

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Bacharelado em Farmácia-Bioquímica

MURILO FERNANDES DE CASTRO

**Avaliação da resposta imune celular na cromoblastomicose murina
após imunização com *Fonsecaea pedrosoi* inativado pelo calor**

**SÃO PAULO
2021**

MURILO FERNANDES DE CASTRO

**Avaliação da resposta imune celular na cromoblastomicose murina
após imunização com *Fonsecaea pedrosoi* inativado pelo calor**

Trabalho de conclusão de curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador e Coorientadora:

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
Dra. Isabela de Godoy Menezes

SÃO PAULO

2021

CASTRO, Murilo Fernandes de. **Avaliação da resposta imune celular na cromoblastomicose murina após imunização com Fonsecaea pedrosoi inativado pelo calor.** 2021. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia-Bioquímica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.



Murilo Fernandes de Castro

Aluno



Professor Doutor Sandro Rogério de Almeida

Orientador

À grande força que move todo horizonte, por nos permitir experienciar e evoluir em direção à liberdade eterna;

À família, que de bom grado, me permitiu vivenciar essa existência e se mantém como meu porto seguro; aos que não estão mais presentes em matéria, mas que permanecem a guiar-me em pensamento e luz;

Aos irmãos e irmãs que não compartilham meus pais, mas que repartem as alegrias, lágrimas, vitórias e derrotas;

À ciência e a todos que dedicam sua vida a desbravar a fronteira do conhecimento humano, e a todos que juraram defender a vida e o bem estar dos homens;

Minha sincera gratidão, respeito e admiração.

Agradecimentos

Aos colegas de laboratório, e em especial, aos meus orientadores Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida e Dra. Isabela Menezes de Godoy pelos ensinamentos repassados durante o desenvolvimento deste trabalho e pela dedicação em garantir que tudo fosse realizado da melhor forma possível.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e ao Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas desta faculdade, que cederam o espaço para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2019/06564-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Resumo

CASTRO, Murilo Fernandes de. **Avaliação da resposta imune celular na cromoblastomicose murina após imunização com *Fonsecaea pedrosoi* inativado pelo calor.** 2021. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia-Bioquímica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A cromoblastomicose (CBM) é uma doença fúngica crônica que se apresenta sobre diversas formas. Acomete a epiderme, derme, subcutâneo, podendo ainda apresentar infecção secundária, levando a linfoedema e ocasionalmente carcinoma espinocelular. A infecção é adquirida na maioria dos casos por implantação traumática, através da entrada de conídios, fragmentos de hifas do patógeno pela pele. O agente etiológico na maior parte dos casos relatados é *Fonsecaea pedrosoi* sendo mais prevalente em países tropicais e subtropicais como Madagascar, Brasil, México, Cuba e República Dominicana. No Brasil, a doença tem sido descrita em diversos estados, sendo mais comum na região Amazônica, Sudeste e no Rio Grande do Sul. (ALDORRY, 1982; BONIFAZ et al., 2001; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). O tratamento é considerado um desafio, tanto pela duração e adesão do paciente, quanto à eficiência, sendo descritos muitos casos de recidivas e poucos casos de cura definitiva. Os tratamentos baseados em terapia específica e isolada, não se mostram eficientes devido ao alto índice de recidivas. Sugere-se que a abordagem preventiva através da imunização seja uma alternativa para diminuir o número de casos em áreas endêmicas associadas às áreas rurais onde o tratamento convencional se torna ainda mais difícil. Dada a importância da resposta imune adaptativa em infecções fúngicas, este trabalho visa avaliar o caráter protetor e os mecanismos envolvidos neste, após imunização por *Fonsecaea pedrosoi* inativados pelo calor na cromoblastomicose experimental murina.

Palavras-chave: *Heat Killed Fonsecaea pedrosoi*; Resposta Imune Celular; Cromoblastomicose; CBM.

Lista de Siglas

BSA	Soro fetal bovino
CBM	Cromoblastomicose
CD	Cluster de diferenciação
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFSE	Éster succinimidílico de carboxifluoresceína
D.A.I.	Dias após infecção
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo
DHN	Polímero di-hidroxina naftaleno
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FMO	Fluorescência menos um
FP	Fonsecaea pedrosoi
HK	Conídios inativados pelo calor
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
MOI	Multiplicidade de infecção
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	Tampão fosfato-salino
PRRs	Padrões de Reconhecimento Padrão
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
USP	Universidade de São Paulo

Sumário

Agradecimentos	5
Resumo	6
Lista de Siglas	7
Sumário	8
1. Introdução	9
1.1. Cromoblastomicose	9
1.2. <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	11
1.3. Manifestações Clínicas	12
1.4. Diagnóstico e Tratamento	14
1.5. Resposta Imunológica	15
1.6. Protocolos vacinais existentes e em desenvolvimento	19
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. Materiais e Métodos	21
3.1. Animais e Comitê de Ética	21
3.2. Cepa de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> e condições de cultura	21
3.3. Ensaio experimental de imunização dos camundongos	21
3.4. Ensaios de proliferação <i>in vitro</i>	22
3.5. Carga fúngica	23
3.6. Perfil de células por citometria de fluxo	24
3.7. Perfil de citocinas	25
3.8. Análise estatística.....	25
4. Resultados	25
4.1. Nível de citocinas em camundongos imunizados com <i>F. pedrosoi</i> inativado pelo calor.....	25
4.2. Proliferação de células do baço <i>in vitro</i> induzida por <i>F. pedrosoi</i> inativado pelo calor.....	30
4.3. <i>F. pedrosoi</i> inativado pelo calor induz o recrutamento de neutrófilos em camundongos (resposta celular dos animais induzida por <i>F. pedrosoi heat killed</i>)	32
4.4. Avaliação da presença de unidades formadoras de colônia (UFC) em camundongos imunizados	34
5. Discussão.....	35
6. Conclusão	37
7. Referências Bibliográficas	38

