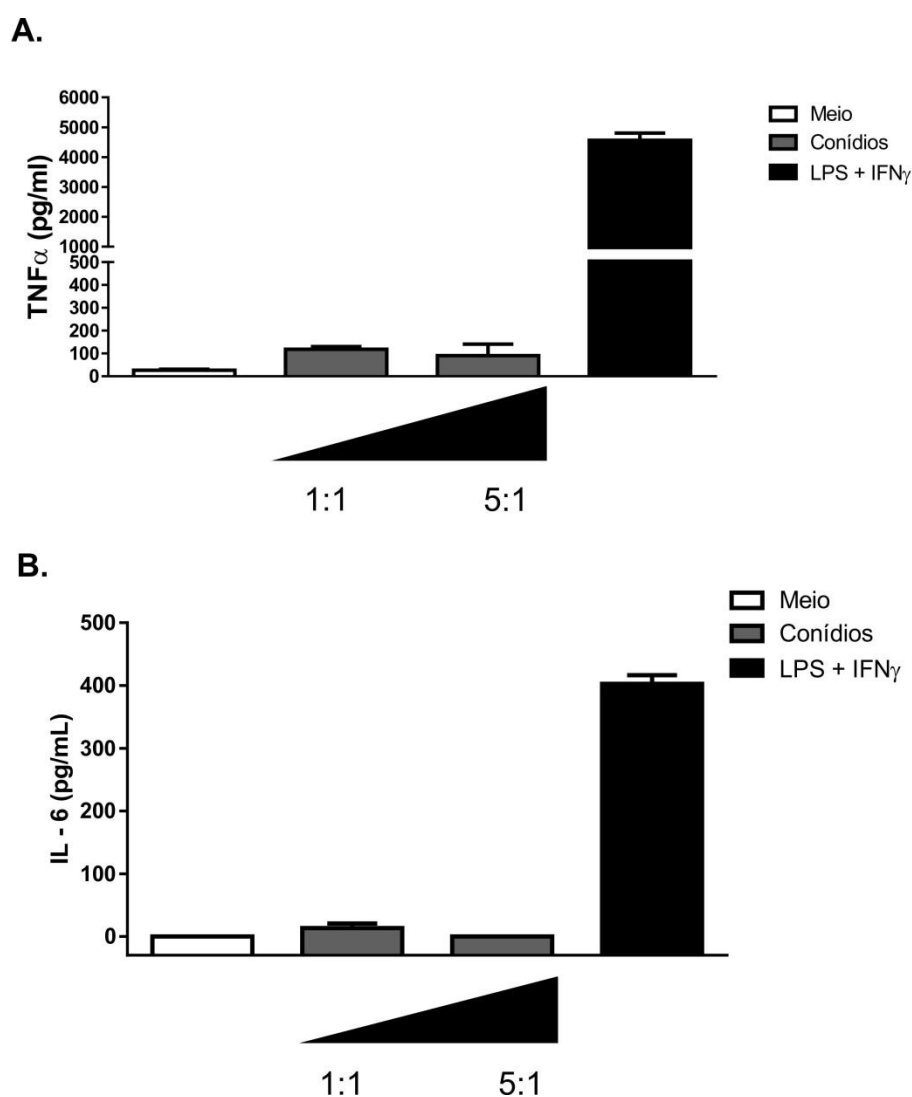


Figura 18. Quantificação de TNF- α (**A**) e IL-6 (**B**) após co-cultivo de 24 horas com conídios e macrófagos peritoneais nas concentrações de 1:1 e 5:1.

Dados anteriormente publicados já haviam demonstrado que conídios associados à macrófagos, mesmo em altas concentrações, não são capazes de estimular a produção de citocinas inflamatórias, como TNF, sugerindo que a falha no reconhecimento da imunidade inata poderia resultar na cronicidade da infecção [125]. Nossos resultados corroboram parcialmente esses dados, mostrando que conídios não são capazes de induzir a expressão e, conseqüentemente, a secreção de TNF- α e IL-1 β (**Figura 17, A-B**). Entretanto, esse perfil observado na infecção com conídios não é representativo da maioria dos casos clínicos da CBM, os quais reportam a presença de células muriformes em uma reação granulomatosa crônica associada com fibrose extensa e com abscessos ricos em neutrófilo [2,16,34,129]. Dados anteriormente publicados já haviam demonstrado que conídios associados à macrófagos, mesmo em altas concentrações, não são capazes de estimular a produção de citocinas inflamatórias, como TNF α , sugerindo que a falha no reconhecimento da imunidade inata poderia resultar na cronicidade da infecção [125]. Nesse sentido, o presente trabalho complementa as informações disponíveis na literatura acerca da patogenia da doença, evidenciando as células muriformes como potentes indutoras da resposta inflamatória observada na CBM.

Após análise conjunta dos dados obtidos com os ensaios *in vivo* e *ex vivo*, podemos concluir que o padrão inflamatório crônico observado no modelo murino está relacionado com a presença e persistência das células muriformes no tecido lesionado, de modo que a eventual inabilidade do hospedeiro em regular a resposta inflamatória exacerbada, induzida pelo fungo, pode representar um fator determinante para a cronificação da doença.

2.2.4 Componentes da parede de células muriformes respondem por parte da produção de citocinas pro-inflamatórias em culturas com macrófagos peritoniais.

Estudos acerca da parede celular de fungos ao longo dos últimos anos tem expandido nosso conhecimento acerca da sua relevância na interação parasito-hospedeiro. Fatores chaves de virulência são encontrados na parede celular de fungos, contribuindo para a adesão e destruição aos tecidos do hospedeiro. Os principais polissacarídeos encontrados na parede celular de fungos são mananas, glucanas (polímero de glucose unidos por ligações glicosídicas β 1,3-, β 1,6-, α 1,4-, ou α 1,3), quitina (um polímero de resíduos β 1,4-N- acetilglucosamina) e quitosana (versão deacetilada da quitina) (**Figura 19**) [165]. As glicoproteínas na parede celular podem ter glicosilações N-ligadas ou O-ligadas, e estão aderidas aos polissacarídeos da parede tanto por ligações covalentes ou por ancoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Por fim, melanina é um pigmento frequentemente observado na parede celular de fungos patogênicos [166,167]. Visando avaliar qual a contribuição dos componentes de parede na indução de citocinas pro-inflamatórias, fungo morto por exposição prolongada ao calor (HK) também foram cultivados com macrófagos peritoniais.

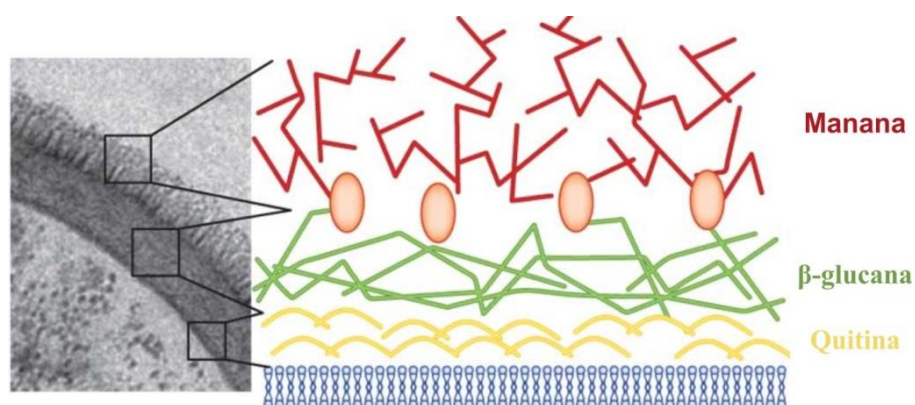


Figura 19. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando camadas da parede celular de *Candida albicans*, com a presença de mananas, β -glucanas e quitina. Adaptado de Hardison & Brown (2012) [165].

Análise da produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MCP-1, mostram que parte da produção dessas citocinas é induzida por algum componente presente na parede celular de células muriformes (**Figura 20, A-D**). De igual modo, fungos HK também foram capazes de inibir a produção de IL-12 e NO (**Figura 20, E-F**). Tais resultados confirmam o papel dos componentes de parede na modulação da resposta inflamatória induzida por células muriformes no contexto da CBM.

É razoável pensar que diferenças no padrão de interação das formas do fungo com as células do hospedeiro sejam explicadas pelas diferenças na constituição da parede celular nessas células fúngicas [167]. No entanto, poucos são os dados na literatura que indicam diferenças na constituição da parede celular, considerando as três formas do fungo *F. pedrosoi*. Os raros dados existentes indicam maior concentração de melanina na parede celular de células muriformes comparadas às de conídios ou hifas, bem como diferenças estruturais e distribuição celular de estruturas lipídicas como cerebrosídeos [1,168]. Entretanto, dados do grupo envolvendo co-cultura com lipídeos totais extraídos das células fúngicas (conídios, hifas e células muriformes) não mostrou indução de citocinas como observado na interação com o fungo vivo ou HK (dados não mostrados).

A indução de resposta inflamatória após o reconhecimento de β -glucana por dectina-1, requer a ação sinérgica com receptores do tipo Toll, como o TLR2 [116]. Assim, a incapacidade de ativação de genes relacionados com o processo inflamatório por conídios, pode estar associada ao seu reconhecimento inadequado e/ou insuficiente pelos receptores da imunidade inata. Contudo, maiores estudos são necessários para compreender melhor os mecanismos pelo qual conídios de *F. pedrosoi* conseguem evadir-se da ativação da resposta inflamatória. *Aspergillus fumigatus*, por exemplo, encobre a superfície celular com hidrofobinas as quais são capazes de prevenir o

reconhecimento desse fungo [169]. *Pneumocystis jirovecii* são capazes de evadir-se do sistema imune alterando completamente o perfil de glicoproteínas em sua superfície [170]. Além disso, muitos fungos exploram a capacidade de CR3 em atenuar a resposta inflamatória e permitir o parasitismo intracelular [66].

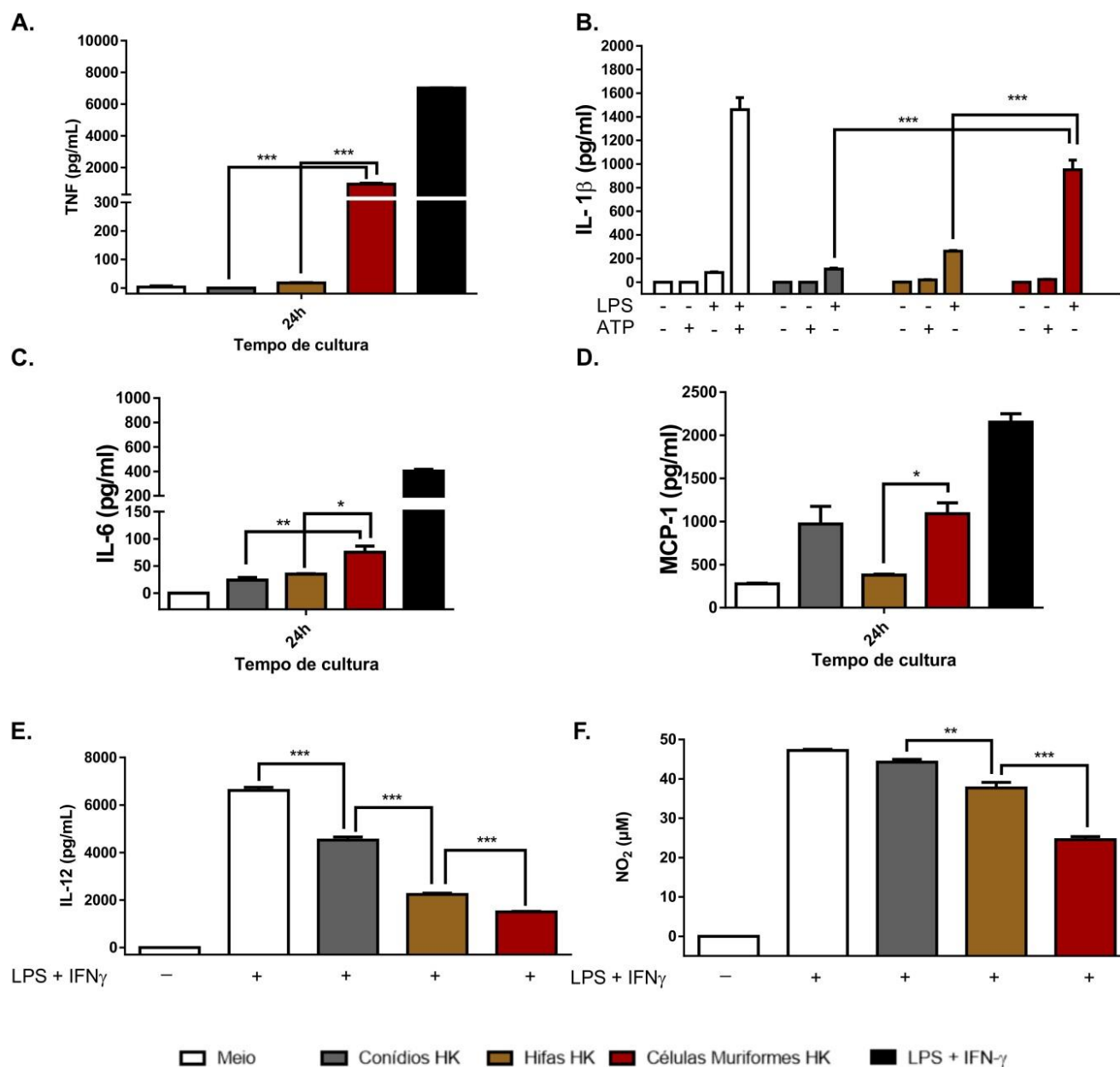


Figura 20. Quantificação de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), MCP-1 (D), IL-12 (E) e NO $_2$ (F) em co-cultura de macrófagos peritoneais e formas do fungo morto por exposição ao calor (HK) no tempo de 24 horas. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

Por outro lado, também merece atenção a capacidade de células muriformes em induzir uma resposta inflamatória tão intensa. Provavelmente tal fato decorre de uma maior exposição dos seus componentes de parede, incluindo nesse rol a melanina. Muitas são as evidências associando a melanina com a modulação da resposta imune podendo ter propriedades tanto pró quanto anti-inflamatórias, a depender do tipo de melanina e da resposta do hospedeiro [171]. Por exemplo, melaninas podem elicitar uma reação do tipo “corpo estranho” uma vez que são constituídas por polímeros insolúveis os quais não são facilmente degradados por macrófagos. Ensaio utilizando *ghosts* de melanina em camundongo mostrou que essas estruturas foram capazes de promover a formação de granulomas [172]. Assim, considerando que a melanina pode reduzir a suscetibilidade de células fúngicas à danos oxidativos, o processo de melanização tem o potencial de aumentar a sobrevivência do fungo no tecido, alterando o perfil de resposta inflamatória [171,173].

2.2.5 BMDM e BMDCs também produzem altas concentrações de TNF- α e IL-1 β quando da interação com células muriformes.

Considerando que todos os dados acima foram obtidos a partir de cultura com macrófagos recém-migrados para o peritônio, suscitou-se a dúvida quanto a produção de citocinas pró-inflamatórias quando da utilização de outras APCs. Nesse sentido, visando avaliar o perfil de ativação de outras linhagens de APC na presença de células do fungo *F. pedrosoi*, macrófagos e células dendríticas derivados da medula óssea (*bone marrow derived macrophages* - BMDM e *bone marrow derived dendritic cells* - BMDCs) foram co-cultivados com conídios ou células muriformes.

De modo similar ao descrito acima para culturas com macrófagos peritoniais, tanto BMDMs (**Figura 21, A e C**) quanto BMDCs (**Figura 21, B e D**) produziram altas

concentrações de TNF- α (**Figura 21, A-B**) e IL-1 β (**Figura 21, C-D**) na presença de células muriformes, em comparação à co-cultura com conídios, não sendo requerido qualquer tipo de estímulo adicional para a produção de IL-1 β .

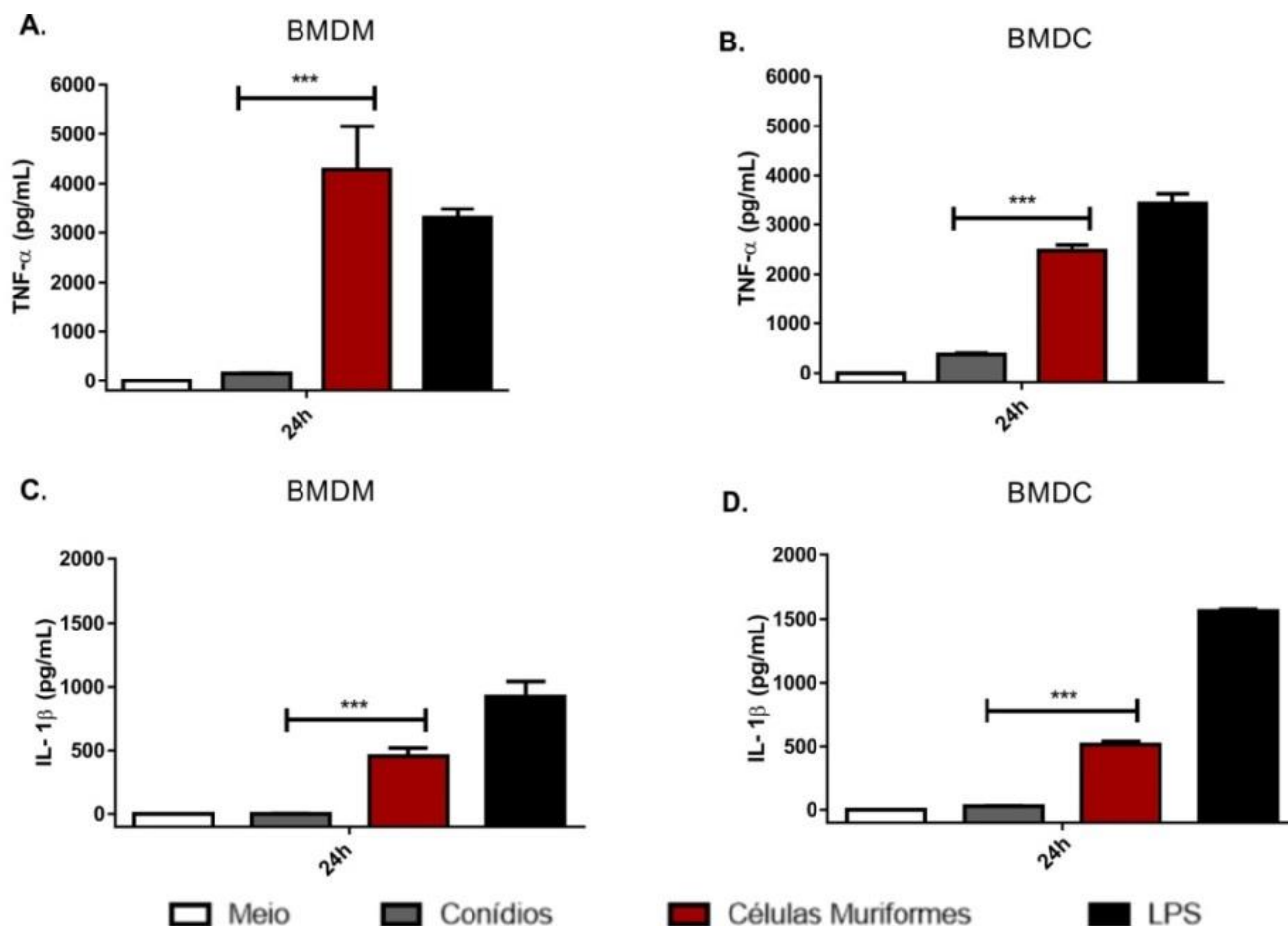


Figura 21. Quantificação de citocinas após co-cultura das formas do fungo com macrófagos (**A** e **C**) e células dendríticas (**B** e **D**) derivados da medula mostrando padrão similar ao observado em macrófagos peritoniais, após 24 horas, na produção de TNF- α (**A-B**) e IL-1 β (**C-D**). Estímulos adicionais não foram requeridos para a produção da forma ativa de IL-1 β . ***P<0,001.

Com base nos dados acima, o perfil de citocinas induzido por células muriformes e conídios não é exclusivo da interação com macrófagos peritoniais recém-migrados, podendo ser estendida às outras linhagens de APC.