1. Introdução

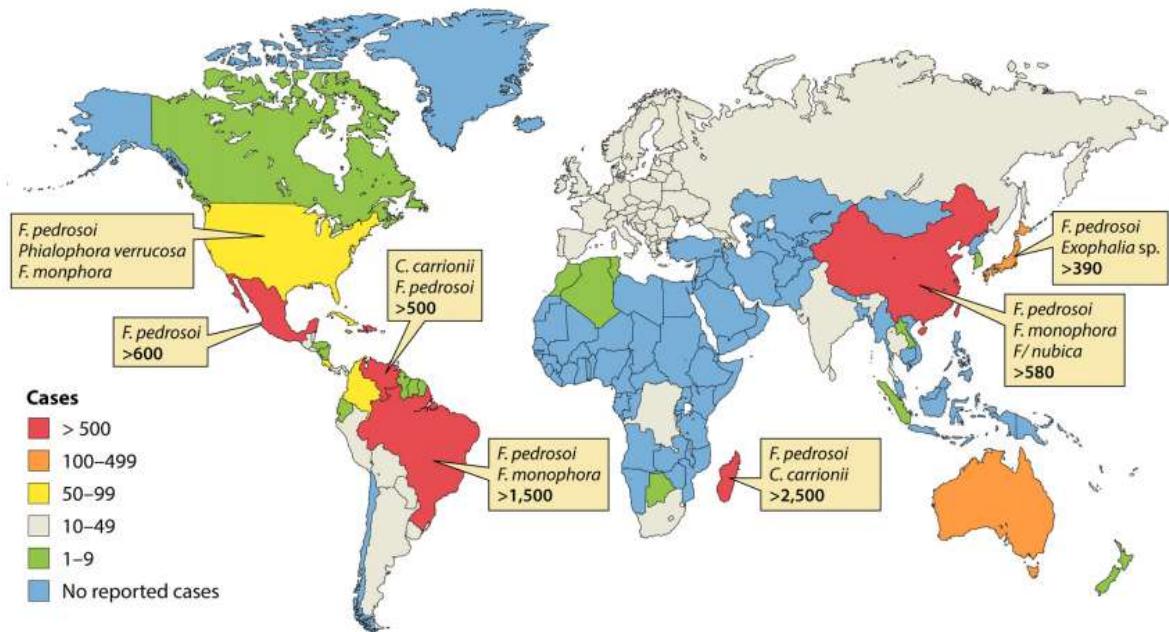
A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea crônica, supurativa, granulomatosa, causada por fungos dermatiáceos. Devido à produção de melanina apresenta coloração variante entre verde escuro até preta, característica associada a evasão ao sistema imunológico do hospedeiro. (REVANKAR, S.G., 2007; NOSANCHUCK et al., 2003). Está presente na lista de doenças tropicais negligenciadas (OMS/WHO), onde estão inclusas patologias endêmicas com alta prevalência em regiões subdesenvolvidas e áreas rurais de países tropicais e subtropicais. A infecção ocorre por implantação traumática, sendo na maioria dos casos relatados associados a espécie *Fonsecaea pedrosoi*.

1.1. Cromoblastomicose

A doença foi estudada pela primeira vez em 1911 por Alexandre Pedroso (São Paulo, Brasil), entretanto os seis primeiros casos foram descritos 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 São Paulo e Minas Gerais (CASTRO et al., 1987; RUDOLPH et al., 1914; SIQUEIRA, Isaque Medeiros., 2016). O nome “Cromoblastomicose” foi empregado pela primeira vez por Terra et al. (1922) com intuito de diferenciar a doença de uma outra patologia denominada dermatite verrucosa. (López Martínez e Méndez Tovar, 2007; ODDS et al., 1992).

Diversos fungos estão relacionados com a etiologia da doença; no entanto, *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* são as espécies com maior quantidade de casos reportados. Ambos são encontrados em regiões de clima subtropical e tropical, sendo *F. pedrosoi* mais comum em áreas com maior umidade relativa e *C. carrionii* tem maior prevalência em climas semiáridos. (BONIFAZ et al., 2001; ESTERRE et al., 1996; MINOTTO et al., 2001; PÉREZ-BLANCO et al., 2006; SILVA et al., 1999).

Figura 1 - Distribuição global da cromoblastomicose baseada no número de casos reportados.



Fonte: Queiroz-Telles F. et al., 2016

Na América do Sul, com exceção do Chile, a cromoblastomicose tem sido relatada em todos os países, sendo a maioria dos casos no Brasil, Venezuela e Colômbia. No Brasil a doença é endêmica na região norte onde foram relatados 872 casos nas últimas décadas em sua maioria causada por *F. pedrosoi*. Tem sido descrita em quase todos os estados, com destaque para São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (MELLO E SILVA et al., 1992; SILVA et al., 1998). As incidências médias anuais de casos de cromoblastomicose reportados no Brasil foram 6,4/ano no Estado do Paraná, 5,9/ano no Pará, 4,3/ano no Maranhão (Londero e Ramos, 1976; SILVA et al., 1998; MINOTTO et al., 2001; QUEIROZ-TELLES et al., 2003; Queiroz-Telles et al., 2009; PIRES et al., 2012).

A cromoblastomicose está fortemente associada às atividades agrícolas, mineradoras, madeireiras e a indivíduos expostos a materiais vegetais; (AL-DORRY, 1982; BONIFAZ et al., 2001; QUEIROZ-TELLES et al., 2009; Queiroz-Telles et al., 2011). Tal característica tem ressaltado ainda mais a natureza ocupacional desta doença. Durante suas atividades laborais, os indivíduos que vivem em áreas endêmicas são infectados por via traumática após a manipulação de solo e materiais relacionados à agricultura (GIMENES et al., 2006; QUEIROZ-TELLES et al., 2009). A prevalência é mais alta em indivíduos adultos do sexo masculino (MINOTTO et al.,

2001), sendo que homens entre 20 e 60 anos correspondem a cerca de 90% dos casos relatados (Brito e Bittencourt, 2018). Não há relatos de transmissão direta entre humanos e nem de animal para humanos (Brito e Bittencourt, 2018).

Após a implantação transcutânea os propágulos do agente etiológico da cromoblastomicose apresentam uma plasticidade celular e morfológica. Durante a infecção a diferenciação celular em células muriformes conferem um aumento na resistência às células efetoras do hospedeiro permitindo a cronificação da doença (GIMENES et al., 2006; QUEIROZ-TELLES et al., 2009).

1.2. *Fonsecaea pedrosoi*

Há quatro espécies do gênero *Fonsecaea* que causam CBM: *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pugnacius*, das quais a primeira é a mais associada a doença (90% dos casos de CBM) (Brito e Bittencourt, 2018). Apresentam hifas e conídios melanizados (De Hoog et al., 2000) e são encontradas em ambientes como solo, vegetais, troncos de madeira apodrecidos e material em decomposição (Siqueira et al., 2017). As espécies *F. monophora* e *F. pugnacius* mostram um neurotropismo significativo, levando eventualmente à disseminação para o cérebro e outros órgãos (DE AZEVEDO et al., 2015; DE HOOG et al., 2004; NAJAFZADEH et al., 2010).

Macroscopicamente, o cultivo de *F. pedrosoi* apresenta-se como uma colônia de aspecto cotonoso a aveludado de coloração verde oliva a negro. Microscopicamente, observam-se hifas septadas, ramificadas e de coloração marrom claro, que apresentam conidiação do tipo *cladosporium*, *rhinocladiella* e *phialophora* (Lacaz, 2002).

É considerado um fungo polimórfico uma vez que apresenta duas formas de crescimento, sendo a forma saprofítica os conídios, hifas e micélios e as formas com capacidade patogênica as células muriformes isoladas ou ligadas às hifas (ALVIANO et al., 1992; DA SILVA et al., 2002; SANTOS et al., 2007).

Nos tecidos, os fungos exibem uma micromorfologia de células redondas e ovais, acastanhadas, de paredes espessas, com cerca de 4 a 12 mícrons de diâmetro que se multiplicam por septação em dois planos distintos, chamados células

muriformes ou corpos escleróticos. A melanina dos fungos dermatiáceos é formada pelo polímero di-hidroxina naftaleno (DHN), que forma complexo de melanina, interagindo com proteínas lipídios e carboidratos da parede celular e representa um fator importante na virulência desses fungos por possuir um efeito inibidor da fagocitose (Brito e Bittencourt, 2018; FRANZEN et al., 2008).

Espécies patogênicas apresentam um ótimo crescimento a 33°C, com uma tolerância térmica de desenvolvimento a 37°C. Estas temperaturas se mostram ligeiramente superiores às das espécies estritamente ambientais (VICENTE et al., 2013).

1.3. Manifestações Clínicas

A infecção inicia-se com a entrada dos propágulos do agente etiológico em traumas causados geralmente em partes expostas do corpo como membros inferiores, ombros e face. O período entre a inoculação e o início da lesão inicial é incerto e pode variar de semanas a meses; alguns pacientes relatam não lembrar de qualquer lesão que tenha provocado a inoculação do agente. A lesão inicial pode se apresentar como lesão cutânea macular eritematosa e progredir até uma lesão papular rosa e lisa; podendo também se manifestar como erupção papuloescamosa e evoluir com aspectos polimórficos que podem ser confundidos com várias doenças infecciosas e não infecciosas (QUEIROZ-TELLES et al., 2016).

As manifestações clínicas da cromoblastomicose podem exibir diferentes graus de severidade. Na forma leve a lesão é geralmente única em placa ou nodular com menos de 5cm de diâmetro. Na forma moderada, lesões podem ser únicas ou múltiplas em placas, nodulares, ou verrucosas com lesões próximas a 15cm de diâmetro. Já na forma grave são comuns lesões que recobrem extensas partes da pele, sendo múltiplas ou únicas. Os pacientes costumam relatar prurido de intensidade variável nas lesões e dor quando na presença de infecção secundária. Complicações como infecções bacterianas, elefantíase e degeneração carcinomatosa podem ocorrer no quadro de cromoblastomicose (Brito e Bittencourt., 2018).

Figura 2 - Apresentações clínicas de lesões observadas em pacientes acometidos por Cromblastomicose. (A). Lesão inicial com 3 meses de duração no calcanhar. (B) Lesões confluentes nodulares no joelho. (C). Lesão tumoral na parte posterior do pé. (D). Lesão cicatricial com verruga apresentando contornos serpiginosos e verrucosos. (E) Lesão verrucosa hiperqueratótica na planta do pé. (F) Lesão em placa violácea na raiz da coxa.



Fonte: adaptado de Queiroz-Telles F. et al., 2016

De acordo com classificação proposta por Arturo Carrión (1950), há diferentes tipos clínicos característicos da CBM: nodular, verrucosa, placa, tumoral, cicatricial ou atrófica. No tipo nodular, a expressão clínica é de nódulos fibróticos, eritematoso-violáceos, com superfície lisa ou com hiperqueratose. O tipo verrucoso, com maior prevalência, é caracterizado por lesões com aspecto de couve-flor, secas, com hiperqueratose e pontos pretos, geralmente com abundância de agentes fúngicos. O tipo de placa apresenta placas eritematosas ou violáceas, infiltradas, circunscritas e irregulares, com pontos pretos e cicatrizes centrais. O tipo tumoral é caracterizado por lesões tumorais lobuladas, únicas ou coalescentes, com superfície lisa ou com crosta/escamosa ou aparência vegetativa. No tipo cicatricial ou atrófico, o aspecto clínico envolve lesões com configuração anular, serpiginosa ou irregular e crescimento centrífugo com áreas centrais atróficas, ocupando em alguns casos grandes áreas da

pele (Brito e Bittencourt., 2018; CAPLAN, 1968; Foster e Harris, 1987; ESTERRE et al., 1999).

1.4. Diagnóstico e Tratamento

As lesões causadas por cromoblastomicose são crônicas, indolentes e polimórficas. Podem ser confundidas com uma ampla variedade de doenças com causas infecciosas e não infecciosas; como por exemplo: hanseníase, candidíase, sífilis terciária neoplasias, psoríase, etc. O diagnóstico deve ser confirmado por análise histopatológica e exame micológico (QUEIROZ-TELLES et al., 2016).

A visualização de células muriformes em amostras clínicas é obrigatória para confirmação do diagnóstico desta doença. Elementos fúngicos pigmentados podem ser facilmente encontrados na superfície da lesão, e se assemelham a pequenos pontos negros. (QUEIROZ-TELLES et al., 2016). Tais estruturas observadas a olho nu representam pequenas crostas hemáticas, detritos celulares e estruturas fúngicas resultantes da eliminação transdérmica.

Microscopia direta utilizando hidróxido de potássio (KOH) 10-20% ou KOH/DMSO revelam corpos muriformes (escleróticos) independentemente das espécies causadoras. Os espécimes com maior probabilidade de um resultado positivo por essa técnica são aqueles de lesões com os chamados “pontos pretos” que são visíveis a olho nu, na superfície lesionada. A cultura fúngica em ágar Sabouraud é indicada para isolar e identificar as espécies como *F. pedrosoi*, a qual apresenta características macro morfológicas como colônias com aspecto aveludado, castanho-escuro, verde-azeitona ou pretas (QUEIROZ-TELLES et al., 2016; Brito e Bittencourt., 2018; MIRANDA et al., 2005).

O exame histológico do tecido mostra células muriformes características (ovaladas marrom-escuas, paredes espessas, medindo entre 4 e 12 micrômetros de diâmetro e com reprodução multiplanar) que podem estar dentro de células gigantes ou células gigantes multinucleadas do tipo Langhans, identificadas pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) de rotina. Hiperqueratose, hiperplasia pseudoepiteliomatosa da epiderme, reações piogranulomatosas e acantose irregular alternando com áreas de atrofia são as características histológicas mais importantes da cromoblastomicose (URIBE et al., 1892; Uribe et al., 1989; KHAN et al., 2012).