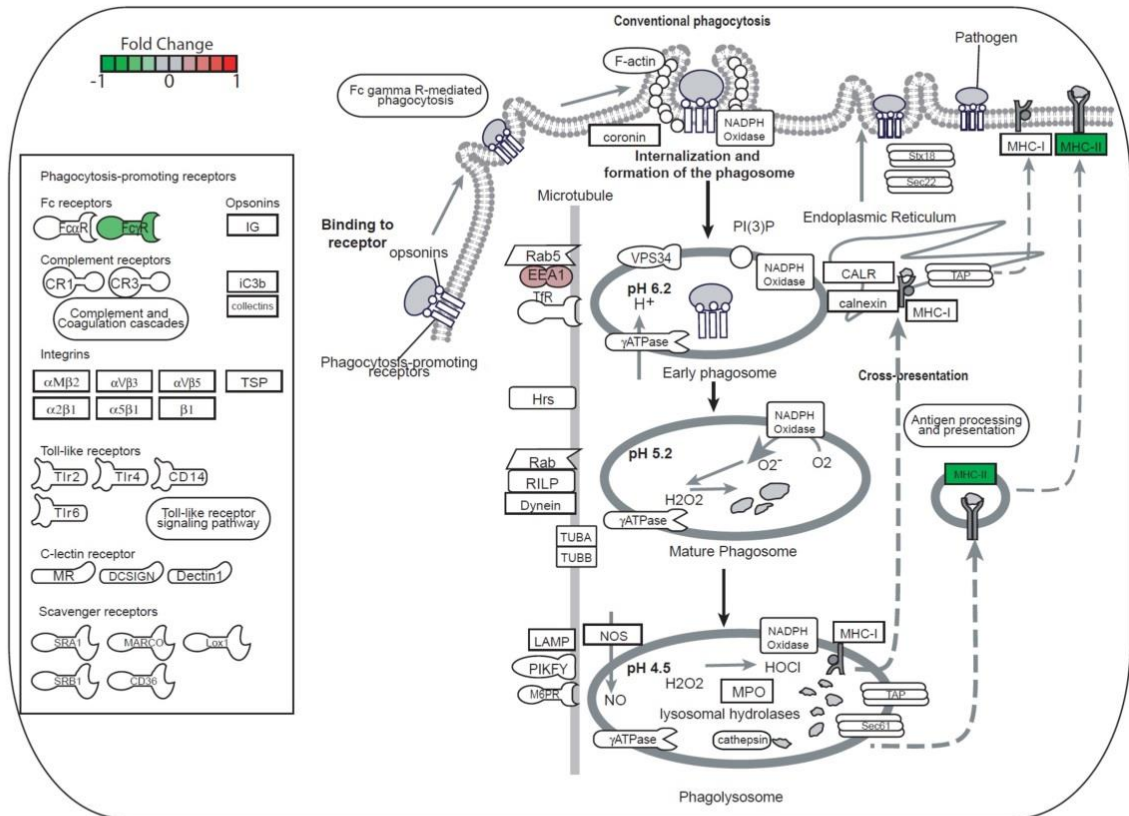
2.2.6 O processo de internalização de conídios, mas não de células muriformes, independe de reconhecimento por FC e Dectina 1.

Mesmo os conídios de *F. pedrosoi* não sendo capazes de induzir a expressão diferencial de genes relacionados com o reconhecimento do fungo, como Fc γ R e Dectin1, ou com o processo de fagocitose (**Figura 22, A**), esses são naturalmente internalizados por macrófagos peritoneais. Dados do RNA-Seq de macrófagos estimulados com células muriformes, por sua vez, mostraram expressão elevada do gene Dectin1, ao passo que o gene Fc γ R foi modulado negativamente (**Figura 22, B**).

Para confirmar a importância de ambos os receptores no processo de internalização de conídios e células muriformes, foi realizado ensaio de fagocitose de modo que, após 24 horas de co-cultivo, apenas a internalização de células muriformes foi afetada após o bloqueio desses receptores com laminarina (bloqueio de dectina-1) ou FcBlock (**Figura 23, A-B**).

Trabalhos com *C. neoformans* mostraram que esse pode ser internalizado por macrófagos peritoneais tanto pelo processo de fagocitose mediado por receptores, quanto mediado por clatrina com a participação de actinas e tubulinas, em um processo denominado macropinocitose [174]. Esse mecanismo poderia explicar a internalização de conídios mesmo quando do bloqueio de receptores como FC e Dectina-1. Outra possibilidade seria a participação dos demais receptores, ainda não avaliados.

A.



B.

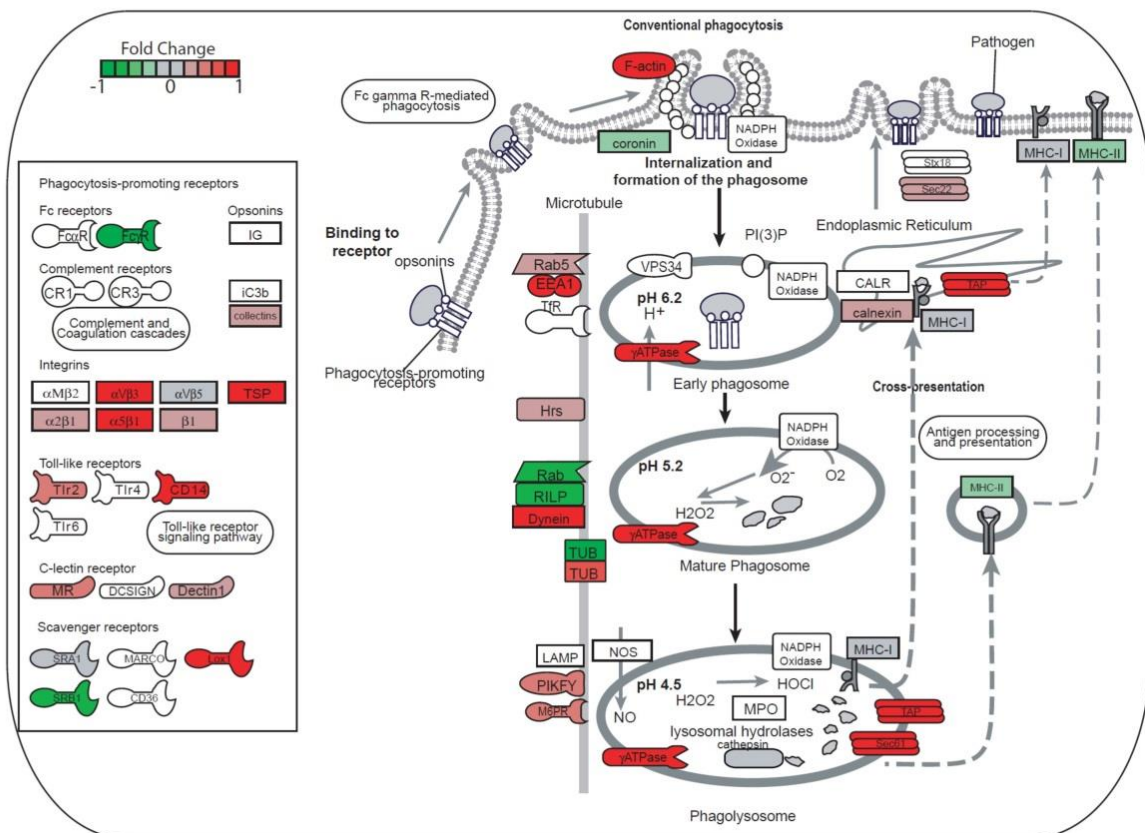


Figura 22. Expressão diferencial de genes relacionados com o processo de fagocitose na interação com **conídios (A)** ou **células muriformes (B)**.

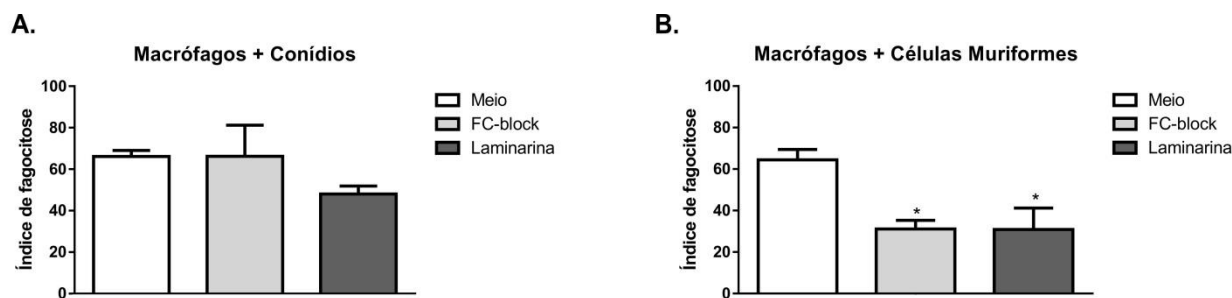


Figura 23. Índice de fagocitose de conídios (A) e células muriformes (B) em co-cultura de 24 horas com macrófagos peritonias (1:1) na presença ou ausência de FC-block ou laminarina, para bloqueio de dectina-1.

Embora a internalização do fungo pelas células fagocíticas do hospedeiro consista em um importante mecanismo visando a sua destruição no interior da célula, no caso de patógenos intracelulares facultativos, como o *F. pedrosoi*, o processo de fagocitose não necessariamente significa a morte do parasita, podendo ser subvertido a fim de formar ali reservatórios do fungo no hospedeiro, constituindo um importante mecanismo de escape do fungo.

Macrófagos e seus produtos estão envolvidos no desenvolvimento de inflamações granulomatosas e também promovem o reconhecimento e o processamento de antígenos. Tais antígenos podem, em seguida, ser apresentados na superfície de macrófagos às células linfoides em um contexto MHC de classe II.

Interessante notar que em ambas as interações o gene relacionado com o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII) encontra-se regulado negativamente (**Figura 22**). Tal fato também foi observado por Hayakawa e colaboradores (2006), os quais, por meio de citometria de fluxo, identificaram que a expressão de MHCII e da molécula co-estimulatória CD80 são modulados negativamente após a fagocitose de conídios, não só de *F. pedrosoi*, mas também de *C. carrioni* e *P. verrucosa* [175]. De igual modo, estudos com linhagem virulenta do fungo

P. brasiliensis mostrou progressiva supressão no padrão de expressão de moléculas relacionadas com a apresentação de antígenos via MHC de classe II, acarretando em apresentação antigênica deficiente e modulação negativa dos mecanismos efetores da imunidade adaptativa [176].

Esse fato, associado aos demais dados apresentados, mostra um perfil de interação entre as células muriformes e as células do hospedeiro onde há a indução de intenso processo inflamatório, ao passo que os mecanismos efetores das células do hospedeiro e expressão de genes importantes na ativação da resposta imune adaptativa estão inibidos.

2.2.7 Resposta inflamatória intensa no curso da CBM murina está correlacionada com a persistência do fungo na lesão

Muito embora a inflamação nos estágios iniciais do processo de infecção se mostra benéfica e eficiente em sua contenção, uma resposta inflamatória exacerbada pode ser perniciosa e eventualmente se opor à erradicação do agente infeccioso. Ao menos em casos clínicos específicos, a cronicidade da doença pode ser resultado de uma resposta inflamatória exagerada a qual provavelmente compromete a habilidade do hospedeiros em lidar com o agente infeccioso, não se tratando de uma suscetibilidade intrínseca do hospedeiro frente a infecção [67]. Nesse sentido, foi mostrado em ensaios utilizando IL-37 recombinante, que essa era capaz de inibir a ativação do inflamassoma, reduzindo, assim, a severidade da aspergilose murina [177].

Ao contrário do que ocorre com pacientes que desenvolvem a doença, os quais mantêm carga fúngica e processo inflamatório crônico por longos períodos de tempo, todos os modelos murinos descritos até a presente data tendem ao processo de remissão espontânea após curto período de infecção [132]. Após 30 dias de infecção com

propágulos fúngicos, foi possível observa redução significativa da resposta inflamatória seguida de redução da carga fúngica (**Figuras 7 e 8**). Entretanto, não está claro se a redução da resposta inflamatória observada no modelo murino seria resultado da resolução gradual da doença ou se seria o microambiente essencial para a efetiva eliminação do patógeno, conforme observado.

Visando testar essa última hipótese, o curso da CBM murina foi avaliada em modelo de inflamação crônica induzido por zimosan (ZYM), conforme descrito previamente [178,179]. Após 15 dias de infecção com propágulos do fungo, período no qual se inicia a redução do processo inflamatório nesse modelo, os animais foram tratados a cada três dias com 20 μ l de suspensão contendo 5 mg/ml de ZYM (**Figura 24, A**). Como esperado, aqueles animais tratados com ZYM, ao contrário dos tratados com PBS, não foram capaz de reduzir o tamanho do edema formado, apresentando intensa resposta inflamatória até 30 dias após a infecção (d.p.i), o equivalente a 15 dias após o início do tratamento (d.p.t) (**Figura 24, B e D**). Entretanto, aumento na resposta inflamatória nesse estágio da doença não repercute diretamente na redução da carga fúngica no hospedeiro. De modo contrário, animais que apresentaram resposta inflamatória prolongada não foram capazes de reduzir a carga fúngica ao longo do tempo, como observado para aqueles animais tratados com PBS (**Figura 24, C**).

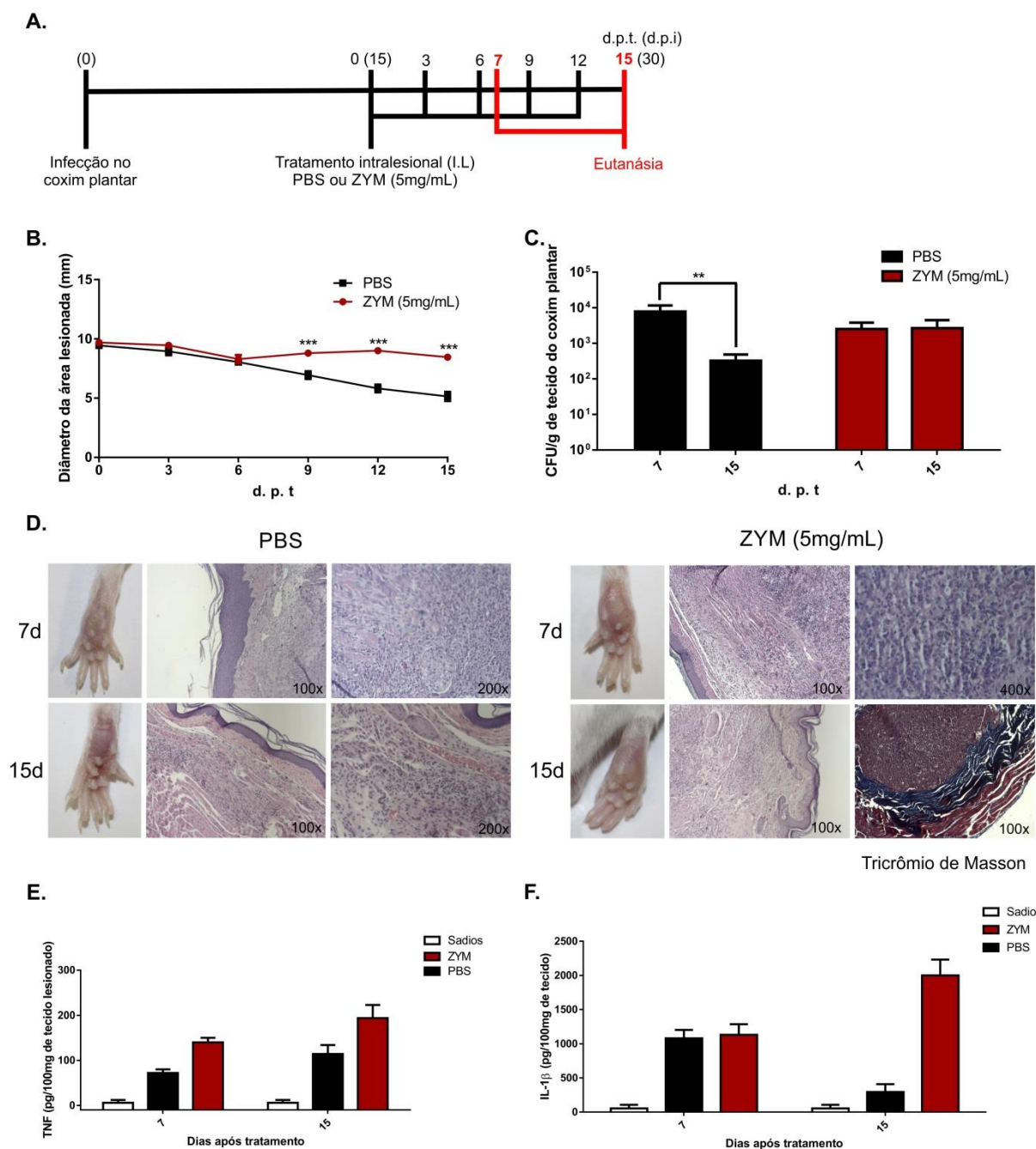


Figura 24. Progressão da CBM murina em modelo inflamatório induzido por zimosan. Após 15 dias de infecção com propágulos do fungo *F. pedrosoi*, os animais foram tratados intralesionalmente (I.L.) no coxim plantar a cada três dias com 20µl da suspensão contendo 5 mg/ml de zimosan (ZYM) ou PBS, até 15 dias após tratamento (d.p.t.) (A). Animais tratados com ZYM apresentaram intensa resposta inflamatória até 30 dias após infecção (d.p.i) (B e D). Animais com resposta inflamatória prolongada não foram capazes de reduzir a carga fúngica ao longo do tempo, como observado em animais tratados com PBS (C). Quantificação de TNF α (E) e IL-1 β (F) por Elisa. HE ou Tricrômio de Masson onde indicado (D). **P<0,01 e ***P<0,001.

Com base nesses dados, tem-se que a eventual falha no controle da inflamação no curso da CBM pode acarretar na inabilidade do hospedeiro em lidar com a infecção. Essa condição é exemplificada em camundongos com doença granulomatosa crônica, na qual uma falha intrínseca no controle da inflamação repercute na inabilidade do hospedeiro em resolver infecção com *A. fumigatu* [180]. De modo análogo, o estabelecimento de resposta inflamatória crônica no curso da candidíase, é prejudicial na resolução da doença [181], colocando a regulação da resposta inflamatória como requisito importante no processo de remissão dessas doenças.

Nesse contexto, torna-se extremamente relevante entender o modo pelo qual a resposta inflamatória intensa, induzida pela presença de células muriformes, é superada na CBM experimental, dando lugar a uma resposta imune eficiente capaz de eliminar o fungo da lesão. Muito provavelmente, o processo de cura observado no modelo murino deve contar com a ação coordenada dos diferentes padrões de resposta imune adaptativa (Th1, Th2, Treg e Th17), que em conjunto com os mecanismos efetores da imunidade inata, são capazes de eliminar o fungo do tecido e por fim ao processo de infecção.

Visando elucidar essa questão, foram realizados ensaios para avaliar a participação das sub-populações de linfócitos T auxiliares no curso da CBM experimental, cujos resultados serão apresentados no capítulo seguinte.

Capítulo III

Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4+ na CBM murina e sua relevância para o processo de remissão da doença observado no modelo experimental

Neste capítulo será analisado, por meio de citometria de fluxo, o perfil de linfócitos T auxiliares atuantes na CBM experimental. Fazendo uso de animais dectina-2 KO, além da neutralização de IL-17A e IFN- γ , bem como da depleção de CD25, será avaliado o papel das populações de Th1, Th17 e Treg no curso da CBM murina, bem como no processo de remissão da doença observado no referido modelo experimental.

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Modelo animal e infecção

Camundongos da linhagem C57bl/6, machos, de 6 a 8 semanas de idade foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) e mantidos em condições apropriadas, com fornecimento de água e ração *ad libitum* no biotério do Microbial Science Building, da Universidade de Wisconsin – Madison, USA. Já camundongos Dectina-2 KO, machos, de 6 a 8 semanas, foram obtidos por meio de criação no próprio biotério da Universidade de Wisconsin.

Para o estabelecimento da CBM murina, 4 a 5 animais por grupo de experimentação foram infectados, no coxim plantar, com propágulos fúngicos contendo fragmentos de hifas e conídios de *F. pedrosoi*, de forma que cada pata foi inoculada com 50µl contendo 1×10^6 células fúngicas.

A cada três dias o diâmetro da área acometida com a infecção foi mensurado com o auxílio de um paquímetro de modo que após 7, 14, 21 e 28 dias de infecção, os animais de cada grupo foram eutanasiados por exposição prolongada ao CO₂, seguidos da excisão cirúrgica do coxim plantar e do linfonodo poplíteo para futuras análises visando a identificação de subpopulações de linfócitos T auxiliares no curso da CBM. Análise morfométrica e quantificação de unidades formadoras de colônia foram realizadas conforme descrito no capítulo I.

Todos os procedimentos realizados com os animais de experimentação neste capítulo foram aprovados pelo *Animal Care Committee* da Universidade de Wisconsin, seguindo recomendações contidas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* emitido pelo *National Institutes of Health* nos Estados Unidos.

3.1.2 Obtenção e isolamento de células do linfonodo drenante e do coxim plantar

Após coleta, cada linfonodo poplíteo extraído foi homogeneizado em cell strainer de 40µm com o auxílio do êmbolo de uma seringa, lavado com 5 ml de RPMI simples e centrifugado a 300g por 5 min. As células foram em seguida ressuspensas em 1mL de RPMI suplementado com 10% SBF e filtrados novamente em cell strainer de 40µm.

Para isolamento de células presentes na lesão, tecido extraído do coxim plantar foi cortado em pequenos pedaços e submetido à 5ml de solução de colagenase D (Roche), na concentração de 1mg por ml de *Collagenase buffer* contendo: HEPES (2,39 g/l), KCl (0,37 g/l), MgCl₂ (0,20 g/l), CaCl₂ (0,20 g/l) e NaCl (14,09 g/l). Após 1 hora de incubação a 37°C em placa de petri, os fragmentos de tecido foram homogeneizados em cell strainer de 70µm e lavados com 5 ml de RPMI simples. A ação da colagenase foi interrompida pela adição de 1ml de EDTA a 50mM e centrifugado a 300g por 5 minutos. O pellet foi ressuspensão em 5 ml de RPMI simples, filtrado em cell strainer de 70µm e em seguida centrifugados mais uma vez. Por fim, as células foram ressuspensas em 1ml de RPMI suplementado.

Após o isolamento, os linfócitos presentes na suspensão foram quantificados em Câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi aferida com azul de tripan. As amostras foram processadas individualmente, de modo que foram obtidas suspensão de células por animal avaliado, conforme o grupo experimentação.

3.1.3 Marcação de moléculas de superfície

Para marcação apenas de moléculas de superfície, alíquota de 200µl da suspensão de células descrita acima foi acondicionada em placa de cultura de 96 poços com fundo “U”. A placa foi centrifugada a 300g e após descarte do sobrenadante foi adicionado cocktail contendo, por poço, 100µl de *Brilliant Stain Buffer* (BD

biosciences) 0.5 µl de FcBlock (BD *biosciences*) e 0,5 µl dos marcadores e anticorpos oriundos da empresa BD *biosciences* listados na **tabela 2**. As amostras foram ressuspensas e incubadas por 20 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Após, os poços foram lavados com FACS buffer (0,5% BSA em PBS), seguidos de fixação pela adição de 150µl de PFA 2%.

Tabela 2. Relação dos anticorpos e respectivos fluoróforos utilizados na marcação exclusiva de moléculas de superfície.

	Anticorpo / Corante	Fluoróforo	Laser	Filtro
Marcação de Superfície	<i>Live and dead</i>	Yellow	Violet: 405C	610/20
	CD3	BV 786	Violet: 405A	780/60
	CD4	BUV 395	UV: 355C	379/28
	CD8	PE	Yellow/Green: 561E	586/15
	CD44	PercP-Cy5.5	Blue: 488A	710/40

3.1.4 Marcação intracelular

Para a identificação de subpopulações de linfócitos T auxiliares, 800µl da suspensão de células obtidas acima foram estimuladas por 5 horas, a 37°C, em 3ml de RPMI suplementado contendo anti-CD28 (3µg), anti-CD3-e (0,3µg) e Golgi Stop (2,66µl). Após, as amostras foram filtradas em *cell strainer* de 40µm, acondicionadas em tubos de 5ml, centrifugadas e marcadas inicialmente com anticorpos anti- CD4, CD25, CD44 e com o corante para identificação células vivas ou mortas, conforme descrito acima nos procedimentos para marcação de moléculas de superfície.

Para marcação intracelular de IL-4, IL-17A, IFN-γ e Foxp3, as células foram em seguida fixadas e permeabilizadas com o kit Mouse Foxp3 buffer set (BD *biosciences*), conforme instruções do fabricante. Após, lavagem com FACS buffer, foi adicionado 100µl de cocktail para marcação intracelular contendo 0.5 µl de anti- IL-4, IL-17A, IFN-γ e Foxp3 diluídos em FACS buffer (**Tabela 3**). As amostras foram em seguida ressuspensas e incubadas por 20 minutos no escuro e em temperatura ambiente.

Após, os poços foram lavados com FACS buffer (0,5% BSA em PBS), seguidos de fixação pela adição de 150µl de PFA 2%.

Tabela 3. Relação dos anticorpos e respectivos fluoróforos utilizados na marcação de superfície em conjunto com a marcação intracelular (ICS).

	Anticorpo/ Corante	Fluoróforo	Laser	Filtro
Marcação de superfície	L/D	Yellow	Violet: 405C (read D)	610/20
	CD4	BUV 395	UV: 355C	379/28
	CD25	BV 786	Violet: 405A	780/60
	CD44	PercP-Cy5.5	Blue: 488A	710/40
ICS	IL-4	A647	Red: 640C	670/14
	IL-17A	FITC	Blue: 488B	530/30
	IFN-γ	A700	Red: 640B	730/45
	Foxp3	PE	Yellow/Green: 561E	586/15

3.1.5 Citometria de fluxo

Após marcação, as amostras, bem como os controles, foram lidos em citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD biosciences). Como controle foram utilizadas marcações individuais para compensação, bem como o fluorescence-minus-one (FMO). Os dados obtidos após leitura integral das amostras foram analisados no FlowJo V10.1 (Tree Star, Ashland, OR).

Para identificação das sub-populações de linfócitos T auxiliares foi adotada a seguinte estratégia de seleção: **i.** foram selecionadas a população de linfócitos com base no tamanho e granulosidade dessas células (SSC-A e FSC-A) (**Figura 25, A**); **ii.** foram selecionados os singlets (**Figura 25, B**); **iii.** foi realizada seleção de linfócitos T CD4+ vivos (**Figura 25, C**); **iv.** foram selecionados linfócitos T auxiliares ativados (CD4+ CD44^{hi}) (**Figura 25, D**). Após essa seleção, foi avaliada o percentual de células T CD4+ Foxp+, IFN- γ +, IL-17A+ ou IL-4+. Quantificação total de cada sub-população foi aferida multiplicando-se o percentual pelo total de linfócitos contido na amostra inicial, quantificado em câmara de Neubauer.

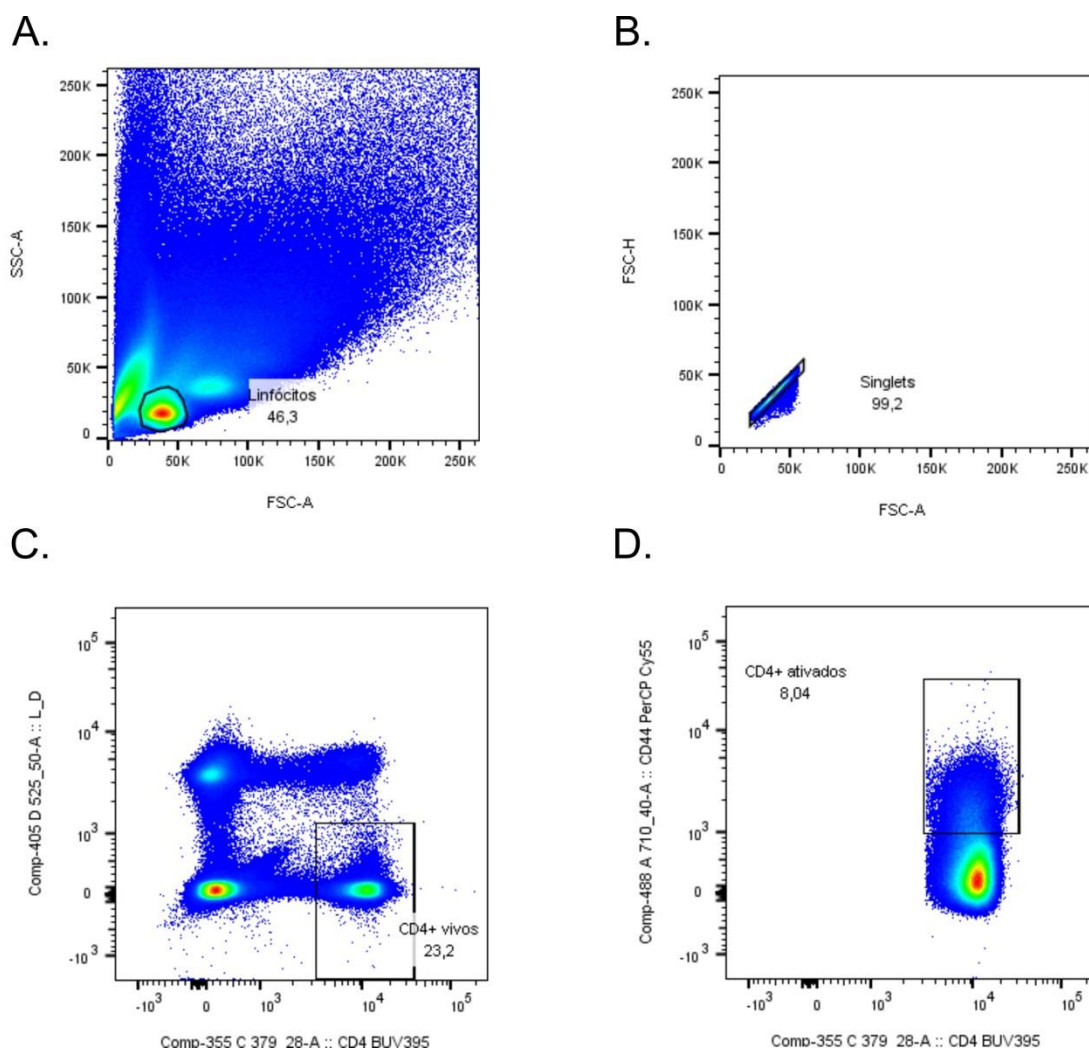


Figura 25. Estratégia de seleção para análise de sub-populações de linfócitos T. Para posterior análise da presença de marcadores intracelulares, foram selecionados linfócitos (A), isolados (B), vivos (C) e ativados (D).

3.1.6 Ensaio de neutralização/depleção com anticorpos monoclonais

Visando avaliar o papel da IL-17A, IFN- γ e dos linfócitos CD25+ (principalmente Treg) no curso da CBM murina, ensaio de neutralização/depleção foram realizados por meio do tratamento a cada 3 dias, por via endovenosa, com 100 μ g de anticorpos monoclonais anti-IL-17A (clone 17F3), anti-IFN- γ (clone XMG1.2) e anti-CD25 (clone PC-61.5.3). Como controle foi utilizado isotipo controle (IC) anti-rato IgG1 (clone HRPN). Tratamento com 20 μ g de anticorpos também foi realizado

intralesionalmente a cada 3 dias. Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa BioXCell (West Lebanon, USA).

3.1.7 Ensaio com células repórteres e estimulação com formas do fungo *F. pedrosoi*.

Células T B3Z, portando construção NFAT-lacZ foram fornecidas pelo Dr. Nilabh Shastri (Universidade da Califórnia, Berkeley, CA). A construção e a utilização de células B3Z expressando Dectina-3 (também denominado MCL, Clecsf8 ou Clec4d), Dectina-2 ou FcR, assim como células BWZ expressando Dectina-1, encontram-se descritos na literatura [124,182–185].

As células B3Z/BWZ foram estimuladas em placa de 96 poços com conídios, fragmentos de hifas e células muriformes do fungo *F. pedrosoi* na concentração de 1:1. 10^5 células foram incubadas por 18 horas a 37° C e a atividade da LacZ foi mensurada após lizado total das células foi utilizando Clorofenol red- β -D-galactopiranosídeo - CPRG (Roche) como substrato. A placa foi lida em leitora de microplacas (OD 560 nM).

3.1.8 Análise estatística

Diferenças no número ou na percentagem de células T produtoras de citocinas, bem como na recuperação de unidades formadoras de colônia entre os grupos experimentais, foram analisadas utilizando o teste t, para comparação entre duas populações, ou análise da variância (ANOVA), seguida pelo método *Bonferroni post-tests* (pós teste), realizado no programa estatístico GraphPad Prism, versão 6.0, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Design Experimental – Capítulo III



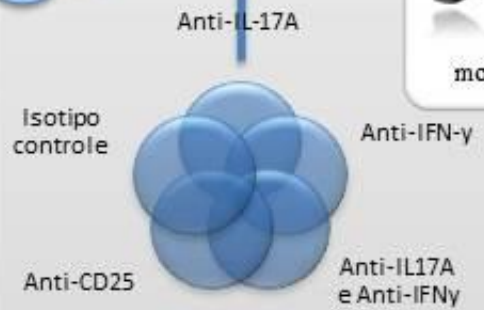
Formas fúngicas de *F. pedrosoi*



Após 7, 14, 21 e 28 dias de infecção



A cada 3 dias



18h de co-cultivo



Ensaio *in vivo* para identificação das subpopulações de linfócitos TCD4+ e ensaio *in vitro* utilizando células reporteras.

Figura 26. Esquemática dos experimentos realizados no âmbito do Capítulo III.

3.2 Resultados e Discussão

3.2.1 Infecção com propágulos de *F. pedrosoi* induz intensa migração de Linfócitos T auxiliares para o sítio de infecção

A importância da imunidade mediada por células na proteção do hospedeiro tem sido descrita para várias infecções fúngicas, tais quais: criptococose [186], paracoccidioidomicose [187], histoplasmose [188] e candidíase [189]. Entretanto, a resposta imune celular na CBM tem sido pobremente estudada, carecendo de maiores investigações.

Análise da população de linfócitos T presentes no linfonodo drenante (poplíteo) no curso da CBM murina não evidenciou qualquer alteração no balanço populacional entre as células T CD4⁺ e T CD8⁺ (**Figura 27, A-B**), embora o número total de linfócitos T tenha aumentado ao longo do tempo (**Figura 27, C**). Entretanto, analisando a população de linfócitos T presentes no sítio de infecção (coxim plantar) é possível observar uma migração significativamente maior de linfócitos T CD4⁺, em comparação aos linfócitos T CD8⁺ (**Figura 27, D**), instilando um possível papel dessas células na resposta imune na CBM.

A relevância dos linfócitos T CD4⁺ no curso da CBM foi primeiramente enfatizada no trabalho de Souza e colaboradores (2006), onde animais *knockout* (KO) para linfócitos T CD4⁺ apresentaram CBM murina muito mais severa do que os animais selvagens. Por outro lado, animais T CD8⁺ KO não mostraram diferenças significativas no curso da doença [113].

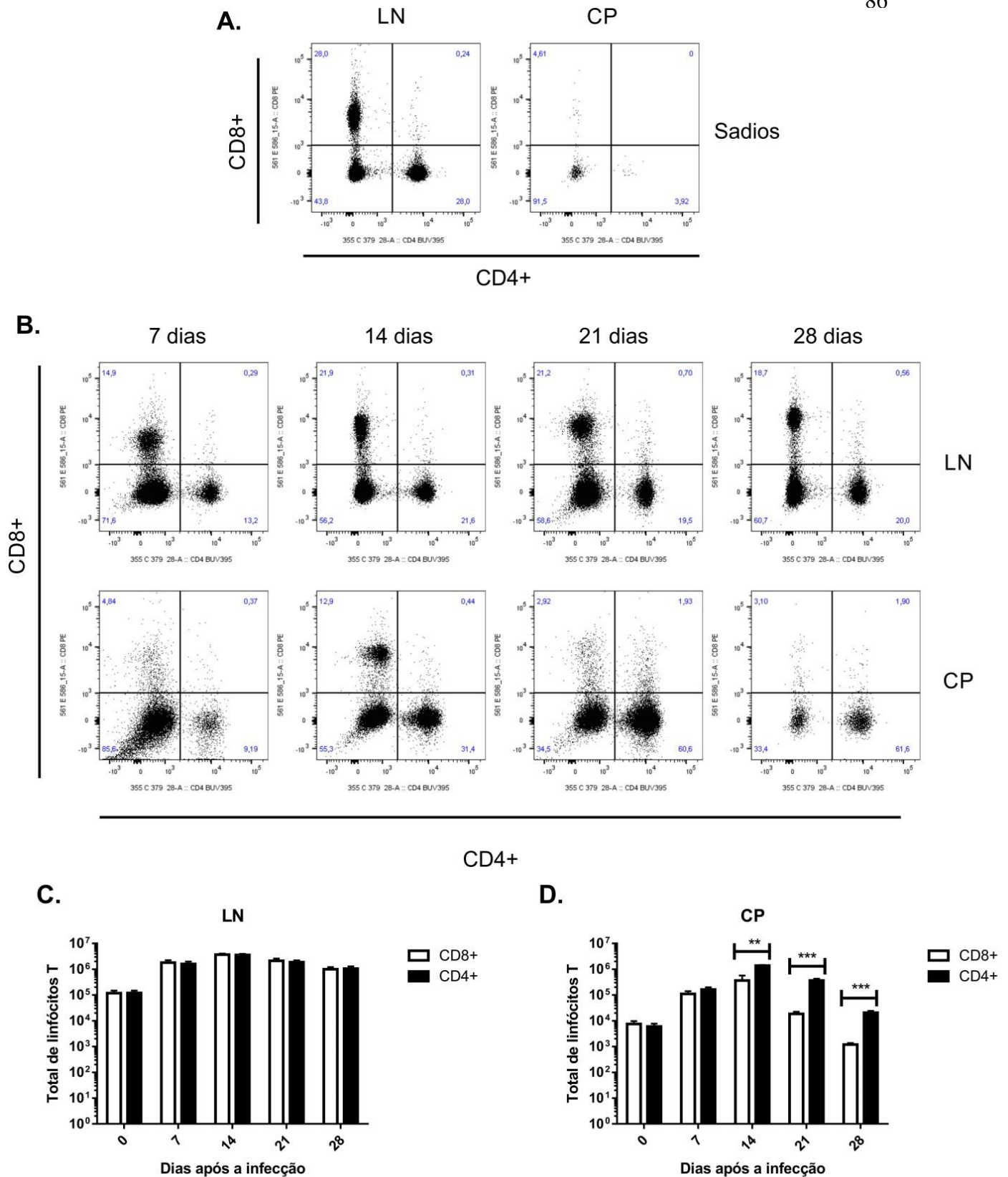


Figura 27. Quantificação do percentual da população de linfócitos T presentes no linfonodo drenante – poplíteo - (LN) quanto no coxim plantar (CP) de animais sadios (A) e de animais infectados com propágulos do fungo *F. pedrosoi* (B). Número total de linfócitos T CD4+ e de CD8+ presentes no linfonodo drenante (C) ou no sítio de infecção (D). Dotplots foram gerados considerando os dados concatenados de todos os animais presentes no grupo experimental (A-B). **P<0,01 e ***P<0,001

3.2.2 Grande parte dos linfócitos T CD4+ no linfonodo drenante expressam Foxp3 durante a CBM murina

Para avaliar o perfil das subpopulações de linfócitos T CD4+ no curso da CBM, linfócitos totais foram isolados do linfonodo drenante (poplíteo) e do sítio de infecção (coxim plantar), e submetidos à análise em citômetro de fluxo. Identificação de linfócitos T CD4+ ativos (CD44^{hi}) expressando o fator de transcrição Foxp3+ ou produtores de IL-17A, IFN- γ e IL-4 foram utilizados como indicadores das subpopulações Treg, Th17, Th1 e Th2, respectivamente.

Análise das subpopulações de linfócitos T CD4+ presentes no linfonodo drenante de animais infectados mostraram um percentual elevado de linfócitos T CD4+ expressando Foxp3 (**Figura 28, B**), em comparação as demais subpopulações avaliadas. O mesmo padrão também é observado no linfonodo poplíteo de animais sadios onde há um percentual elevado de linfócitos T CD4+ Foxp3+ (**Figura 28, A**). Redução do percentual dessa população só é observada após 14 dias de infecção, retornando aos patamares iniciais após 21 dias, durante a fase de remissão do modelo murino (**Figura 28, B**).

Nos estágios iniciais da doença observa-se percentual maior de linfócitos Th17, com redução gradativa do percentual dessa população nos estágios mais tardios (**Figura 28, B**). O percentual da população de linfócitos Th1 no linfonodo apresentou um pequeno acréscimo após 14 dias de infecção, sendo que a população de linfócitos Th2 não sofreu alterações significativas no período estudado.

Embora seja observada uma expansão de todas as subpopulações estudadas durante a infecção, com a subsequente retração apenas na fase de remissão da doença, o perfil da população de linfócitos T CD4+ no linfonodo drenante não se altera, mostrando uma maioria de linfócitos T CD4+ expressando Foxp3+, seguidos por Th17, Th1 e por último Th2 (**Figura 28, C-E**).