Pacientes com cromoblastomicose são considerados desafios terapêuticos, visto que é necessário um tratamento longo e por isso está associado a baixas taxas de cura e altas taxas de recidivas em casos crônicos e severos. O tratamento de escolha irá depender do agente etiológico, tamanho, extensão da lesão, topografia e complicações associadas. Acreditamos que os tratamentos baseados em terapia específica e isolada não são capazes de induzir resposta imune celular e, portanto, não se mostram eficientes devido ao alto índice de recidivas. Sugere-se que a abordagem preventiva através da imunização seja uma alternativa para diminuir o número de casos em áreas endêmicas associadas às áreas rurais onde o tratamento convencional se torna ainda mais difícil.

De maneira geral, o tratamento consiste no uso prolongado de drogas antifúngicas e, em muitos casos, associa-se métodos físicos como cirurgia, crioterapia, termo terapia, laser terapia, terapia fotodinâmica.

Diversos estudos sugerem que espécies de *Fonsecaea* tem alta sensibilidade *in vitro* a vários compostos triazois, incluindo Itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol, mas não a fluconazol, 5-fluxytosine e anfotericina B (FENG et al., 2012; DENG et al., 2013; DABOIT et al., 2014). De acordo com a maioria dos casos, Itraconazol é a droga de escolha para cromoblastomicose e tem tido excelentes resultados nos tratamentos de diferentes formas da doença. A segunda droga mais usada é a terbinafina, a qual demonstra uma taxa de cura similar àquela obtida com Itraconazol (15-80%) (Grant e Clissold, 1989; QUEIROZ-TELLES et al., 1992).

1.5. Resposta Imunológica

As barreiras físicas da pele e as superfícies das células epiteliais da mucosa do trato respiratório, gastrointestinal e gênito-urinário constituem o primeiro conjunto de defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas. Defensinas, colectinas e componentes do sistema complemento também promovem o reconhecimento e a opsonização de células fúngicas. O reconhecimento dessas células é mediado por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células hospedeiras, como os receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores de lectina tipo C, os quais interagem com estruturas conservadas entre os microrganismos denominados

padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Após o reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs, ocorre a ativação de sinais intracelulares que levam à ativação das células de defesa (BONIFAZ et al., 2001).

Além de PAMPs, os PRRs de mamíferos são capazes de reconhecer padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) que são liberados durante o estresse e lesão celular (Bianchi., 2007). A parede celular dos fungos varia sua composição dependendo de sua morfologia. Os três componentes mais abundantes na parede celular de fungos importantes clinicamente são: β -glucanas, quitina e mananas. Outro componente importante encontrado em fungos patogênicos é a melanina que aumenta a resistência aos mecanismos efetores da resposta imune e reduz sua suscetibilidade aos antifúngicos (ROMANI., 2011; LATGÉ et al., 2013; TABORDA et al., 2008).

A melanina é um pigmento presente na camada externa de todas as formas de *F. pedrosoi* que confere ao fungo a coloração escura típica. Observa-se maior deposição desse pigmento nas células escleróticas que são capazes de bloquear os sítios de ligação de anticorpos anti-CHM; contribuindo para aumento de virulência e capacidade de evasão imunológica (Breda et al., 2020).

Células do sistema imune inato participam da resposta por meio de fagocitose e eliminação direta, bem como na produção de mediadores capazes de ativar vias efetoras da imunidade adaptativa (Romani., 2011). A fagocitose do fungo por células apresentadoras de抗ígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas, induz a maturação dessas células e promove a diferenciação de células T *Naïve* em células T auxiliares (Th) efetoras (SIQUEIRA et al., 2017). A maior deposição de melanina tem sido associada à inibição da capacidade de fagocitose de células escleróticas por macrófagos (Breda et al., 2020).

Em relação à resposta imune adaptativa, estudos tem demonstrado que linfócitos T, mais precisamente a subpopulação TCD4 $^{+}$ é a responsável por controlar o avanço da doença, bem como a ausência de linfócitos do tipo TCD8 $^{+}$ não interfere na capacidade de resposta do organismo. O padrão de células linfocitárias Th1 é importante devido a produção de IFNy (Breda et al., 2020).

Uma resposta imune adaptativa predominantemente do padrão Th1 está diretamente associada à proteção contra fungos e à efetividade de vacinas antifúngicas (SPELLBERG et al., 2008). 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 IFNy, que é importante no processo de ativação de fagócitos no sítio de infecção (DE OLIVEIRA et al., 2008; NESBIT et al., 2010; ZHANG et al., 2009). Junto com a resposta Th1, a população de linfócitos Th17 também está associada ao padrão de resposta protetora contra infecções fúngicas (VINH et al., 2010; PUEL et al., 2010).

Linfócitos Th17 desempenham papel importante na resposta do hospedeiro contra patógenos extracelulares, embora também estejam associados à patogenia de cunho autoimune e alérgicas. Células Th17 estão presentes no repertório de linfócitos T fungo-específicos de memória em humanos e mediam a proteção induzida por vacina em camundongos (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; BOZZA et al., 2009; CHAI et al., 2010; WÜTRICH et al., 2015). Recentemente, estudos *in vitro* demonstraram que a diferenciação celular de linfócitos TCD4⁺ em linfócitos Th17 com o concomitante aumento de IL-17 foi capaz de diminuir a carga fúngica nos estágios iniciais da doença (Siqueira et al., 2020).

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 (MOUDGIL., 2015). A IL-17 está relacionada a liberação de AMP (adenosina 3' 5'-monofosfato) na pele e em infecções fúngicas; auxiliando o processo de eliminação de estruturas extracelulares como hifas. Sendo também responsável pela polarização anti-inflamatória de macrófagos e a migração de neutrófilos (Yu et al., 2007 e Laan et al., 1999). Baixos níveis de IL-10 e altos níveis de IFNy foram encontrados em pacientes que apresentavam formas mais brandas da doença ao contrário dos pacientes que apresentavam a forma severa e crônica, indicando uma possível atuação importante dessas citocinas no processo de resposta contra o patógeno (Teixeira et al., 2006 e Gimenes et al., 2005).

Em infecções fúngicas, o processo de tolerância imunológica está intimamente relacionado à atividade das células T regulatórias. O padrão de resposta dessas células pode limitar a eficácia da resposta imune protetora, acarretando na eventual persistência de células fúngicas nos hospedeiros (ROMANI et al., 2006) e finalmente imunossupressão (FERREIRA et al., 2010).

Assim, as doenças fúngicas representam um paradigma importante em imunologia, uma vez que podem resultar tanto da falta de reconhecimento pelo sistema imunológico quanto da super ativação da resposta imunológica com indução de resposta inflamatória exacerbada (ROMANI., 2011). Em 2011 Souza e colaboradores demonstraram que a ineficiência do sistema imune do hospedeiro em responder e combater o fungo está relacionada a uma falha de reconhecimento por Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs).