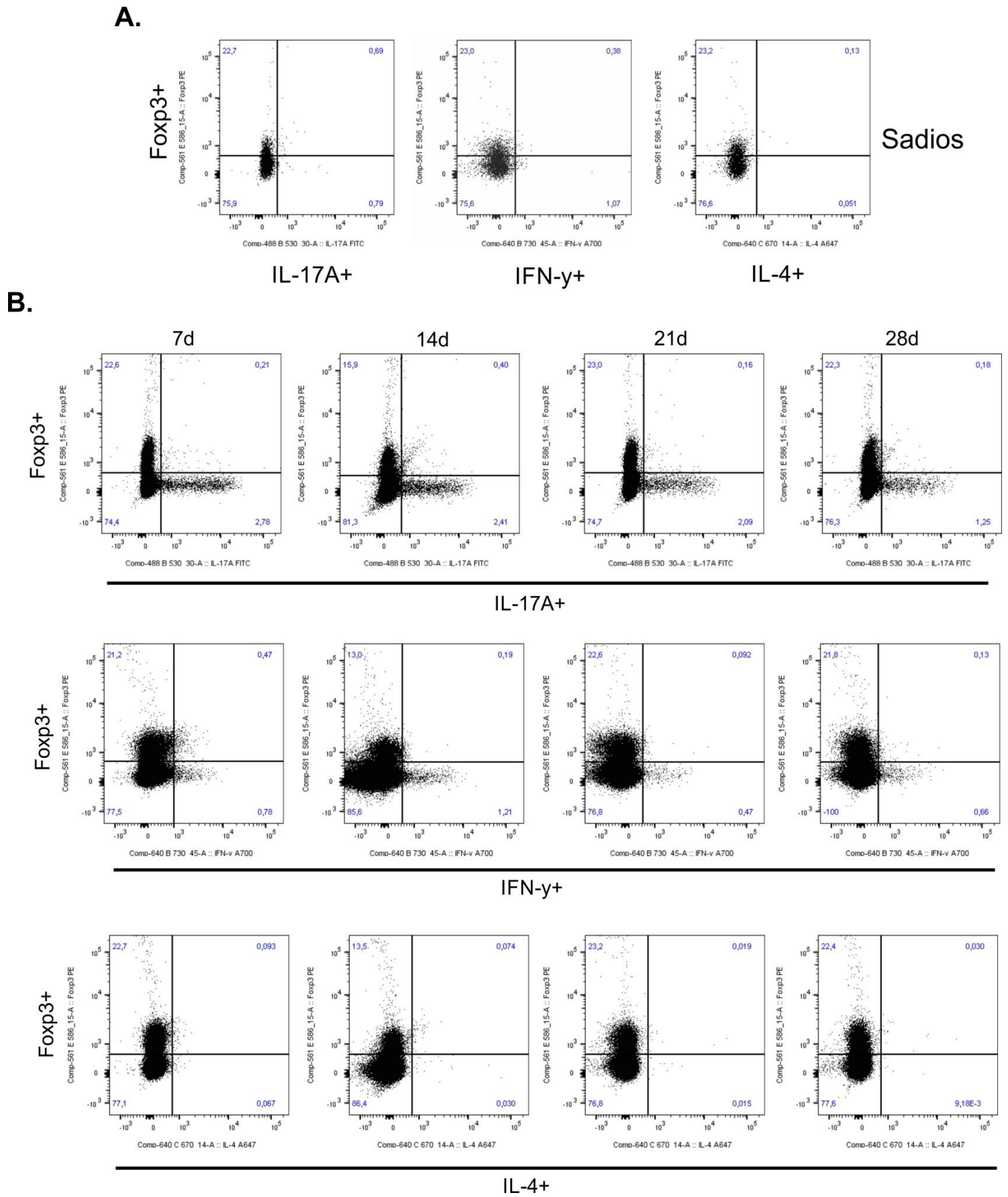
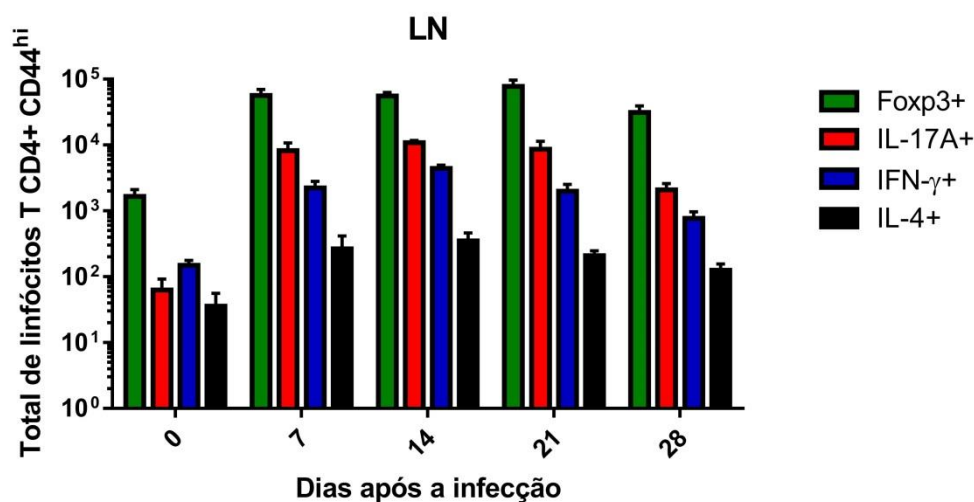
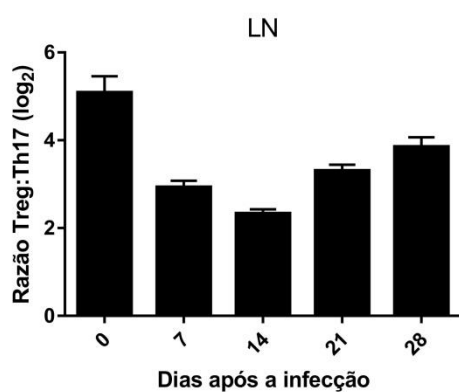


Figura 28. Análise da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ ativados no linfonodo poplíteo em animais sadios (A) e ao longo da CBM murina (B-C).

C.



D.



E.

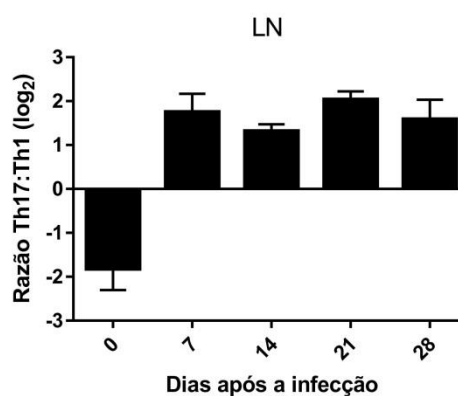


Figura 28 (continuação). Análise da subpopulação de linfócitos T CD4+ ativados no linfonodo poplíteo ao longo da CBM murina (B-C). Razão entre a população de linfócitos Treg:Th17 (D) e Th17:Th1 (E) no linfonodo poplíteo.

Estudos *in situ* em pacientes com a doença, bem como em modelos experimentais, mostraram a correlação entre a resposta Th2 e o desenvolvimento mais severo da doença, onde é observada grande produção de IL-10 e TNF α , aliados a alta carga fúngica. A forma mais branda da doença está relacionada com um perfil Th1, com alta produção de IFN- γ , baixos níveis de IL-10 e menor carga fúngica, além de granulomas mais compactos e melhor organizados resultando em lesões menos severas, geralmente na forma de placas [52,121]. Além dos padrões Th1 e Th2, subpopulações

de linfócitos T como Treg e Th17 também desempenham papéis relevantes no estabelecimento da resposta imune protetora aos fungos.

As Tregs são caracterizadas pela alta expressão de CD25 e pela expressão do fator de transcrição Foxp3, atuando tanto na modulação da resposta imune contra patógenos, quanto no controle da resposta imunológica aos antígenos próprios e não próprios [121,190,191]. Elemento chave na tolerância imunológica, as Tregs podem ser originárias do timo (naturais) ou serem geradas na periferia após uma variedade de estímulos antigênicos ou em condições ditas tolerogênicas (induzidas) [192]. Estas células exercem sua função através da liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β [190].

A atividade anti-inflamatória das Tregs tem sido descrita em infecções por fungos em modelos murinos e em humanos. Em modelos experimentais de infecções fúngicas tanto a inflamação, quanto o processo de tolerância no trato respiratório ou na mucosa do trato gastrointestinal, são controlados pela ação coordenada das Tregs [67]. Entretanto, considerando que a resposta mediada por Treg pode limitar a eficácia da resposta imune protetora, a consequência dessa ação pode ser a redução de danos aos tecidos, mas também a persistência do fungo, além de eventual imunossupressão [93,193].

Altas concentrações de TGF- β na presença de mediadores como o ácido retinóico direciona a resposta imune para o desenvolvimento de células T regulatórias. Por outro lado, baixas concentrações de TGF- β associadas com citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e IL-21 e IL-23 permitem a diferenciação de células T CD4⁺ em Th17, induzindo o fator de transcrição ROR γ T [194–196].

3.2.3 Predominância de Th17 no sítio da infecção é observada nos estágios iniciais da CBM murina, enquanto que a prevalência de Th1 ocorre nos estágios mais tardios

Análise das subpopulações de linfócitos T CD4+ presentes no sítio de infecção mostrou um padrão dinâmico na frequência e no total de linfócitos T CD4+ expressando Foxp3+, Th17, Th1 e Th2, conforme o estágio da infecção (**Figura 29**).

A frequência de Th17 é aumentada consideravelmente aos 7 dias de infecção, sendo a população predominante nessa fase inicial da doença (**Figura 29, A-B**). Após esse período, a frequência dessa população é reduzida gradativamente, sendo substituído por Th1, que se torna a população prevalente após 21 dias de infecção, momento em que a doença encontra-se em fase de remissão no presente modelo experimental. Esse fenômeno também é observado em termos de números totais dessas populações no sítio de infecção (**Figura 29, C-E**). A população de linfócitos T CD4+ Foxp3+ acompanha a mesma dinâmica observada no linfonodo onde se observa uma redução dessa população no estágio intermediário da doença (entre 7 e 21 dias de infecção).

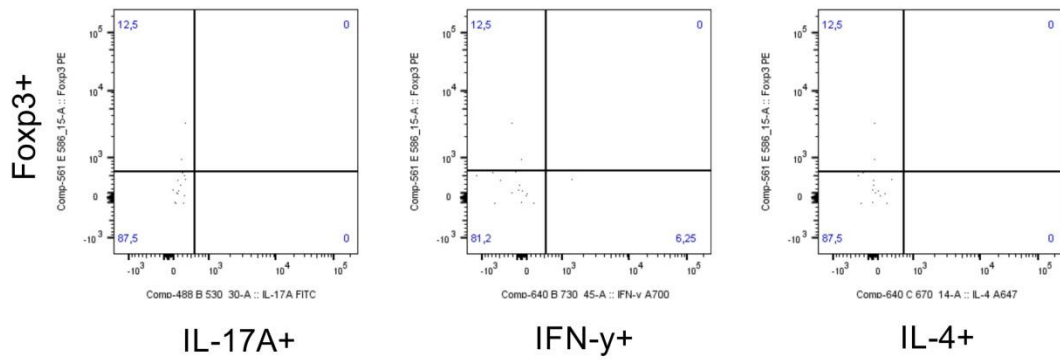
Analisando mais uma vez a quantificação das formas do fungo na lesão apresentada no Capítulo I para os animais infectados com propágulos do fungo *F. pedrosoi* (**Figura 9, D**), é possível notar que após a fase inicial da doença a quantidade de hifas encontradas no tecido é reduzida significativamente, não se devendo apenas à sua transformação em células muriformes, mas também à sua eliminação do tecido. Esse fato, associado com o aumento da população de Th17 nesse estágio da infecção, revela um papel importante dessa população nas fases iniciais da doença. Interessante notar que nos estágios mais tardios ocorre a eliminação das células muriformes no tecido, ao mesmo tempo em que é observada a expansão da população Th1 no sítio de infecção, evidenciando a importância dessa população na resolução da doença.

3.2.4 Neutralização de IL-17A e IFN- γ prejudica a eliminação do fungo no curso da CBM murina

Visando confirmar a importância de Th17 e Th1 no curso da CBM murina, animais C57bl6, machos, entre 6 e 8 semanas de idade foram infectados com propágulos do fungo *F. pedrosoi* e tratados a cada três dias com anticorpo monoclonal anti-IL-17A e anti-IFN- γ , tanto pela via endovenosa, quanto pela via intralesional.

Animais tratados com anti-IL-17A mostraram índices maiores de recuperação de unidades formadoras de colônia após sete dias de infecção, sendo superado apenas pela neutralização conjunta com IFN- γ (**Figura, 30**). Após esse período, a neutralização de IL-17A não teve impacto significativo na recuperação do fungo da lesão. Por sua vez, neutralização de IFN- γ após 14 dias e neutralização conjunta de ambas as citocinas prejudicaram a eliminação do fungo nos estágios mais tardios da doença, de modo que apenas esses grupos apresentaram CFU após 28 dias de infecção (**Figura, 30**).

A.



Sadios

B.

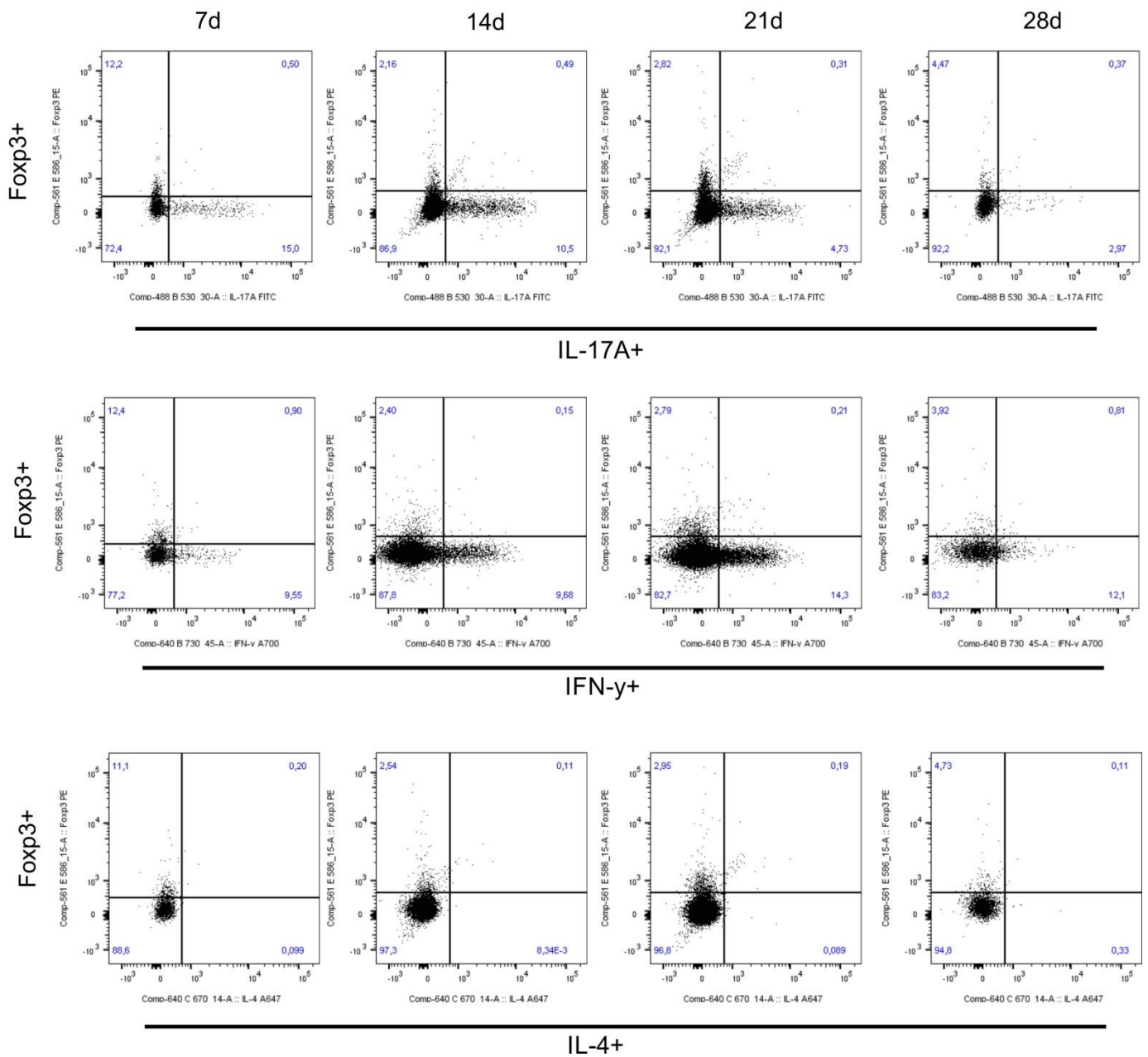


Figura 29. Análise da subpopulação de linfócitos T CD4+ ativados presentes no coxim plantar de animais sadios (A) ou ao longo da CBM murina (B-C).

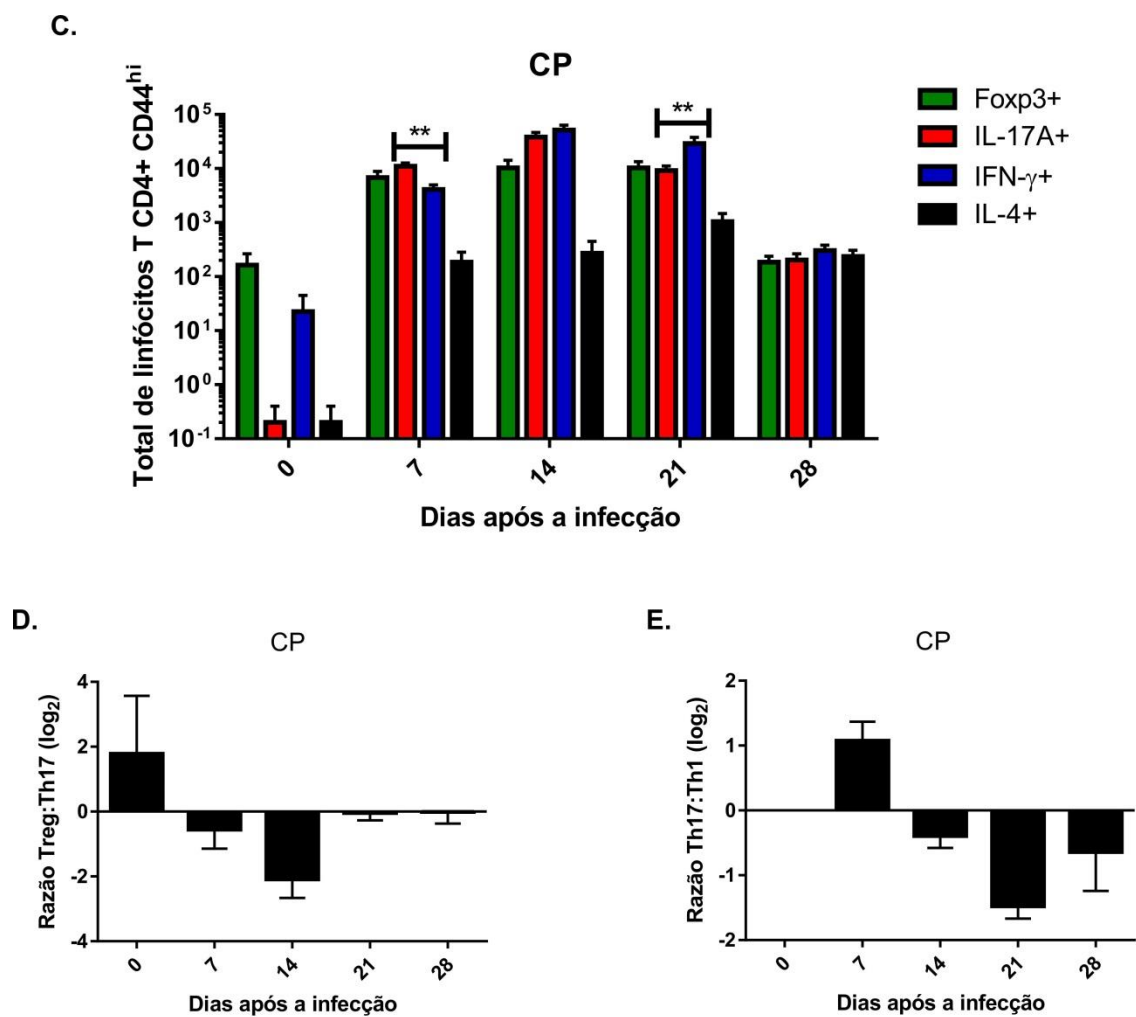


Figura 29 (continuação). Análise da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ ativados no coxim plantar ao longo da CBM murina (B-C). Razão entre a população de linfócitos Treg:Th17 (D) e Th17:Th1 (E) no coxim plantar. **P<0,01

Tais resultados, em conjunto com a análise das populações de linfócitos T auxiliares presentes no sítio de infecção, denotam certo dinamismo das populações Th17 e Th1 no curso da infecção, de modo que perturbações nesse sistema podem levar à não resolução da doença no modelo murino.