A reação granulomatosa, característica das lesões na cromoblastomicose, associada com abscessos ricos em neutrófilos, demonstra a incapacidade das células fagocíticas em eliminar completamente o fungo. Neutrófilos representam a primeira linha de defesa do hospedeiro seguido por macrófagos ativados (ESTERRE et al., 1993). Além da ação de fagocitose, essas células podem desempenhar a função de células apresentadoras de antígeno aos linfócitos T, estimulando a produção de IFN γ e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como participando da formação da resposta inflamatória granulomatosa (Teixeira de Souza et al., 2006). Estudos envolvendo componentes de parede de *F. pedrosoi* e de outros agentes da cromoblastomicose ainda são objeto de dúvida para a comunidade científica, entretanto, estudos indicam que moléculas como β -glucanas da parede celular fúngica estimulam Toll-like Receptors (TLRs) indicando um possível mecanismo envolvido na resposta inata contra a cromoblastomicose (Levitz SM., 2004).

Os mecanismos da imunidade adaptativa na cromoblastomicose incluem a resposta imune mediada por linfócitos Th1 e Th2. Em pacientes portadores da doença, anticorpos IgG, IgM e IgA são produzidos e podem ser identificados por ELISA ou immunoblotting (ESTERRE et al., 2000; Sotto MN et al., 2004). Estudos apontam que na forma severa da cromoblastomicose a proliferação de células T é ineficiente, sendo marcante a produção de IL-10 e baixos níveis de IFN γ ; já em pacientes com a forma

branda da doença, a produção de IFNy é intensa e detecta-se baixos níveis de IL-10 com proliferação eficiente de células T (GIMENES et al., 2005).

Análises imuno-histoquímicas têm demonstrado intensa participação de linfócitos T secretores de IL-17 em processos inflamatórios de lesão de pacientes portadores de cromoblastomicose. A expansão de células Th17 também pode ser observada em linfonodos de camundongos infectados com conídios de *F. pedrosoi*, situação relacionada com o reconhecimento do fungo pelos receptores dectina-1 e dectina-2 (WÜTHRICH et al., 2015; SILVA et al., 2014).

1.6. Protocolos vacinais existentes e em desenvolvimento

Devido à grande dificuldade encontrada no tratamento de infecções fúngicas, que pode estar relacionada às características desses patógenos, que garantem uma maior capacidade de evasão do sistema imune do hospedeiro; diversos grupos tem se dedicado ao estudo de protocolos vacinais, visando uma abordagem preventiva como melhor arsenal de combate a patologias provocadas por esses microrganismos.

Capilla et al. (2007) realizaram trabalhos demonstrando o fator de proteção contra aspergilose letal, conferido pela imunização por *Saccharomyces cerevisiae* mortos pelo calor. Liu et al. (2011) realizaram ensaios utilizando preparações contendo hemolisinas expressas em um vetor de *S. cerevisiae* e observaram que o vetor vazio também conferiu proteção parcial em um modelo de coccidiomicose experimental, estabelecendo precedentes para a hipótese de que fungos inativados pelo calor (*heat-killed*) podem ser candidatos no desenvolvimento de vacinas contra infecções fúngicas.

Embora ensaios com leveduras mortas pelo calor (*heat-killed yeast*) tenham demonstrado proteção efetiva em aspergilose sistêmica, coccidiomicose, candidíase e criptococose, ainda assim, as respostas da imunidade humoral e celular após a vacinação por HKY não estão completamente elucidadas.

Vacinas de subunidade são os tipos mais investigados recentemente, consistem em uma ou mais proteínas recombinantes ou polissacarídeos fúngicos. Com o avanço da engenharia genética e mais informações sobre o processo patogênico dos fungos tem ajudado os pesquisadores a desenvolver vacinas de

subunidades cada vez mais eficientes. As vantagens associadas a esse tipo de vacina estão na ausência do agente patogênico e, portanto, a sua maior segurança na aplicação em pacientes imunocomprometidos (Cassone et al., 2008).

Em 2012, Schmidt e colaboradores demonstraram que uma proteína de invasão semelhante a aglutinina 3 (Als3p) conjugada com alúmen denominada NDV-3 conferiu proteção contra *Candida spp.* por meio da prevenção da adesão levedura/epitélio; além disso a NDV-3 induziu proteção cruzada contra patógenos bacterianos altamente infecciosos como *S. aureus*.

Sabendo da dificuldade de adesão às formas de tratamento existentes, bem como sua toxicidade e altas taxas de recidivas, e em consonância com a estratégia que vem sendo adotada pela comunidade científica; este trabalho visa estudar a resposta imunológica em camundongos previamente imunizados por *Fonsecaea pedrosoi* inativados pelo calor em cromoblastomicose experimental, quanto ao caráter protetivo, eficiência e mecanismos envolvidos na resposta imune adaptativa e inata.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar a resposta imunológica adaptativa e inata e avaliar o caráter protetivo da imunização com o fungo *Fonsecaea pedrosoi* inativado pelo calor na cromoblastomicose experimental.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a capacidade protetora da imunização com *F. pedrosoi* inativado por calor, pelo perfil de citocinas e contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) no baço e fígado de camundongos.
- ✓ Caracterizar o perfil celular dos linfonodos poplíteos e inguinais e baço após a imunização e infecção.
- ✓ Investigar o perfil de resposta Th1/Th2/Th17 no baço e linfonodos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais e Comitê de Ética

Camundongos Balb/c fêmeas com idades entre 8 e 12 semanas foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram alojados em um ambiente com temperatura e umidade controladas e tiveram livre acesso a ração e água. Este estudo foi realizado de acordo com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (CEUA / FCF Protocolo 591/19) . Todas as experiências com animais foram realizadas com grupos de 4-8 animais.

3.2. Cepa de *Fonsecaea pedrosoi* e condições de cultura

A cepa CBS 37.137 de *F. pedrosoi* foi utilizada em todos os experimentos. A cepa foi mantida em ágar *Sabouraud* dextrose (Difco®) a 30°C. As colônias foram cultivadas em incubadora com agitação por 7 dias a 30°C em caldo batata (KASVI®) para ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os conídios foram filtrados por filtros *cell strainer* de 40µm (Falcon®) para remover as hifas e lavados com solução salina tamponada com fosfato 1x (PBS) três vezes antes do uso (conídios vivos para infecção). Os conídios foram contabilizados por câmara de *Neubauer* e ajustados para obter uma contagem de 1×10^8 conídios/ml em suspensão estéril de PBS 1x. Para preparar a suspensão de *F. pedrosoi* morto pelo calor (HK), os conídios foram mortos pelo aquecimento da suspensão a 85°C por 3 horas, de acordo com o protocolo adaptado de Martinez et al. (2017). A viabilidade das células mortas pelo calor foi determinada pelo plaqueamento das células em *Sabouraud* Dextrose Agar (Difco®). Em seguida, as suspensões de HK foram armazenadas a -20°C até o uso.