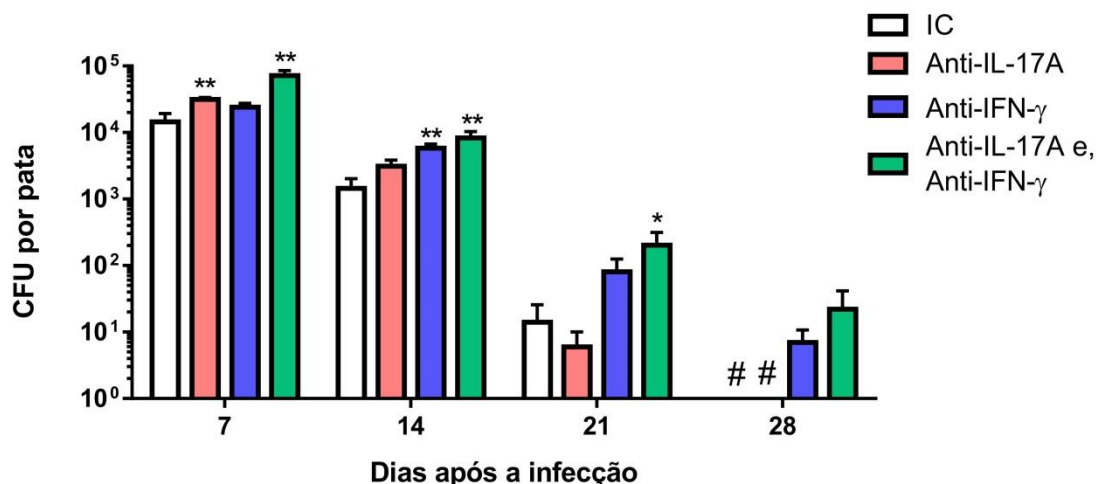


Figura 30. Quantificação das unidades formadoras de colônia presentes no coxim plantar de animais infectados com propágulos de *F. pedrosoi* e tratados por via endovenosa ou intralésional com anti-IL-17A, anti-IFN- γ , sozinhos ou em associação. Isotipo controle (IC) foi utilizado como controle experimental. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

3.2.5 Dectina-2 e Dectina-1 são os principais CLRs capazes de reconhecer as diferentes formas do fungo *F. pedrosoi*.

A imunidade contra agentes patogênicos necessariamente passa pelo reconhecimento de PAMPs presentes nos patógenos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), disparando uma cascata de sinalização capaz de iniciar e direcionar as respostas tanto da imunidade inata quanto da adaptativa. Nas infecções fúngicas, tais respostas são mediadas principalmente por membros da família de receptores do tipo C-lectina [165]. CLRs são parte de uma superfamília heterogênea de proteínas transmembrânicas caracterizadas por um domínio de lectina tipo C [197], ligando-se a maioria, senão todas as espécies de fungos capazes de causar doença em humanos. Tais receptores reconhecem as principais estruturas de carboidratos presentes na parede celular de fungos, incluindo β -glucanas e mananas [198].

Dentre os CLRs capazes de sinalizar o reconhecimento de estruturas fúngicas estão: dectina-1, dectina-2, o receptor de manose (MR), DC-SIGN e mincle [159]. Enquanto dectina-1 reconhece β -glucanas, os demais receptores podem se ligar a uma variedade de estruturas baseadas em manose encontradas nas camadas de mananas da parede celular dos fungos. As respostas mediadas por esses receptores incluem a fagocitose, indução de mecanismos efetores antifúngicos e a produção de vários mediadores solúveis, incluindo citocinas, quimiocinas e lipídios inflamatórios [199]. Esses receptores são responsáveis, ainda, por direcionar e modular o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, principalmente as respostas Th1 e Th17 [200,201].

Para avaliar quais CLRs são de fato capazes de reconhecer as formas do fungo *F. pedrosoi*, foram realizados ensaios utilizando células repórteres⁵ capazes de sinalizar o reconhecimento de antígenos fúngicos por CLRs, por meio da atividade da lacZ (**Figura 31**).

Em resposta a estimulação com células do fungo, foi observado aumento na atividade da lacZ principalmente na interação de hifas do fungo com células repórteres expressando dectina-2 (**Figura 31, D**) e, em menor escala, dectina-1 (**Figura 31, B**). Esse resultado é consistente com o observado por Sato e colaboradores, o qual mostrou que dectina-2 se liga preferencialmente a forma de hifa de *C. albicans* [202]. Mas de modo geral tanto conídio, quanto células muriformes também foram capazes de estimular esses receptores (**Figura 31, B e D**)

⁵ Linfócitos T transgênicos, expressando receptor do tipo lectina C portando construção NFAT-lacZ β -galactosidase, capaz de reportar a sinalização de ITAM.

3.2.6 Animais dectina-2 KO tem redução da carga fúngica prejudicada nos primeiros 15 dias de infecção sem, contudo, afetar a resolução da doença

Estudo recente mostrou que conídios de *F. pedrosoi* eram capazes de induzir a diferenciação de Th17 em camundongos, sendo essa diferenciação promovida pela via de sinalização envolvendo o reconhecimento do fungo pelo receptor dectina-2 [124]. Considerando que dectina-2 está diretamente associada com a diferenciação de linfócitos Th17, foi avaliada a hipótese de que animais dectina-2 KO seriam mais suscetíveis à infecção por *F. pedrosoi*.

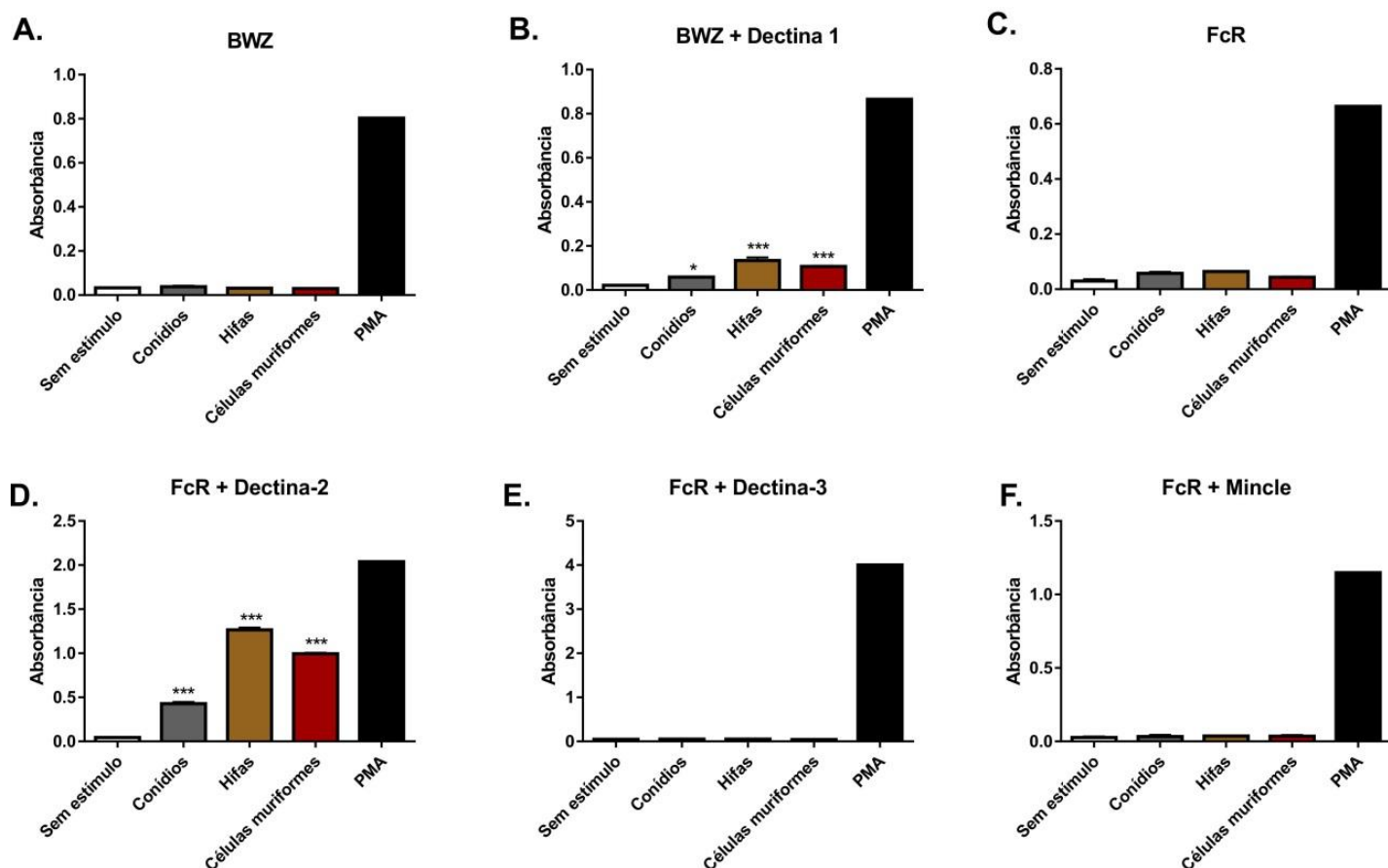


Figura 31. Ensaio de interação entre formas do fungo com células repórteres expressando CRLs e portando construção NFAT-lacZ. Foram avaliadas interação com células expressando dectina-1 (B), dectina-2 (D), dectina-3 (E) e mincle (F). Células sem expressão de CRL (A) ou expressando apenas FcR (C) foram utilizadas como controles. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$

Conforme esperado, animais deficientes na expressão de dectina-2 (dectina-2 $-/-$) infectados com propágulos do fungo *F. pedrosoi* apresentaram redução do percentual da população de Th17 tanto no linfonodo drenante quanto no sítio de infecção no tempo de 7 dias após a infecção (**Figura 32, A**). Interessante notar que a redução da população Th17 também foi acompanhada de redução da população de linfócitos T CD4⁺ Foxp3⁺ (**Figura 32, A**). Redução do percentual de Th17 também pode ser observada no coxim plantar dos animais KO nos tempos de 14 e 21 dias de infecção. Redução da diferenciação de Th17 em animais dectina-2 KO também pode ser verificada ao se avaliar o total de linfócitos presentes, tanto no linfonodo drenante quanto no coxim plantar (**Figura 32, B**). Nenhuma alteração foi observada na população de Th1 no curso da CBM em animais dectina-2 KO.

Análise morfométrica no curso da doença dos animais KO mostraram padrão semelhante ao observado em animais selvagens, diferindo levemente na intensidade da resposta inflamatória observada por meio do diâmetro da pata no curso da infecção (**Figura 33, A e C**). Entretanto, nos animais dectina-2 KO a redução da carga fúngica encontra-se prejudicada no tempo de 15 dias, sendo normalizada na fase resolutiva da doença (**Figura 33, B**).

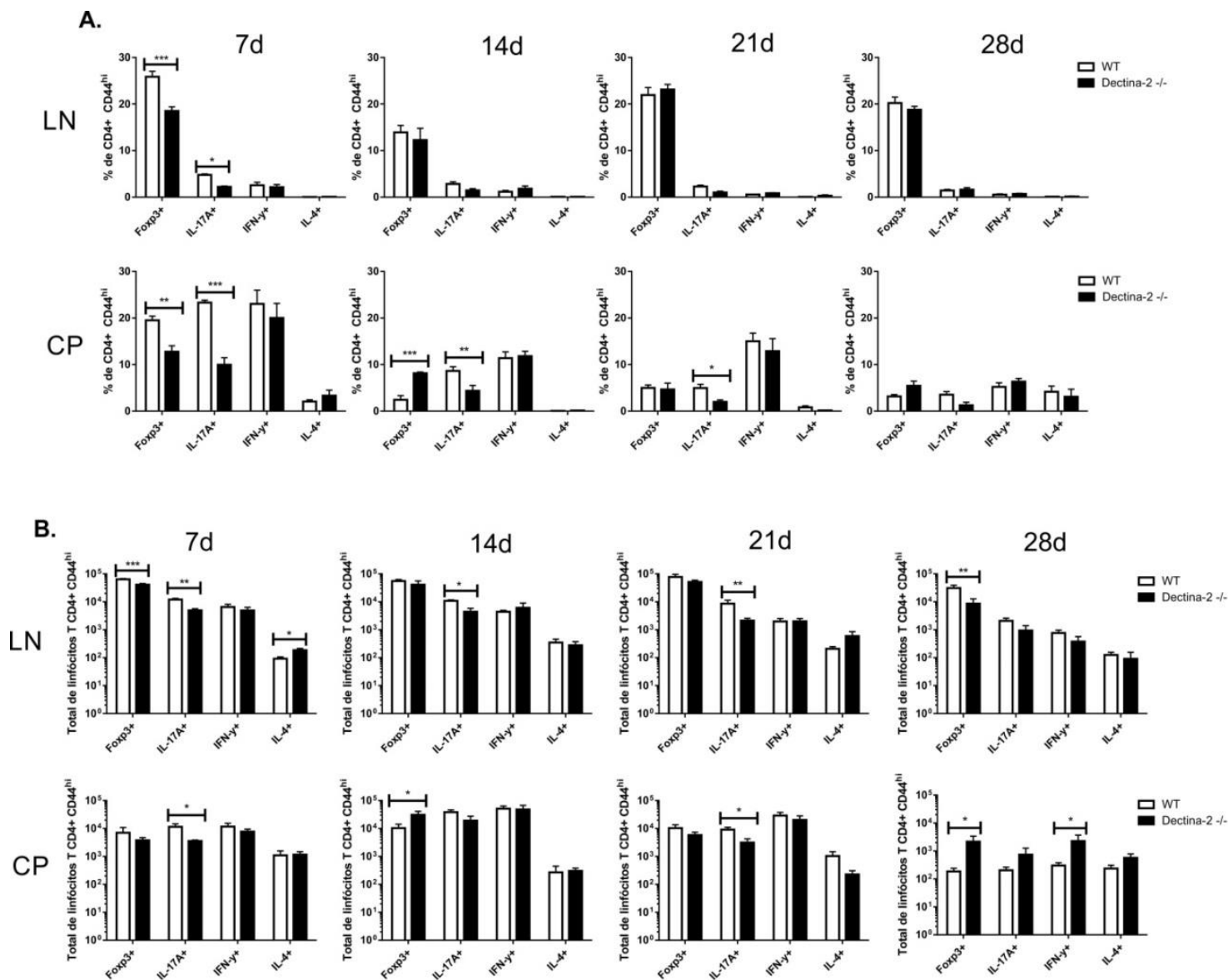


Figura 32. Análise da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ em animais dectina-2 KO, mostrando os percentuais (A) e o total de células (B) referentes a cada uma das subpopulações estudadas tanto no linfonodo (LN) drenante quanto no coxim plantar (CP). *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001

A redução na população de Th17, observada nos animais dectina-2 KO no estágio mais tardio da CBM murina, não impactou no processo de resolução da doença de modo que após 28 dias não foi mais detectado CFU na pata dos animais infectados, seja no grupo KO, seja no grupo selvagem. Tais resultados são importantes, pois delimita a eficácia da polarização de Th17 aos estágios iniciais de infecção. Resta saber,

por outro lado, se a polarização de Th17 nos estágios mais tardios da doença seria prejudicial ao processo de remissão da doença uma vez que também favorece o estabelecimento de um microambiente inflamatório.

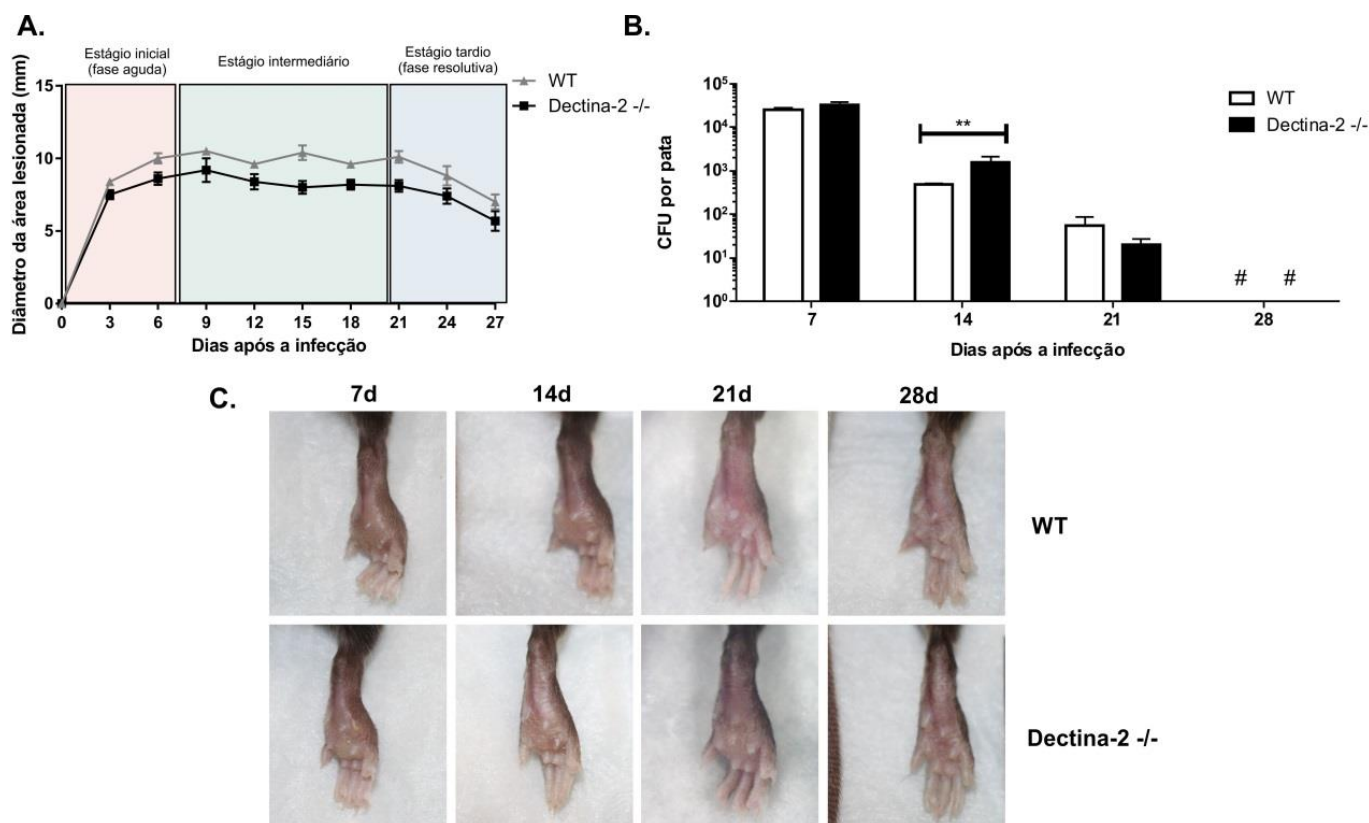


Figura 33. Análise morfométrica (A e C) e quantificação de CFU (B) no curso da CBM em animais *dectina-2* KO e WT. ** $P < 0,01$

Altos índices de células Th17 podem atuar como protagonistas na imunidade contra agentes infecciosos em condições inflamatórias, uma vez que essa população, ao menos em parte, pode aprimorar a resposta imune, agindo em concomitância com os padrões de resposta Th1 e Th2 [203]. Entretanto, estudos recentes mostraram que linfócitos produtores de IL-17 em associação com a produção de IL-23 estão envolvidos nos danos autoimunes causados na encefalomielite experimental alérgica, na artrite induzida por colágeno e na doença inflamatória intestinal [204]. IL-23 direciona o desenvolvimento de Th17 promovendo o desenvolvimento de processos inflamatórios

crônicos dominados pela presença de IL-17, IL-6, IL-8 e TNF α , bem como pela intensa atividade de neutrófilos e monócitos [204].

Estudos *in situ* em lesões de pacientes com CBM revelaram um quantitativo significativamente maior de IL-17 nesses pacientes, quando comparados com outras micoses como a paracoccidiodomicose [123]. Não só isso, lesões da CBM também são caracterizadas pela intensa resposta monocítica e neutrofílica, além da presença de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β , TNF α e IL-6 [175,205].