3.3. Ensaio experimental de imunização dos camundongos

Os grupos experimentais foram separados conforme o tratamento administrado, como descrito na Tabela 1. Os animais foram imunizados por via subcutânea uma vez por semana durante duas semanas (nos dias 0 e 7) em dois

sítios dorsais (metade da dose total em cada local). Em dois grupos aleatórios (HK, n=8) foram injetados 150 µl de suspensão de HK ($1,5 \times 10^7$ conídios/dose/animal) em outro grupo (PBS, n=8) foi injetado 150 µl de PBS estéril 1x.

Uma semana após a última imunização (no dia 14) como descrito acima, um grupo previamente imunizado com HK e outro com PBS foram infectados com 100 µl de conídios vivos de *F. pedrosoi* (1×10^7 conídios/animal) por inoculação intraperitoneal (IP). Esses grupos foram chamados de HKFP e PBSFP, respectivamente. No outro grupo previamente imunizado com HK foi injetado 100 µl de PBS por via IP. Esses grupos foram chamados de HKPBS.

Após a infecção, quatro animais de cada grupo foram eutanasiados 7 e 14 dias após a infecção (dias 21 e 28). Os linfonodos poplíteos e inguinais, o baço e fígado foram coletados para contagem de organismos viáveis, análise do perfil celular e medição dos níveis de citocinas.

Tabela 1 - Identificação dos grupos. Os grupos estão separados de acordo com seus respectivos tratamentos. **HKPBS**: animais que receberam duas imunizações com suspensão de conídios inativados pelo calor com sete dias de intervalo entre as doses, e não foram infectados, sendo eutanasiados no vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dia após o início do ensaio – controle de imunização; **PBSFP**: animais que foram imunizados com PBS 1x e infectados com suspensão de conídios vivos, sendo eutanasiados após 7 e 14 dias de infecção – controle de infecção; **HKFP**: animais imunizados com suspensão de conídios mortos pelo calor e infectados com suspensão de conídios vivos, sendo eutanasiados após 7 e 14 dias de infecção. **NA**: Não aplicável, não foi realizada nenhuma ação no grupo.

Grupo	Procedimento				
	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
HKPBS (1-4)	1º Dose HK	2º Dose HK	1º Dose PBS	Eutanásia	NA
HKPBS (5-8)	1º Dose HK	2º Dose HK	1º Dose PBS	NA	Eutanásia
PBSFP (1-4)	1º Dose PBS	2º Dose PBS	1º Dose FP	Eutanásia	NA
PBSFP (5-8)	1º Dose PBS	2º Dose PBS	1º Dose FP	NA	Eutanásia
HKFP (1-4)	1º Dose HK	2º Dose HK	1º Dose FP	Eutanásia	NA
HKFP (5-8)	1º Dose HK	2º Dose HK	1º Dose FP	NA	Eutanásia

3.4. Ensaios de proliferação *in vitro*

Para avaliar a proliferação de células T, seis camundongos Balb/c foram infectados via IP com 100 µl de conídios vivos de *F. pedrosoi* (1×10^7 conídios/animal); dois camundongos Balb/c foram imunizados por via subcutânea uma vez por semana durante duas semanas com 150 µl de suspensão de HK ($1,5 \times 10^7$ conídios/dose/

animal) em dois sítios dorsais (metade da dose total em cada local); dois camundongos Balb/c receberam 100 μ l de PBS estéril via IP.

Sete, quatorze e vinte e um dias após a infecção e sete dias após a última imunização, os baços de todos os animais foram removidos e as células totais dos baços foram lavadas por centrifugação e suspensas em PBS com BSA a 0,1% (p/v) a uma concentração de 10^6 células/ml. Éster de succinimidil de carboxifluoresceína (CFSE, *CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit*, ThermoFisher Scientific®) foi adicionado a uma concentração final de 0,5 μ M e incubado a 37°C por 10 min.

As células foram lavadas por centrifugação três vezes, contadas e cultivadas a 3×10^5 células/poço em meio RPMI (Gibco®) com BSA a 10% (Vitrocell®). As células foram estimuladas com diferentes doses de *F. pedrosoi* HK (6×10^5 ; 3×10^5 ; $1,5 \times 10^5$ e $7,5 \times 10^4$). 1 μ g/ml de Concavalina A (ConA, Sigma – Aldrich®) foi usado como controle positivo para mitose, e PBS 1x foi usado como controle negativo. As células foram cultivadas durante 5 dias a 37°C com 5% de CO₂. As células foram coletadas e lavadas três vezes por centrifugação a 400 \times g com PBS 1x. O perfil celular foi analisado por meio do citômetro de fluxo (FACS Canto II ®, BD) e do software FlowJo®, com anticorpos anti CD3, CD4 e CD8. Os sobrenadantes da cultura de células foram armazenados a -80 ° C para medição dos níveis de citocinas.

3.5. Carga fúngica

A carga fúngica no fígado e baço de camundongos infectados (grupos HKFP e PBSFP) foi determinada 7 e 14 dias após a infecção pela contagem do número de CFU (unidade formadora de colônia). Resumidamente, os órgãos de cada animal foram homogeneizados com PBS 1x estéril, e as alíquotas (100 μ l) de cada suspensão de células foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco®) a 30°C por 14 dias. O número de colônias viáveis de *F. pedrosoi* por grama de órgão foi transformado em log₁₀. As suspensões de células foram então centrifugadas a 400 \times g durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram coletados para medições de citocinas e as células foram lavadas três vezes com PBS para análise de citometria de fluxo.

3.6. Perfil de células por citometria de fluxo

Células do baço e linfonodos de camundongos e células provenientes de proliferação *in vitro* foram avaliadas por citometria de fluxo (FACSCantol[®], BD) e pelo software FlowJo[®]). Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa BD Biosciences[®]. Resumidamente, as células foram obtidas através da maceração dos órgãos, centrifugação e lavagem por três vezes com solução de 0,1% de BSA em PBS 1x. Posteriormente, as células foram incubadas por trinta minutos com seu respectivo anticorpo como descrito na Tabela 2: APC-Cy7 *anti-mouse* CD3; PerCP Cy5 *anti-mouse* CD4, APC *anti-mouse* CD8, PE *anti-mouse* CCR7, FITC *anti-mouse* CD62L, APC-Cy7 *anti-mouse* CD11b, FITC *anti-mouse* GR1, APC-Cy7 *anti-mouse* CD19, APC *anti-mouse* IgM, APC *anti-mouse* CD11c e PE *anti-mouse* MHCII. Após lavagem por três vezes e centrifugação a 400 x g com solução 0,1% BSA em PBS 1x, as células foram processadas em citômetro de fluxo (FACSCanto II). As análises foram realizadas no software FlowJo pelo método de *gate*, sendo inicialmente eliminados os *Doublets*, seguido da delimitação da população a ser analisada de acordo com granulosidade e tamanhos relativos das populações. O perfil celular foi então determinado com a adição de *gates* e a população celular de interesse foi definida conforme o fenótipo dos marcadores específicos utilizados.