Muito embora a resposta inflamatória compreenda um importante componente na imunidade aos fungos, a sua desregulação pode ser ainda pior nas infecções fúngicas. Já foi visto que a via de resposta mediada por IL-23 e IL-17 pode atuar como regulador negativo da resistência aos fungos mediada por Th1, promovendo resposta inflamatória exacerbada atribuída até então às células do padrão Th1. Tanto a inflamação quanto a própria infecção são exacerbadas quando há expansão desregulada de Th17, em resposta aos fungos *C. albican* e *A. fumigatus*. Nesses modelos de infecção, IL-23 e IL-17 foram capazes de subverter a imunidade mediada por neutrófilos resultando em patologia inflamatória severa no tecido, associada com a infecção [181].

Assim, considerando que o processo inflamatório induzido por IL-23 e IL-17 pode favorecer o processo de infecção e prejudicar a imunidade aos fungos, modulação da resposta inflamatória representa uma estratégia em potencial para estimular a imunidade a essa classe de patógenos.

3.2.7 Depleção de células CD25+ repercute em maior redução da carga fúngica nos primeiros 15 dias de infecção, todavia se opõe ao processo de remissão da doença observada no modelo murino

A regulação da resposta imune de maneira adequada é essencial para o controle da resposta imunológica no curso das infecções, minimizando os eventuais danos decorrentes de uma resposta exacerbada, prevenindo-se igualmente patologias auto-imune. As células T reguladoras (Treg), caracterizadas pela alta expressão de CD25 e comandadas pelo fator de transcrição Foxp3, são responsáveis por limitar a auto-imunidade e a inflamação crônica [206]. Sendo assim, investigar a atuação dessa população no âmbito da CBM se torna extremamente relevante, uma vez que a doença cursa com processo inflamatório crônico, não sendo capaz de eliminar completamente o fungo das lesões [129].

Para avaliar o papel das células Treg no curso da CBM murina foi utilizado modelo de depleção dessa população pelo tratamento endovenoso e intralesional de anticorpos monoclonais anti-CD25. Em que pese as limitações do uso desse modelo, muito pelo fato de que outros linfócitos ativados também expressam CD25 em sua superfície, depleção de Treg com anti-CD25 tem sido empregado como modelo alternativo na ausência de animais transgênicos com depleção seletiva de Treg [207,208].

Análise do perfil populacional de linfócitos T CD4+ em animais tratados com anti-CD25 mostra redução significativa na população T CD4+ expressando Foxp3, no coxim plantar e principalmente no linfonodo poplíteo (**Figura 34, A-B**). Entretanto, o tratamento com anti-CD25 não foi capaz de alterar significativamente a frequência de Th1, Th17 ou Th2 no curso da infecção (**Figura 34, B**).

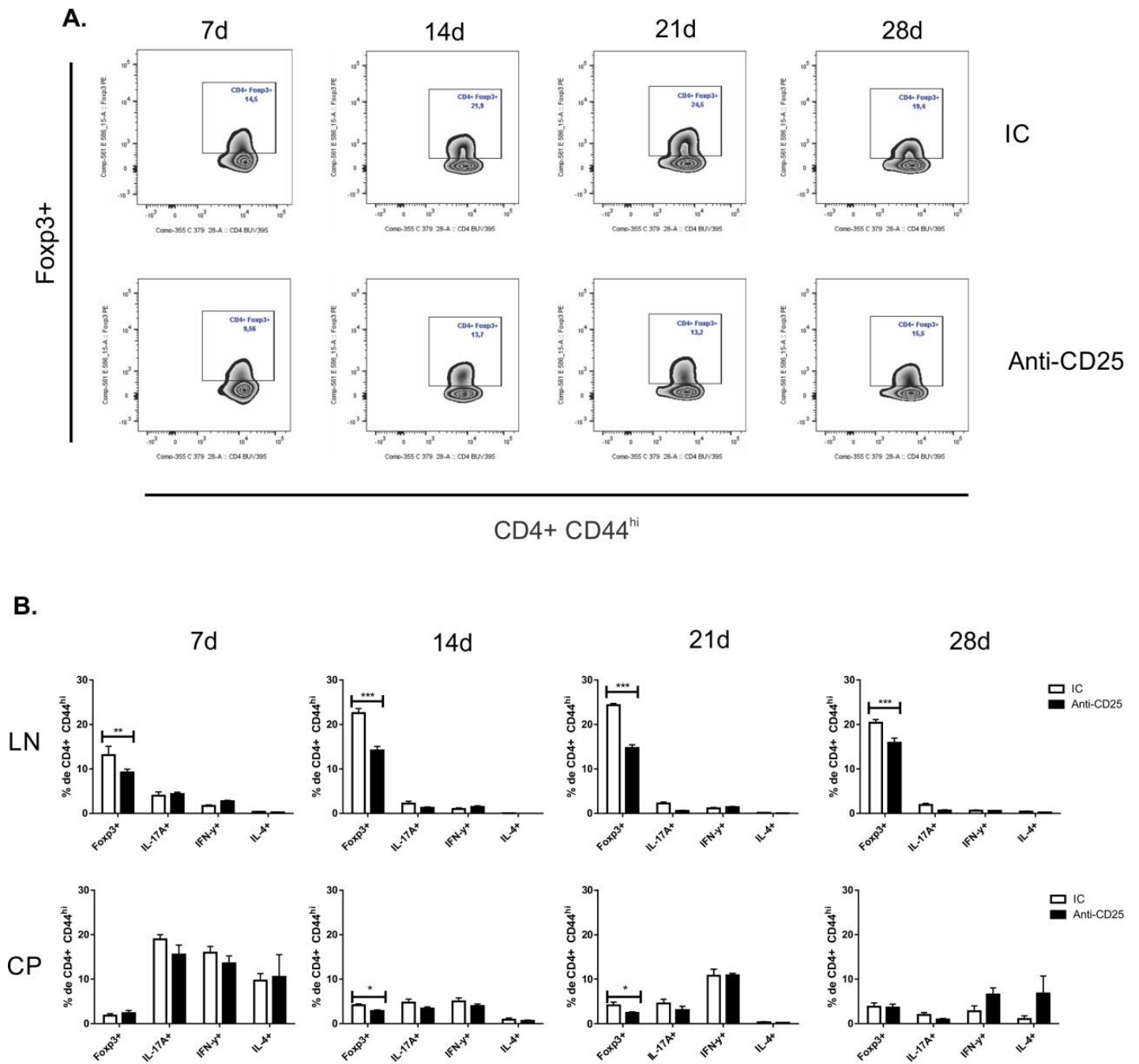


Figura 34. Avaliação do percentual de linfócitos T CD4+ ativos expressando Fopx3 no linfonodo de animais tratados com anti-CD25 ou isotipo controle (IC) (A). Percentual das demais subpopulações tanto do linfonodo (LN) drenante quanto no coxim plantar (CP) também é mostrado (B). **P<0,01 e ***P<0,001

Considerando que o tratamento com anti-CD25 não repercutiu necessariamente na eliminação total de células CD25⁺ e, visando confirmar se o tratamento com anti-CD25 de fato repercutiu em redução da população de Treg, foi procedida seleção dos linfócitos CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, dentre a população de CD4⁺ CD44^{hi} CD25 presente no linfonodo dos animais tratados (**Figura 35, A**). Conforme esperado, a população de Treg encontra-se drasticamente reduzida nos animais tratados com anti-CD25 em comparação com aqueles tratados com isotipo controle (**Figura 35, B-C**).

Ao se avaliar o curso da doença em ambos os grupos é possível notar a manutenção do processo inflamatório nos animais tratados com anti-CD25, por um tempo maior comparado aos animais controles (**Figura 36, A e C**). Já análise de CFU mostra uma redução significativa na carga fúngica nesses animais no período de 15 dias após a infecção (**Figura 36, B**).

Entretanto, a redução da carga fúngica observada após 15 dias de infecção em animais tratados com anti-CD25 não repercutiu em processo de remissão antecipada desses animais. Ao contrário, foi observado que após esse período os referidos animais não foram capazes de reduzir a sua carga fúngica no estágio tardio da infecção, favorecendo a persistência do fungo no tecido (**Figura 36, B**).

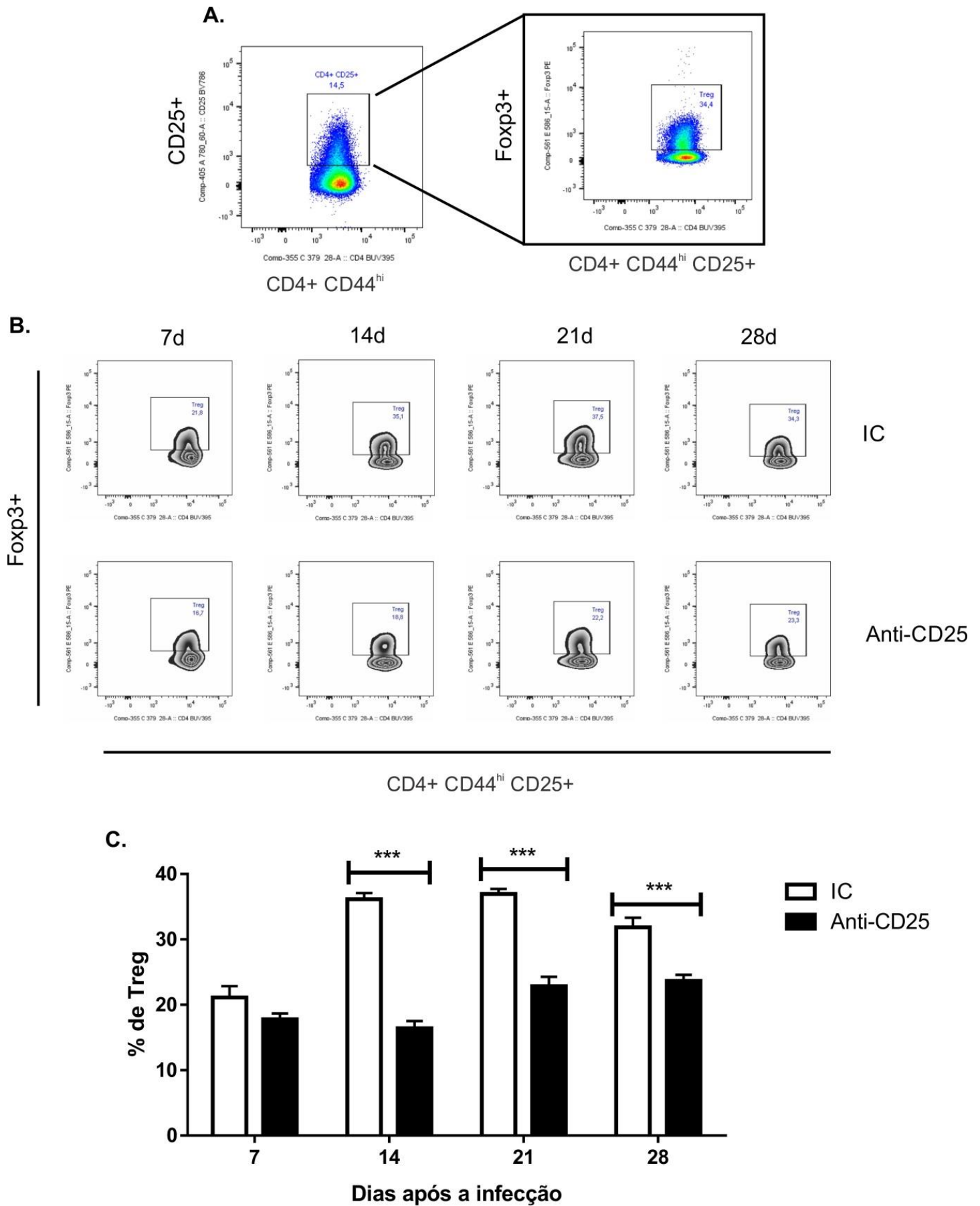


Figura 35. Confirmação da redução da população de Treg no linfonodo drenante (**B-C**) de animais tratados com anti-CD25, após seleção das células T CD4+ CD25+ Foxp3+ (**A**). ***P<0,001

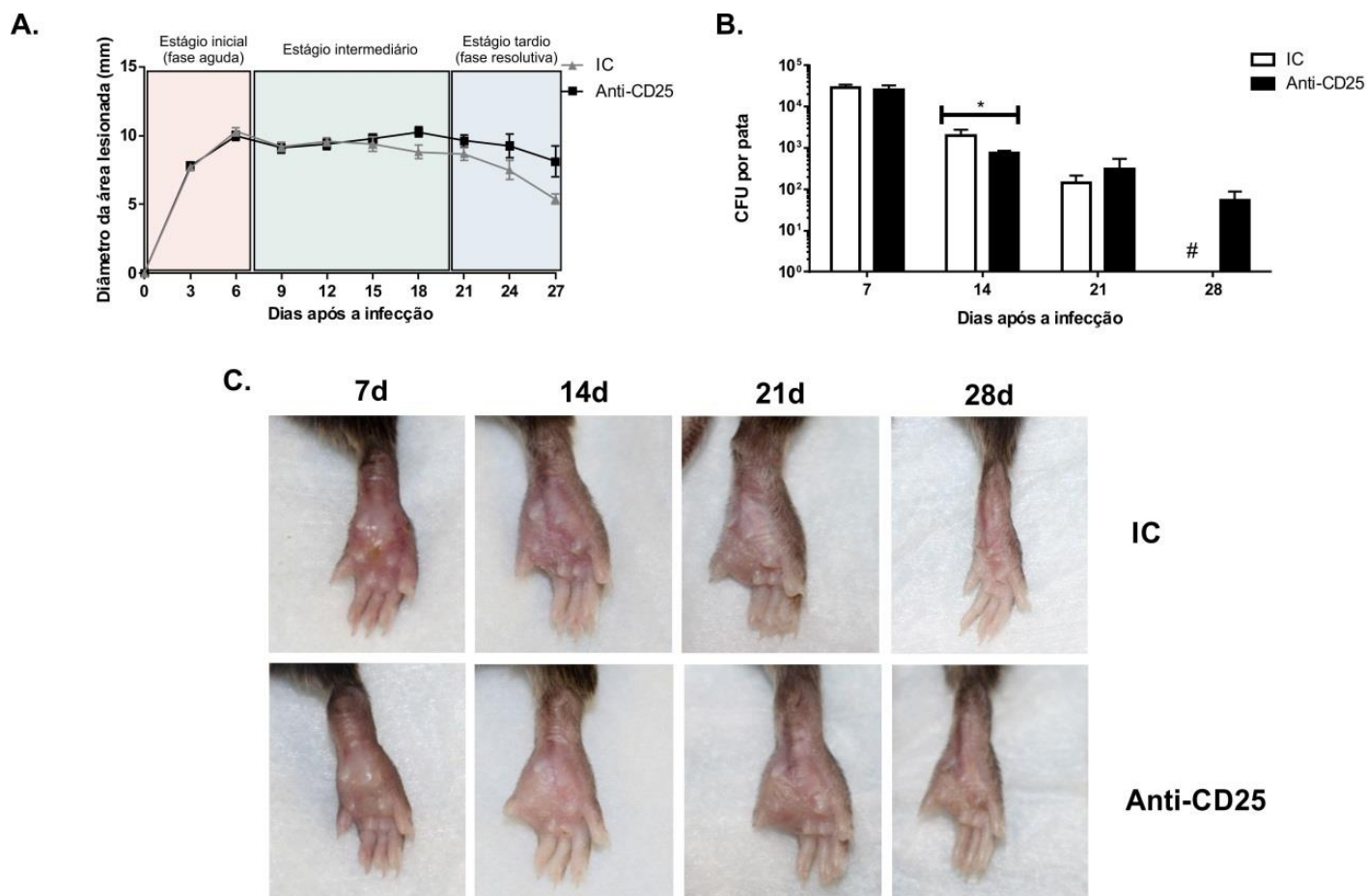


Figura 36. Análise morfométrica (A e C) e quantificação de CFU (B) no curso da CBM em animais com redução na população de Treg. * $P < 0,05$.

Análises *in situ*, por meio de imunohistoquímica de lesões de pacientes com CBM, revelaram uma quantidade significativamente menor de células Treg presentes na lesão desses pacientes em comparação a outras micoses, sendo semelhantes aos apresentados em indivíduos saudáveis [123]. Dessa forma, analisando esses resultados em conjunto com os dados mostrados no capítulo II, podemos concluir que a falha no controle da resposta inflamatória intensa, induzida pela presença de células muriformes no estágio tardio da infecção, pode estar relacionada com a falha na modulação da resposta imunológica do hospedeiro, repercutindo na permanência do fungo no tecido e na cronificação da doença.

Um número crescente de imunoterapias envolvendo a indução de Tregs, como aquelas utilizando rapamicina, IL-2 e anticorpos anti-células T têm sido testadas com sucesso em diversos aspectos clínicos. Essas terapias exercem seu efeito imunossupressor ao eliminar células T efetoras de modo a desequilibrar a balança em favor das células Treg [209]. Outra abordagem tem sido a expansão *ex vivo* de Tregs para posterior administração em pacientes. Métodos de expansão de Tregs envolvem protocolo com cultura de 14 dias com anti-CD3/28 e IL-2. As células expandidas em cultura são capazes de manter suas funções imunossupressoras e possuem características consistentes com Tregs naturais, incluindo alta expressão de CD25 e Foxp3 [210]. Testes clínicos administrando células Tregs expandidas à pacientes já tem sido utilizado como meio de suprimir a resposta autoimune e favorecer o desenvolvimento de tolerância [211].

Nesse sentido, futuras terapias no tratamento da CBM poderão ser desenvolvidas com base na modulação da resposta imune, por meio de células T reguladoras, reduzindo a resposta inflamatória exacerbada e direcionando a resposta efetora para aquela que seria mais efetiva no tratamento da doença.

Considerações Finais, Conclusões e Perspectivas

Os fungos são organismos ubíquos, de modo que todos os dias somos expostos à diferentes fungos, alguns inclusive com potencial infectivo. Devido à prevalência desses microorganismos em vários ambientes e à baixa incidência de patogenicidade, não é raro subestimar a sua importância na saúde pública. Na verdade, os fungos podem ser patógenos formidáveis e quando dado a oportunidade de causar infecções, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, podem estabelecer doenças severas, cujo tratamento pode se prolongar por uma vida e para as quais as técnicas atuais de diagnóstico e as opções de terapia são inaceitavelmente limitadas [212]. Infecções na pele, nas unhas e nas mucosas ocorrem em aproximadamente em 25% da população mundial e embora a incidência de infecções fúngicas invasivas seja consideravelmente menor, elas são extremamente relevantes devido à alta taxa de mortalidade [212].

Embora a cromoblastomicose (CBM) não seja reconhecida por seu grau de letalidade, essa compreende uma importante micose subcutânea crônica, cujas complicações podem levar a destruição de órgãos linfáticos, hiperplasias e a eventual amputação de membros acometidos com a doença, causando, ainda, altos níveis de morbidade entre os pacientes acometidos com a doença [205]. A CBM é considerada uma das mais micoses mais difíceis de tratar, principalmente devido à sua natureza recalcitrante, sobretudo nas formas clínicas mais severas. O tratamento consiste geralmente de longos períodos de terapia com antifúngicos, comumente associados a tratamentos físicos como: cirurgias, crioterapia e termoterapia [54,213,214].

Considerando que a maioria dos estudos relacionados à CBM é realizada em pacientes com a doença já estabelecida, carecendo a literatura de maiores informações

acerca de sua patogenia e, ainda, por ser tratar de uma doença cujos índices de cura clínica e micológica variam grandemente de 15 a 80% [215], o presente trabalho foi executado visando ampliar a compreensão da imunopatologia da doença, avaliando-se a modulação da resposta inflamatória observada na CBM pelas formas do fungo *F. pedrosoi*.

Após infecção dos animais de experimentação com diferentes formas do fungo *F. pedrosoi* foi observado que células muriformes, ao contrário de conídios, são capazes de induzir intenso processo inflamatório no tecido, estando relacionadas com o aspecto inflamatório granulomatoso, característico da doença. Conídios, por sua vez, ao esquivar-se dos mecanismos inflamatórios da imunidade inata, contribuem para a adaptação do fungo ao hospedeiro e para o caráter oportunista geralmente observado nas infecções fúngicas [216].

Apesar da importância óbvia de alguns fatores de virulência, a patogenicidade não pode ser considerada como uma característica inerente dos fungos. Esses possuem uma relação complexa com o sistema imune dos vertebrados, muito por conta de características importantes como a habilidade de existirem em diferentes formas e de alterná-las durante a infecção. Tal habilidade dos fungos leva a mudanças fenotípicas e à variabilidade antigênica, acarretando na existência de uma multiplicidade de mecanismos de reconhecimento e de ação [217].