Tabela 2 – Relação de marcação de抗ígenos de superfície por célula alvo

Célula a ser caracterizada	Tipo de marcação esperada
Células Dendríticas	CD45 ⁺ / CD11b ⁻ / CD11C ⁺ / MHCII ⁺
Macrófagos	CD45 ⁺ / CD11b ⁺ / CD11C ⁻ / GR1 ⁻
Neutrófilos	CD45 ⁺ / CD11b ⁺ / CD11C ⁻ / GR1 ⁺
Células TCD4 ⁺	CD3 ⁺ / CD4 ⁺
Células TCD8 ⁺	CD3 ⁺ / CD8 ⁺
Células T de Memória Efetora	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD62L ⁺ /CCR7 ⁺
Células T de Memória Central	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD62L ⁻ /CCR7 ⁻
Células B	CD45 ⁺ /B220 ⁺ /CD19 ⁺ /IgM ⁺

3.7. Perfil de citocinas

O sobrenadante de todos as suspensões de macerado de órgãos e culturas de células foram utilizadas para avaliação de citocinas. Todas as concentrações de citocinas foram mensuradas utilizando kits DuoSet® ELISA da empresa R&D Systems segundo instruções da própria fabricante. O sobrenadante foi coletado e os níveis das seguintes citocinas foram detectados: IFN- γ , IL-17, IL-10, IL-6, IL-4, and TNF- α .

3.8. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas com auxílio do *software* Prism5® (GraphPad). Todos os valores foram reportados com médias e desvios padrões das médias. Resultados foram considerados estatisticamente significantes com valor de $p \leq 0.05$ (*), ≤ 0.01 (**), ≤ 0.001 (***) e ≤ 0.0001 (****).

4. Resultados

4.1. Nível de citocinas em camundongos imunizados com *F. pedrosoi* inativado pelo calor.

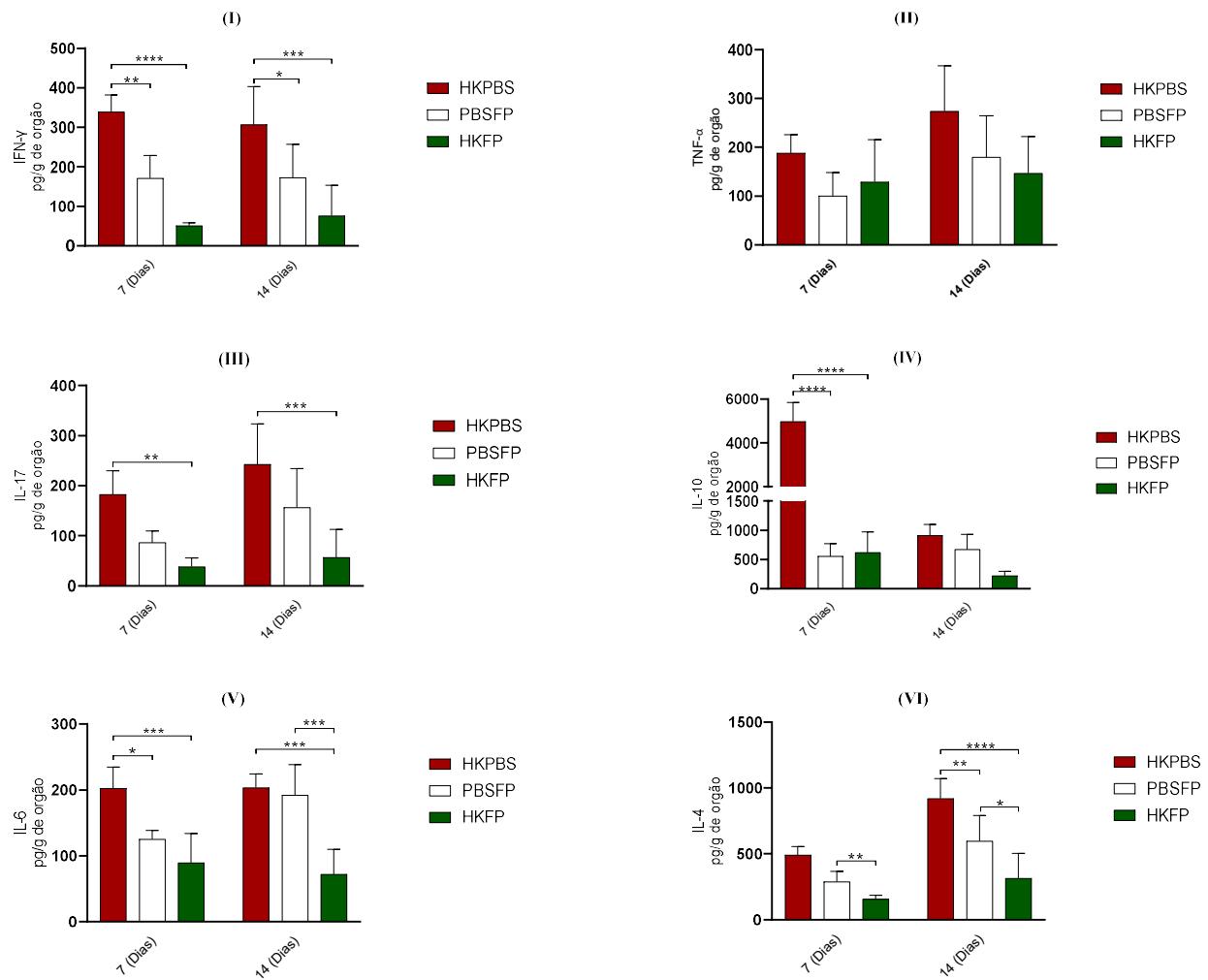
Através de ensaios de *ELISA* realizados com o sobrenadante dos macerados dos órgãos pudemos avaliar o perfil das citocinas que foram expressas durante os desafios propostos por este estudo. Para tanto, analisamos o efeito de cada tratamento em cada órgão separadamente.