Já é sabido que a interação parasito-hospedeiro resulta em uma comunicação bidirecional onde ambos, o microrganismo e as células do hospedeiro estão em permanente diálogo, influenciando o comportamento um do outro. Nesse contexto, após ensaio de interação de macrófagos com diferentes formas do fungo, foi visto que interação com células muriformes, mas não com conídios, induzem em intensa regulação positiva de genes relacionados com a resposta inflamatória, acarretando na

produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, ao passo que os mecanismos efetores das células do hospedeiro e expressão de genes importantes na ativação da resposta imune adaptativa estão inibidos. Em conjunto, esses resultados mostram diferentes perfis de interação fungo-hospedeiros, conforme a forma do fungo em questão.

Um estado de doença fúngica crônica ou intratável pode ser resultado de uma resposta inflamatória exacerbada a qual, provavelmente, compromete a capacidade do hospedeiro em lidar com as células infectivas do fungo, e não de uma susceptibilidade "intrínseca" à infecção. Assim, as doenças fúngicas representam um paradigma importante na imunologia, uma vez que podem resultar tanto da ausência de reconhecimento quanto da superativação da resposta inflamatória [67]. No caso da CBM, essa cursa com processo inflamatório crônico, sendo agravada pela ocorrência de infecções secundárias [33].

Ao contrário do que ocorre em pacientes que desenvolvem a doença, os quais mantêm carga fúngica e processo inflamatório crônico por longos períodos de tempo, todos os modelos murinos descritos até a presente data, tendem a remissão após curto período de infecção. O que se observa no modelo murino utilizado no presente trabalho é o estabelecimento de um padrão de resposta efetiva capaz de lidar com a infecção e a presença de diferentes formas do fungo, levando ao processo de remissão da doença e sem que ocorra a cronificação da doença como observada em humanos.

Após investigar a participação das sub-populações de linfócitos T auxiliares no curso da CBM experimental foi visto grande participação dos linfócitos T CD4+ expressando Foxp3 no linfonodo drenante, favorecendo um ambiente regulado da resposta imune. No coxim plantar, por sua vez, foi observada atuação coordenada das subpopulações de linfócitos T, onde a polarização inicial de Th17, acompanhada de

percentual elevado de células CD4⁺ Foxp3⁺, é sucedida nos estágios mais tardios por Th1. A polarização inicial de Th17 foi fundamental para a redução da carga fúngica naquele período de infecção, como visto no ensaio de neutralização de IL-17A, período em que as células do fungo são compostas majoritariamente por fragmentos de hifas. Após 14 dias de infecção, período em que a maioria das células fúngicas se transformou em células muriformes, é possível observar o início da sucessão das células Th17 pelos linfócitos Th1, tido como o padrão de resposta mais eficaz na resposta às células muriformes, geralmente localizadas no interior de células multinucleadas gigantes.

Altas doses de IL-17A nas lesões representam, em termos, uma estratégia do hospedeiro contra infecções fúngica. Todavia, uma resposta intensa mediada por Th17 pode se sobrepor ao papel regulatório das Treg de modo que tal desbalanço pode eventualmente resultar em uma resposta menos efetiva contra o fungo [123]. Assim, ao controlar a qualidade e a magnitude das respostas efetoras da imunidade inata e adaptativa, as células Tregs podem ser responsáveis por um espectro amplo de resposta do hospedeiro, variando desde a tolerância protetiva (definida como uma resposta do hospedeiro que assegura a sua sobrevivência ao trocar a resposta imunológica esterilizante, por uma regulação negativa, limitando a eliminação do patógeno) até a notória imunossupressão [67].

O balanço da população de Th precisa ser adequado em cada fase do processo de infecção, atuando de forma dinâmica. Perturbações nesse balanço, como visto nos ensaios com animais dectina-2 KO, podem prejudicar a eliminação do fungo na fase inicial da doença sem, contudo, comprometer o processo de remissão da doença observado no modelo murino. Entretanto, perturbações envolvendo a neutralização de IFN- γ e a redução da população de Treg nos indivíduos infectados, acabaram por retardar o processo de remissão da doença desses animais.

Há que se pensar, então, que eventual falha na modulação pelas Tregs da resposta inflamatória induzida por células muriformes, aliada a uma resposta Th1 ineficiente, constituem fatores determinantes para o desenvolvimento da CBM em humanos.

Em suma, após análise conjunta dos dados é possível concluir que:

- I. Conídios e células muriformes atuam de maneira distinta na modulação da resposta imune.
- II. Células muriformes atuam fortemente no estabelecimento da resposta inflamatória crônica no curso da CBM, estimulando a produção de diversos mediadores pró-inflamatórios;
- III. Conídios podem desempenhar papel importante na patogenia da doença uma vez que esse pode permanecer longos períodos sem necessariamente induzir resposta imune (latência);
- IV. A produção de IL-17A é importante na eliminação de células fúngicas na fase inicial da doença (principalmente hifas). No entanto, sua produção desregulada pode ser prejudicial na fase crônica da doença por promover uma resposta inflamatória exacerbada;
- V. O balanço entre Th1 e Th17, mediado por Treg, é essencial para o processo de remissão da doença observado na CBM murina;

Por fim, concluído o presente trabalho, tem-se que esse contribui sobremaneira para uma melhor compreensão da imunopatologia da CBM, fornecendo elementos relevantes que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas terapias, capazes de modular a resposta imunológica do hospedeiro para aquela mais efetiva. Trabalhos futuros, identificando em detalhe a ação das células T regulatórias no curso da doença,

podem trazer elementos cada vez valiosos no entendimento da patogenia da doença, além de se apresentar como uma opção terapêutica promissora no tratamento, não só da CBM, como também das demais micoses que cursam com processo inflamatório crônico.

Referências Bibliográficas

1. McGinnis MR, Hilger AE. Infections caused by black fungi. Arch Dermatol [Internet]. 1987 Oct [cited 2013 Nov 3];123(10):1300–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3662560>
2. López Martínez R, Méndez Tovar LJ. Chromoblastomycosis. Clin Dermatol [Internet]. 2007 [cited 2012 Jul 19];25(2):188–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350498>
3. Queiroz-Telles F. CHROMOBLASTOMYCOSIS: A NEGLECTED TROPICAL DISEASE. Rev do Inst Med Trop São Paulo [Internet]. 2015 Sep;57 Suppl 1:46–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26465369>
4. Revankar SG. Dematiaceous fungi. 2007;91–101.
5. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cell Microbiol [Internet]. 2003 Apr;5(4):203–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675679>
6. Rudolph M. Über die brasilianische “Figueira” (Vorläufige Mitteilung). Arch Schiffs und Tropen-Hyg. 1914;18:498–9.
7. Castro RM, Castro LG. On the priority of description of chromomycosis. Mykosen [Internet]. 1987 Sep;30(9):397–403. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3320744>
8. Al-Doory Y, Pairon R. A bibliography of chromomycosis. Mycopathol Mycol Appl [Internet]. 1974 Oct 15;54(1):91–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4610384>

9. Elgart GW. Chromoblastomycosis. *Dermatol Clin* [Internet]. 1996 Jan;14(1):77–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8821160>
10. Terra F. Novo tipo de dermatite verrucosa: micose por acrotheca com associação de leishmaniose. *Bras Med*. 1922;2:368–78.
11. Odds FC, Arai T, Disalvo AF, Evans EG, Hay RJ, Randhawa HS, et al. Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a Subcommittee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). *J Med Vet Mycol* [Internet]. 1992;30(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1573518>
12. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saúl A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* [Internet]. 2001;44(1-2):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11398635>
13. Attapattu MC. Chromoblastomycosis--a clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. *Mycopathologia* [Internet]. 1997 Jan;137(3):145–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9368408>
14. Najafzadeh MJ, Gueidan C, Badali H, Van Den Ende a HGG, Xi L, De Hoog GS. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Med Mycol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2012 Jul 19];47(1):17–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19107635>
15. Rajendran C, Ramesh V, Misra RS, Kandhari S, Upreti HB, Datta KK. Chromoblastomycosis in India. *Int J Dermatol* [Internet]. 1997 Jan;36(1):29–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9071611>
16. Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz

- A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2012 Jul 19];47(1):3–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19085206>
17. Matte SMW, Lopes JO, Melo IS, Espadim LER, Pinto MS. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 1997 Aug;30(4):309–11. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821997000400006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
18. Queiroz Filho F. A cromoblastomicose no estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com intraconazol. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30(4):345–6.
19. Minotto R, Bernardi CD, Mallmann LF, Edelweiss MI, Scroferneker ML. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2001 Apr [cited 2012 Jul 19];44(4):585–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11260530>
20. Silva JP, de Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* [Internet]. 1999;143(3):171–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353215>
21. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Ramarcel ER, Pecarrere JL. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1996 Jul;55(1):45–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8702021>

22. Pérez-Blanco M, Hernández Valles R, García-Humbría L, Yegres F. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela. *Med Mycol* [Internet]. 2006 Aug;44(5):467–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882614>
23. Borelli D. [*Acrotheca aquaspersa* nova, new species agent of chromomycosis]. *Acta científica Venez* [Internet]. 1972;23(6):193–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4677524>
24. Gruber B, Rippon JW, Dayal VS. Phaeomycotic cyst (chromoblastomycosis) of the neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 1988 Sep;114(9):1031–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3408571>
25. McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1983 Jan [cited 2012 Sep 18];8(1):1–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6826791>
26. Matsumoto T, Matsuda T, McGinnis MR, Ajello L. Clinical and mycological spectra of *Wangiella dermatitidis* infections. *Mycoses* [Internet]. 36(5-6):145–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8264710>
27. Naka W, Harada T, Nishikawa T, Fukushiro R. A case of chromoblastomycosis: with special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. *Mykosen* [Internet]. 1986 Oct;29(10):445–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3540662>
28. Padhye AA, Ajello L. A case of chromoblastomycosis with special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. *Mykosen* [Internet]. 1987

- Mar;30(3):134. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3587275>
29. Barba-Gómez JF, Mayorga J, McGinnis MR, González-Mendoza A. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1992 Feb;26(2 Pt 2):367–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1569261>
 30. De Hoog GS, Attili-Angelis D, Vicente VA, Van Den Ende AHGG, Queiroz-Telles F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med Mycol* [Internet]. 2004 Oct [cited 2013 Nov 4];42(5):405–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15552642>
 31. Xi L, Lu C, Sun J, Li X, Liu H, Zhang J, et al. Chromoblastomycosis caused by a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora*. *Med Mycol* [Internet]. 2009 Feb;47(1):77–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18798120>
 32. Xi L, Sun J, Lu C, Liu H, Xie Z, Fukushima K, et al. Molecular diversity of *Fonsecaea* (Chaetothyriales) causing chromoblastomycosis in southern China. *Med Mycol* [Internet]. 2009 Feb;47(1):27–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951291>
 33. Ameen M. Chromoblastomycosis: Clinical presentation and management. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34(8):849–54.
 34. Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. 2006 Apr;19(2):148–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16514339>
 35. Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP. Penetration of hard substrates

- by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1991 Dec 15;88(24):11281–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1837147>
36. Chaidaroon W, Tananuvat N, Chavengsaksongkram P, Vanittanakom N. Corneal Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea pedrosoi*. *Case Rep Ophthalmol* [Internet]. 6(1):82–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25873892>
37. Krishna S, Shenoy MM, Pinto M, Saxena V. Two cases of axillary chromoblastomycosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* [Internet]. 2016 Jan 21; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26790546>
38. Gimenes VMF, Criado PR, Martins JEC, Almeida SR. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. *Mycopathologia* [Internet]. 2006 Aug [cited 2012 Jul 19];162(2):97–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16897587>
39. Bansal AS, Prabhakar P. Chromomycosis: a twenty-year analysis of histologically confirmed cases in Jamaica. *Trop Geogr Med* [Internet]. 1989 Jul;41(3):222–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2595799>
40. Queiroz-Telles F, McGinnis MR, Salkin I, Graybill JR. Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2003 Mar;17(1):59–85, viii. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12751261>
41. Lacaz CDS. *Tratado de Micologia Médica*. 9^a ed. Sarvier, editor. São Paulo; 2002.
42. Limongi CL, Rozental S, Alviano CS, de Souza W. The influence of surface

- carbohydrates on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with Chinese hamster ovary glycosylation mutant cells. *Mycopathologia* [Internet]. 1997 Jan;138(3):127–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9468663>
43. Bayles MA. Chromomycosis. In: Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases Tropical fungal Infections. London: WB Saunders; 1986. p. 45–70.
44. Rosen T, Overholt M. Persistent viability of the Medlar body. *Int J Dermatol* [Internet]. 1996 Feb [cited 2014 Dec 1];35(2):96–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8850035>
45. Santos ALS, Palmeira VF, Rozental S, Kneipp LF, Nimrichter L, Alviano DS, et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2007 Sep [cited 2012 Jul 19];31(5):570–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645522>
46. Nimrichter L, Barreto-Bergter E, Mendonça-Filho RR, Kneipp LF, Mazzi MT, Salve P, et al. A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. *Microbes Infect* [Internet]. 2004 Jun [cited 2012 Jul 19];6(7):657–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158773>
47. Salgado CG, da Silva JP, Diniz JAP, da Silva MB, da Costa PF, Teixeira C, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2004;46(1):33–6. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057332>
48. Marques SG, Silva CDMP, Saldanha PC, Rezende MA, Vicente VA, Queiroz-Telles F, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* [Internet]. 2006 Jan;47(4):305–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17086164>
 49. Alviano CS, Farbiarz SR, Travassos LR, Angluster J, de Souza W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. *Mycopathologia* [Internet]. 1992 Jul [cited 2012 Jul 26];119(1):17–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1406903>
 50. da Silva JP, Alviano DS, Alviano CS, de Souza W, Travassos LR, Diniz J a P, et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2002 Mar 25;33(1):63–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11985971>
 51. Lee MW, Hsu S, Rosen T. Spores and mycelia in cutaneous chromomycosis. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1998 Nov;39(5 Pt 2):850–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9810914>
 52. d'Avila SCGP, Pagliari C, Duarte MIS. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia* [Internet]. 2003 Jan;156(2):51–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12733624>

53. Poirriez J, Breuillard F, Francois N, Fruit J, Sendid B, Gross S, et al. A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2000;63(1-2):61–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357997>
54. Bonifaz A, Martínez-Soto E, Carrasco-Gerard E, Peniche J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. *Int J Dermatol* [Internet]. 1997 Jul;36(7):542–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9268758>
55. Castro LGM, Pimentel ERA, Lacaz CS. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. *Int J Dermatol* [Internet]. 2003 May;42(5):408–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12755986>
56. Lupi O, Tying SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2005 Dec;53(6):931–51, quiz 952–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310053>
57. Lopes CF, Alvarenga RJ, Cisalpino EO, Resende MA, Oliveira LG. Six years' experience in treatment of chromomycosis with 5-fluorocytosine,. *Int J Dermatol* [Internet]. 1978 Jun [cited 2012 Sep 17];17(5):414–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/659043>
58. Bayles MA. Tropical mycoses. *Chemotherapy* [Internet]. 1992 Jan [cited 2012 Sep 17];38 Suppl 1:27–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1319312>

59. Bayles MA. Chromomycosis. *Curr Top Med Mycol* [Internet]. 1995 Jan [cited 2012 Sep 17];6:221–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8724247>
60. Grant SM, Clissold SP. Itraconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses. *Drugs* [Internet]. 1989 Mar;37(3):310–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2540949>
61. Queiroz-Telles F, Purim KS, Fillus JN. Itraconazole in the treatment of Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int J Dermatol*. 1992;31:805–12.
62. Pradinaud R, Bolzinger T. Treatment of chromoblastomycosis. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1991 Nov;25(5 Pt 1):869–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1666399>
63. Gupta AK, Taborda PR, Sanzovo AD. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol* [Internet]. 2002 Oct;40(5):529–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12462534>
64. COSTELLO MJ, DEFEO CP, LITTMAN ML. Chromoblastomycosis treated with local infiltration of amphotericin B solution. *AMA Arch Derm* [Internet]. 1959 Feb;79(2):184–90; discussion 190–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13616716>
65. Siqueira IM, Ribeiro AM, de Medeiros Nóbrega YK, Simon KS, Souza ACO, Jerônimo MS, et al. DNA-hsp65 Vaccine as Therapeutic Strategy to Treat

- Experimental Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea Pedrosoi*. *Mycopathologia*. 2013;175(5-6):463–75.
66. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2004 Jan [cited 2012 Jul 15];4(1):1–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661066>
67. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Apr [cited 2013 Aug 5];11(4):275–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394104>
68. van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JWM, Gow NAR, Netea MG. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2008 Aug;11(4):305–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18602019>
69. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2007 Jan;81(1):1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17032697>
70. Latgé J-P. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2013 Aug 5];12(7):863–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20482553>
71. Taborda CP, Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia* [Internet]. 2008 Apr 24 [cited 2012 Jul 19];165(4-5):331–9. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11046-007-9061-4>

72. Machado GC, Moris DV, Arantes TD, Silva LRF, Theodoro RC, Mendes RP, et al. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2013 Aug [cited 2013 Aug 4];108(5):637–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23903981>
73. Moudgil KD. Interplay among cytokines and T cell subsets in the progression and control of immune-mediated diseases. *Cytokine* [Internet]. 2015 Jul;74(1):1–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026376>
74. Spellberg B, Ibrahim AS, Lin L, Avanesian V, Fu Y, Lipke P, et al. Antibody titer threshold predicts anti-candidal vaccine efficacy even though the mechanism of protection is induction of cell-mediated immunity. *J Infect Dis* [Internet]. 2008 Apr 1;197(7):967–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419471>
75. de Oliveira LL, Coltri KC, Cardoso CRB, Roque-Barreira M-C, Panunto-Castelo A. T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2008;2(3):e183. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18335066>
76. Nesbit L, Johnson SM, Pappagianis D, Ampel NM. Polyfunctional T lymphocytes are in the peripheral blood of donors naturally immune to coccidioidomycosis and are not induced by dendritic cells. *Infect Immun* [Internet]. 2010 Jan;78(1):309–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901066>
77. Zhang Y, Wang F, Tompkins KC, McNamara A, Jain A V, Moore BB, et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot

- prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am J Pathol* [Internet]. 2009 Dec;175(6):2489–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893050>
78. Müller U, Stenzel W, Köhler G, Werner C, Polte T, Hansen G, et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* [Internet]. 2007 Oct 15;179(8):5367–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911623>
79. Bozzi A, Reis BS, Goulart MI, Pereira MCN, Pedroso EP, Goes AM. Analysis of memory T cells in the human paracoccidioidomycosis before and during chemotherapy treatment. *Immunol Lett* [Internet]. 2007 Nov 30;114(1):23–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897724>
80. Guimarães AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* [Internet]. 2009 Apr;77(4):1357–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19179416>
81. Subramaniam KS, Datta K, Quintero E, Manix C, Marks MS, Pirofski L-A. The absence of serum IgM enhances the susceptibility of mice to pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* [Internet]. 2010 May 15;184(10):5755–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404271>
82. Shi L, Albuquerque PC, Lazar-Molnar E, Wang X, Santambrogio L, Gácsér A, et al. A monoclonal antibody to *Histoplasma capsulatum* alters the intracellular fate of the fungus in murine macrophages. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2008

- Jul;7(7):1109–17. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18487350>
83. Martinez LR, Moussai D, Casadevall A. Antibody to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan inhibits the release of capsular antigen. *Infect Immun* [Internet]. 2004 Jun;72(6):3674–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155683>
84. Martinez LR, Casadevall A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect Immun* [Internet]. 2005 Oct;73(10):6350–62. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177306>
85. McClelland EE, Nicola AM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Ab binding alters gene expression in *Cryptococcus neoformans* and directly modulates fungal metabolism. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Apr;120(4):1355–61. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335660>
86. Vinh DC, Sugui JA, Hsu AP, Freeman AF, Holland SM. Invasive fungal disease in autosomal-dominant hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010 Jun;125(6):1389–90. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392475>
87. Puel A, Picard C, Cypowyj S, Lilic D, Abel L, Casanova J-L. Inborn errors of mucocutaneous immunity to *Candida albicans* in humans: a role for IL-17 cytokines? *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2010 Aug;22(4):467–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20674321>
88. Acosta-Rodriguez E V, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M,

- Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2007 Jun;8(6):639–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486092>
89. Bozza S, Clavaud C, Giovannini G, Fontaine T, Beauvais A, Sarfati J, et al. Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination. *J Immunol* [Internet]. 2009 Aug 15;183(4):2407–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625642>
90. Chai LYA, van de Veerdonk F, Marijnissen RJ, Cheng S-C, Khoo AL, Hectors M, et al. Anti-*Aspergillus* human host defence relies on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity. *Immunology* [Internet]. 2010 May;130(1):46–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002791>
91. Wüthrich M, Gern B, Hung CY, Ersland K, Rocco N, Pick-Jacobs J, et al. Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2011 Feb;121(2):554–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21206087>
92. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol* [Internet]. 2015;6:639. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26734006>
93. Romani L, Puccetti P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol* [Internet]. 2006 Apr;14(4):183–9.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517165>

94. Ferreira MC, de Oliveira RTD, da Silva RM, Blotta MHSL, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* [Internet]. 2010 Oct;78(10):4392–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20643858>
95. Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, di Francesco P, et al. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol* [Internet]. 2002 Feb 1;168(3):1362–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801677>
96. Feldmesser M. Prospects of vaccines for invasive aspergillosis. *Med Mycol* [Internet]. 2005 Nov;43(7):571–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16396243>
97. Traynor TR, Huffnagle GB. Role of chemokines in fungal infections. *Med Mycol* [Internet]. 2001 Feb;39(1):41–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11270407>
98. Stevens DA, Walsh TJ, Bistoni F, Cenci E, Clemons K V, Del Sero G, et al. Cytokines and mycoses. *Med Mycol* [Internet]. 1998;36 Suppl 1:174–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988506>
99. Aguirre K, Crowe J, Haas A, Smith J. Resistance to *Cryptococcus neoformans* infection in the absence of CD4⁺ T cells. *Med Mycol* [Internet]. 2004 Feb;42(1):15–25. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982110>
100. Marques SA. Paracoccidioidomycosis. *Clin Dermatol* [Internet]. 2012 [cited 2013 Apr 8];30(6):610–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23068148>
 101. Calich VLG, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Brazilian J Med Biol Res*. 1998;31(5):615–23.
 102. Clemons K V, Calich VL, Burger E, Filler SG, Graziutti M, Murphy J, et al. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Med Mycol* [Internet]. 2000 Jan [cited 2012 Sep 18];38 Suppl 1:99–111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204170>
 103. Ramos-E-Silva M, Saraiva L do ES. Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin* [Internet]. 2008 Apr [cited 2013 Apr 8];26(2):257–69, vii. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18346557>
 104. Nogueira ME, Mendes RP, Marques SA, Franco M. Complement-mediated-lysis detection of antibodies in paracoccidioidomycosis: a preliminary study. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui médicas e biológicas / Soc Bras Biofísica* . [et al] [Internet]. 1986;19(2):241–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3548857>
 105. Vaz CA, Mackenzie DW, Hearn VM, Camargo ZP, Singer-Vermes LM, Burger E, et al. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1992 Apr;88(1):119–23. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1563097>
106. Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1993 Mar;31(3):671–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8458961>
 107. Chequer-Bou-Habib D, Oliveira-Neto MP, Ferreira-da-Cruz MF, Galvão-Castro B. The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell-mediated immunity in paracoccidioidomycosis. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui médicas e biológicas / Soc Bras Biofisica* . [et al] [Internet]. 1989;22(2):205–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2790289>
 108. Diniz SN, Cisalpino PS, Koury MC, Andrade GM, Nogueira MG, Goes AM. In vitro human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. *Microbes Infect* [Internet]. 1999 Apr;1(5):353–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602668>
 109. Esterre P, Peyrol S, Sainte-Marie D, Pradinaud R, Grimaud JA. Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesion of chromomycosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* [Internet]. 1993 Jan [cited 2012 Sep 17];422(4):285–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8506621>
 110. Rozental S, Alviano CS, de Souza W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia* [Internet]. 1994 May [cited 2012 Sep 17];126(2):85–91. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8065435>
111. Farbiarz SR, de Carvalho TU, Alviano C, de Souza W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *J Med Vet Mycol* [Internet]. 1992 Jan [cited 2012 Sep 17];30(4):265–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1432486>
 112. Bocca AL, Brito PPMS, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia* [Internet]. 2006 Apr [cited 2012 Jul 19];161(4):195–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552481>
 113. Teixeira de Sousa MDG, Ghosn EEB, Almeida SR. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scand J Immunol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2012 Jul 19];64(6):595–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17083615>
 114. Levitz SM. Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes Infect* [Internet]. 2004 Dec;6(15):1351–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596119>
 115. Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol* [Internet]. 2007 Feb;37(2):467–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17230442>
 116. Dennehy KM, Brown GD. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2007 Aug;82(2):253–8.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475782>

117. Alviano DS, Kneipp LF, Lopes AH, Travassos LR, Meyer-Fernandes JR, Rodrigues ML, et al. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res Microbiol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2012 Jul 19];154(10):689–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643407>
118. Nóbrega YKDM, Lozano VF, de Araújo TS, de Carvalho DD, Bocca AL. The cell wall fraction from *Fonsecaea pedrosoi* stimulates production of different profiles of cytokines and nitric oxide by murine peritoneal cells in vitro. *Mycopathologia* [Internet]. 2010 Aug [cited 2012 Jul 19];170(2):89–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20352494>
119. Esterre P, Jahevitra M, Andriantsimahavandy a. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. 2000 May;7(3):497–500. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=95900&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
120. Sotto MN, De Brito T, Silva AMG, Vidal M, Castro LGM. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol* [Internet]. 2004 Jan;31(1):14–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14675280>
121. Mazo Fávero Gimenes V, Da Glória de Souza M, Ferreira KS, Marques SG, Gonçalves AG, Vagner de Castro Lima Santos D, et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect* [Internet]. 2005 Apr [cited 2012 Jul

- 19];7(4):708–13. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15848277>
122. Ahrens J, Graybill JR, Abishawl A, Tio FO, Rinaldi MG. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1989 Jun [cited 2012 Sep 17];40(6):651–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2742041>
123. Silva AADL, Criado PR, Nunes RS, da Silva WLF, Kanashiro-Galo L, Duarte MIS, et al. In Situ Immune Response in Human Chromoblastomycosis – A Possible Role for Regulatory and Th17 T Cells. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014;8(9):e3162. Available from:
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003162>
124. Wüthrich M, Wang H, Li M, Lerksuthirat T. F . pedrosoi -induced Th17-cell differentiation in mice is fostered by Dectin-2 and suppressed by Mincle recognition. 2015;1–22.
125. Da Glória Sousa M, Reid DM, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Ruland J, Langhorne J, et al. Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. *Cell Host Microbe*. 2011;9(5):436–43.
126. Weiss U. Inflammation. *Nature* [Internet]. 2008 Jul 24;454(7203):427–427. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/454427a>
127. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* [Internet]. 2008 Jul 24;454(7203):428–35. Available from:
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature07201>

128. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996.
129. Avelar-Pires C, Simoes-Quaresma JA, Moraes-de Macedo GM, Brasil-Xavier M, Cardoso-de Brito A. Revisiting the clinical and histopathological aspects of patients with chromoblastomycosis from the Brazilian Amazon region. Arch Med Res [Internet]. Elsevier Inc; 2013;44(4):302–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.04.008>
130. Alviano CS, Farbiarz SR, Travassos LR, Angluster J, de Souza W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. Mycopathologia [Internet]. 1992 Jul [cited 2013 Oct 28];119(1):17–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1406903>
131. Sano A, Kurita N, Iabuki K, Coelho R, Takeo K, Nishimura K, et al. A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia [Internet]. 1993 Dec;124(3):157–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7517514>
132. Salgado CG. Fungal x host interactions in Chromoblastomycosis: what we have learned from animal models and what is yet to be solved. Virulence. 2010;1(1):3–5.
133. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1996 Oct [cited 2013 Aug 5];9(4):469–88. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=172905&tool=pmc>

- trez&rendertype=abstract
134. Gauthier GM. Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants, and Insects. *PLOS Pathog* [Internet]. 2015;11(2):e1004608. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004608>
 135. Machado AP, Silva MRR, Fischman O. Local phagocytic responses after murine infection with different forms of *Fonsecaea pedrosoi* and sclerotic bodies originating from an inoculum of conidiogenous cells. *Mycoses* [Internet]. 2011 May [cited 2012 Jul 19];54(3):202–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19925569>
 136. Fastqc [Internet]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
 137. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* [Internet]. 2011 May 2;17(1):10. Available from: <http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>
 138. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* [Internet]. 2015 Jan 15;31(2):166–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260700>
 139. No Title [Internet]. Available from: http://www.ensembl.org/Mus_musculus/
 140. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* [Internet]. 2009 May 1;25(9):1105–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289445>
 141. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The

- Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* [Internet]. 2009 Aug 15;25(16):2078–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505943>
142. (R Core Team). *A Language and Environment for Statistical Computing* [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2015. Available from: <http://www.r-project.org>
143. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* [Internet]. 2010 Jan 1;26(1):139–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910308>
144. Carlson M. org.Mm.eg.db: Genome wide annotation for Mouse.
145. Luo W, Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* [Internet]. 2013 Jul 15;29(14):1830–1. Available from: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/bioinformatics/btt285>
146. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec;25(4):402–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
147. No Title [Internet]. Available from: <http://www.informatics.jax.org>
148. No Title [Internet]. Available from: <http://www-genome.wi.mit.edu>
149. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie ALJ, Rößner S, Koch F, Romani N, et al. An

- advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*. 1999;223(1):77–92.
150. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1981 Dec;78(12):7764–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6950416>
151. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 Nov 3];10(1):57–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2949280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
152. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* [Internet]. 2013 Sep 26 [cited 2013 Nov 4];155(1):27–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24074859>
153. Tierney L, Linde J, Müller S, Brunke S, Molina JC, Hube B, et al. An Interspecies Regulatory Network Inferred from Simultaneous RNA-seq of *Candida albicans* Invading Innate Immune Cells. *Front Microbiol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Nov 4];3:85. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3299011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
154. Tsitsigiannis DI, Keller NP. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol* [Internet]. 2007 Mar;15(3):109–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276068>

155. Haas-Stapleton EJ, Lu Y, Hong S, Arita M, Favoreto S, Nigam S, et al. *Candida albicans* modulates host defense by biosynthesizing the pro-resolving mediator resolvin E1. *PLoS One* [Internet]. 2007;2(12):e1316. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18091990>
156. Levitz SM. Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Apr;6(4):e1000758. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421940>
157. Rappleye CA, Goldman WE. Fungal stealth technology. *Trends Immunol* [Internet]. 2008 Jan;29(1):18–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054285>
158. da Silva JP, da Silva MB, Salgado UI, Diniz JAP, Rozental S, Salgado CG. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2012 Aug 16];50(1):104–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451443>
159. Drummond RA, Saijo S, Iwakura Y, Brown GD. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur J Immunol* [Internet]. 2011 Feb;41(2):276–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21267996>
160. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(2):247–80.
161. Bates EE, Fournier N, Garcia E, Valladeau J, Durand I, Pin JJ, et al. APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an

- immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* [Internet]. 1999 Aug 15;163(4):1973–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438934>
162. Eigenbrod T, Pelka K, Latz E, Kreikemeyer B, Dalpke AH. TLR8 Senses Bacterial RNA in Human Monocytes and Plays a Nonredundant Role for Recognition of *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol* [Internet]. 2015 Aug 1;195(3):1092–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26101323>
163. Bocca AL, Brito PPMS, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia* [Internet]. 2006 Apr [cited 2012 Sep 17];161(4):195–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552481>
164. Mishra BB, Rathinam V a K, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald K a, et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nat Immunol* [Internet]. 2013;14(1):52–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3721324&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
165. Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2012 Aug 21;13(9):817–22. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.2369>
166. Diaz-Jimenez DF, Perez-García LA, Martínez-Alvarez JA, Mora-Montes HM. Role of the fungal cell wall in pathogenesis and antifungal resistance. *Curr*

- Fungal Infect Rep. 2012;6(4):275–82.
167. Arana DM, Prieto D, Román E, Nombela C, Alonso-Monge R, Pla J. The role of the cell wall in fungal pathogenesis. *Microb Biotechnol.* 2009;2(3):308–20.
 168. Nimrichter L, Cerqueira MD, Leita EA, Miranda K, Nakayasu ES, Almeida SR, et al. Structure , Cellular Distribution , Antigenicity , and Biological Functions of *Fonsecaea pedrosoi* Ceramide Monohexosides. 2005;73(12):7860–8.
 169. Amanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* [Internet]. 2009 Aug 27;460(7259):1117–21. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08264>
 170. Daly KR, Fichtenbaum CJ, Tanaka R, Linke MJ, O’Bert R, Thullen TD, et al. Serologic responses to epitopes of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis jirovecii* differ in human immunodeficiency virus-infected and uninfected persons. *J Infect Dis* [Internet]. 2002 Sep 1;186(5):644–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195351>
 171. Mednick AJ, Nosanchuk JD, Casadevall A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infect Immun.* 2005;73(4):2012–9.
 172. Rosas AL, MacGill RS, Nosanchuk JD, Kozel TR, Casadevall A. Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. 2002 Jan;9(1):144–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777844>
 173. Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and

- virulence: mechanism of action. *Infect Immun* [Internet]. 1995 Aug;63(8):3131–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622240>
174. Guerra CR, Seabra SH, De Souza W, Rozental S. *Cryptococcus neoformans* is internalized by receptor-mediated or “triggered” phagocytosis, dependent on actin recruitment. *PLoS One*. 2014;9(2):1–10.
175. Hayakawa M, Ghosn EEB, da Gloria Teixeira de Sousa M, Ferreira KS, Almeida SR. Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous [correction of dematiaceus] fungi that cause chromoblastomycosis. *Scand J Immunol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2012 Jul 19];64(4):382–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16970678>
176. Bocca LIAL, Silva MF, Silva LIOL, Cunha FQ. Macrophage Expression of Class II Major Histocompatibility Complex Gene Products in *Paracoccidioides Brasiliensis* – Infected Mice. 1999;61(2):280–7.
177. Moretti S, Bozza S, Oikonomou V, Renga G, Casagrande A, Iannitti RG, et al. IL-37 Inhibits Inflammasome Activation and Disease Severity in Murine Aspergillosis. *PLoS Pathog*. 2014;10(11).
178. Kim HS, Ryu HS, Kim JS, Kim YG, Lee HK, Jung JK, et al. Validation of cyclooxygenase-2 as a direct anti-inflammatory target of 4-O-methylhonokiol in zymosan-induced animal models. *Arch Pharm Res* [Internet]. 2015;38(5):813–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25074039>
179. Gapeyev a B, Gapeyev a B, Mikhailik EN, Mikhailik EN, Chemeris NK, Chemeris NK. Anti-inflammatory effects of low-intensity extremely high-

- frequency electromagnetic radiation: frequency and power dependence. *Bioelectromagnetics* [Internet]. 2008;29(3):197–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18044738>
180. Romani L, Fallarino F, De Luca A, Montagnoli C, D'Angelo C, Zelante T, et al. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature* [Internet]. 2008 Jan 10;451(7175):211–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18185592>
181. Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S, et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* [Internet]. 2007 Oct;37(10):2695–706. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17899546>
182. Karttunen J, Sanderson S, Shastri N. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1992;89(13):6020–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=402130&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
183. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, et al. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* [Internet]. 2009;206(9):2037–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737172/pdf/JEM_20082818.pdf
184. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernanz-Falcon P, et al. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* [Internet]. 2009;458(7240):899–903. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19219027>
185. Sanderson S, Shastri N. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *Int Immunol* [Internet]. 1994 Mar;6(3):369–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8186188>
186. Huffnagle GB, Yates JL, Lipscomb MF. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J Exp Med* [Internet]. 1991 Apr 1;173(4):793–800. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1672543>
187. Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res* [Internet]. 2000 Jan;20(1):89–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10670655>
188. Deepe GS. Role of CD8+ T cells in host resistance to systemic infection with *Histoplasma capsulatum* in mice. *J Immunol* [Internet]. 1994 Apr 1;152(7):3491–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144930>
189. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Del Sero G, Bistoni F, Puccetti P. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4+ T helper subset selection in mice with candidiasis. *J Immunol* [Internet]. 1997 Mar 1;158(5):2356–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036985>
190. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - A diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008;124(1):13–22.

191. Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2007 Apr;7(4):305–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17380159>
192. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo M-G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2007 Aug;120(2):227–35; quiz 236–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17666212>
193. Romani L, Puccetti P. Immune regulation and tolerance to fungi in the lungs and skin. *Chem Immunol Allergy* [Internet]. 2008;94:124–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802343>
194. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* [Internet]. 2008;9(6):641–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454151>
195. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* [Internet]. 2003;198(12):1875–86. Available from: <http://jem.rupress.org/content/198/12/1875.abstract>
<http://jem.rupress.org/content/198/12/1875.full.pdf>
<http://jem.rupress.org/content/198/12/1875.long>
196. Pyzik M, Piccirillo C a. TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. *J Leukoc Biol*. 2007;82(2):335–46.
197. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*

- [Internet]. 2005 Dec;272(24):6179–217. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336259>
198. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2008 Jan;6(1):67–78. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079743>
199. Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2011;29:1–21. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20936972>
200. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, Bruijns SCM, et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* [Internet]. 2009 Feb;10(2):203–13. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19122653>
201. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* [Internet]. 2007 Jun;8(6):630–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17450144>
202. Sato K, Yang X, Yudate T, Chung J-S, Wu J, Luby-Phelps K, et al. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Dec 15;281(50):38854–66. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050534>

203. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2007;25:821–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201677>
204. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* [Internet]. 2006 Jan;27(1):17–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16290228>
205. Ameen M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *Clin Exp Dermatol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2012 Jul 19];34(8):849–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19575735>
206. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2010 Jan;11(1):7–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016504>
207. Akins EJ, Moore ML, Tang S, Willingham MC, Tooze JA, Dubey P. In situ vaccination combined with androgen ablation and regulatory T-cell depletion reduces castration-resistant tumor burden in prostate-specific pten knockout mice. *Cancer Res* [Internet]. 2010 May 1;70(9):3473–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406970>
208. Christensen AD, Skov S, Kvist PH, Haase C. Depletion of regulatory T cells in a hapten-induced inflammation model results in prolonged and increased inflammation driven by T cells. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2015 Mar;179(3):485–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25302741>

209. Perdigoto AL, Chatenoud L, Bluestone JA, Herold KC. Inducing and administering Tregs to treat human disease. 2015;6(January):1–13.
210. Putnam AL, Brusko TM, Lee MR, Liu W, Szot GL, Ghosh T, et al. Expansion of Human Regulatory T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2009 Mar 1;58(3):652–62. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db08-1168>
211. Tang Q, Bluestone JA. Regulatory T-cell therapy in transplantation: moving to the clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013 Nov;3(11). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24186492>
212. Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling Human Fungal Infections. *Science* (80-). 2012;336(6082):647–647.
213. Bonifaz a, Saúl a, Paredes-Solis V, Araiza J, Fierro-Arias L. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. *J Dermatolog Treat* [Internet]. 2005 Feb [cited 2012 Jul 19];16(1):47–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897168>
214. Tagami H, Ginoza M, Imaizumi S, Urano-Suehisa S. Successful treatment of chromoblastomycosis with topical heat therapy. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1984 Apr;10(4):615–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6715610>
215. Bonifaz A, Paredes-Solís V, Saúl A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. 2004 Feb;5(2):247–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996622>
216. Pappas PG. Opportunistic fungi: a view to the future. *Am J Med Sci* [Internet].

- 2010 Sep;340(3):253–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823702>
217. Zelante T, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Bellocchio S, Bonifazi P, et al. Receptors and pathways in innate antifungal immunity: the implication for tolerance and immunity to fungi. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2012 Sep 18];590:209–21. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17191388>
218. Alexopoulos CJ. *Introductory Mycology*. 4th ed. NY: John Wiley and Sons; 1996.
219. Ainsworth & Bisby's. *Dictionary of the Fungi*. UK: CABI Bioscience Publishers; 2001.
220. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1999 Oct;12(4):501–17. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515900>
221. Baginski M, Sternal K, Czub J, Borowski E. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochim Pol* [Internet]. 2005;52(3):655–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16086075>

Anexo I


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 11 de novembro de 2014.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"IMUNOPATOLOGIA DA CROMOBLASTOMICOSE – AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES DETERMINANTES PARA O ESTABELECIMENTO DA CROMOBLASTOMICOSE MURINA"**, UnBDoC n.º 134976/2014, sob responsabilidade da Professora Anamélia L. Bocca foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de Mus MUSCULUS: 180. A presente aprovação é válida pelo período de 01/12/2014 a 25/07/2016.




Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo II

(Hitmap da interação com conídios)