Em relação à análise de citocinas contidas no sobrenadante do macerado esplênico (Figura 3), podemos observar que o grupo HKPBS – submetido apenas à imunização – apresentou aumento significante em IFNy; IL-17; e IL-6 em relação aos demais grupos após 7 e 14 dias de infecção. Observa-se também aumento significativo de IL-10 após 7 dias de ensaio com retomada dos níveis não significantes aos 14 dias de ensaio. O comportamento contrário é observado em relação a IL-4.

O aumento estatisticamente significativo de IFNy nos animais do grupo HKPBS pode indicar uma tendência a modulação pró-inflamatória do sistema imune dos animais. Através da ação dessa citocina ocorre a ativação de macrófagos, células

B promovem a troca de isotipo para subclasses IgG opsonizadoras e fixadoras de complemento, células T passam a se diferenciar em Th1 além do aumento da expressão de MHC de classe I e II que corrobora com intensificação da capacidade de processamento de antígenos (Abbas (2013)).

Figura 3 – Nível de citocinas observadas no sobrenadante do macerado de baço dos camundongos. Observa-se aumento significativo em IFNy em relação aos outros grupos (I, 7 e 14 d.a.i.). Em relação a TNF- α não foram observadas alterações significantes; apenas há uma tendência de aumento nos animais que foram apenas imunizados – HKPBS – (II, 7 e 14 d.a.i.). Nas dosagens de IL-17 observa-se aumento significativo nos animais do grupo HKPBS em relação aos demais grupos. (III, 7 e 14 d.a.i.). Este comportamento é semelhante em IL-10, porém só é significativo aos 7 dias após infecção (IV, 7 d.a.i.). Aos 7 dias após infecção observamos também um aumento de IL-6 nos animais do grupo HKPBS em relação aos demais e aos 14 dias a significância é observada nos grupos HKPBS e PBSFP (V, 14 d.a.i.) em relação ao grupo HKPBS. Finalmente para IL-4 demonstramos significância entre PBSFP e HKFP aos 7 dias após infecção; aos 14 dias observa-se um aumento em HKPBS em relação aos demais grupos e PBSFP segue aumentado em relação a HKFP (VI, 7 e 14 d.a.i.).

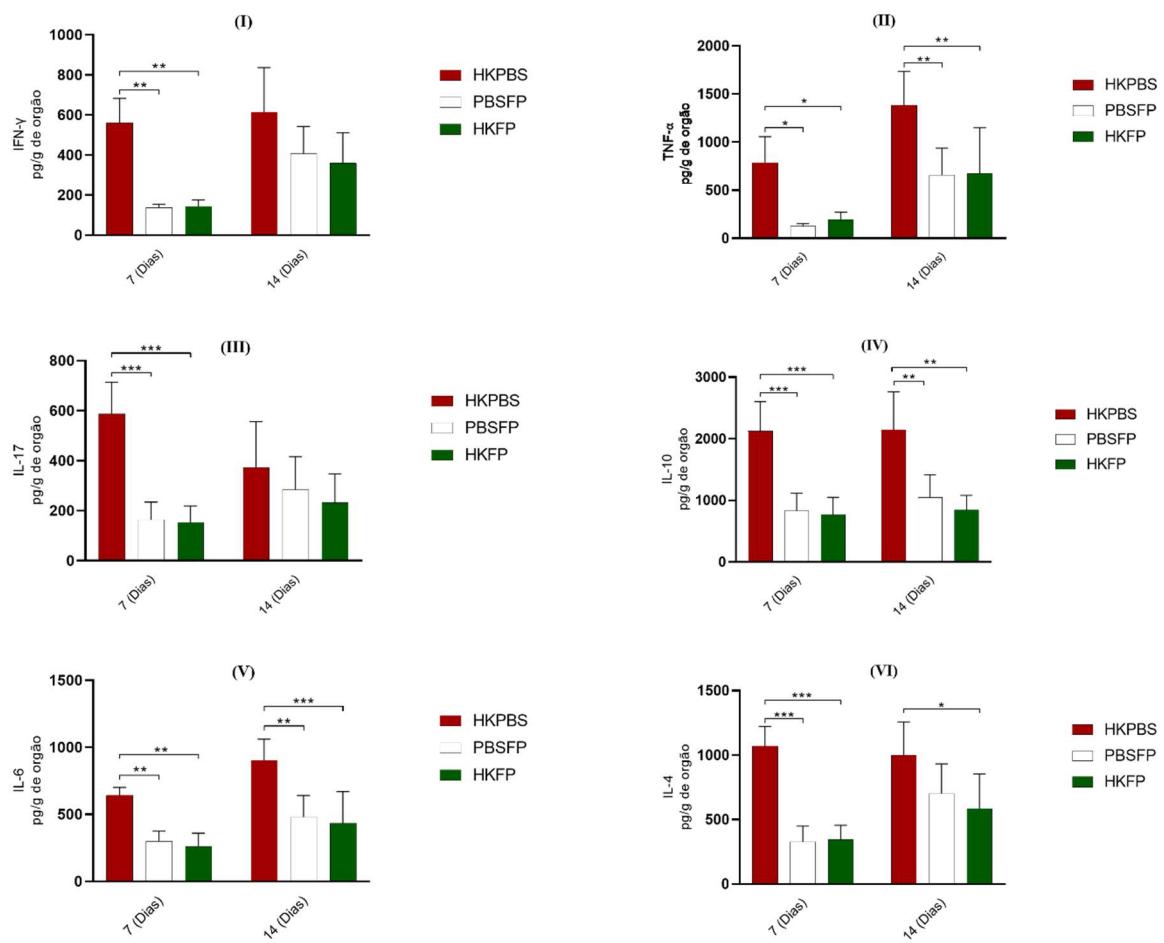


Em concordância com a modulação exposta anteriormente, nestes grupos é possível observar aumento de IL-17 que irá atuar promovendo aumento de produção de quimiocinas e fatores estimuladores de colônias de granulócitos e macrófagos como GM-CSF e G-CSF. Ademais IL-6 irá promover estabelecendo proteínas de fase aguda no fígado, além de induzir diferenciação de células B em células produtoras de anticorpos e células T Naïve em Th17 (Abbas (2013)). O aumento de TNF α no fígado (Figura 4) indica inflamação de endotélio, ativação de neutrófilos e instalação de quadro febril e catabólico Abbas (2013).

Após 14 dias de infecção a ativação de macrófagos passa a ser mediada por IL-4, que também irá atuar nas células B promovendo troca de isotipo para IgE e induzindo proliferação de células T.

Em contrapartida observa-se aumento nos níveis de IL-10 como citocina de caráter anti-inflamatório que promove inibição de MHC de classe II e fatores coestimuladores. Esse aumento poderia ser explicado devido a equilíbrio homeostático do organismo que tem intensa atuação de citocinas pró-inflamatórias; e provavelmente é proveniente de células T Regulatórias.

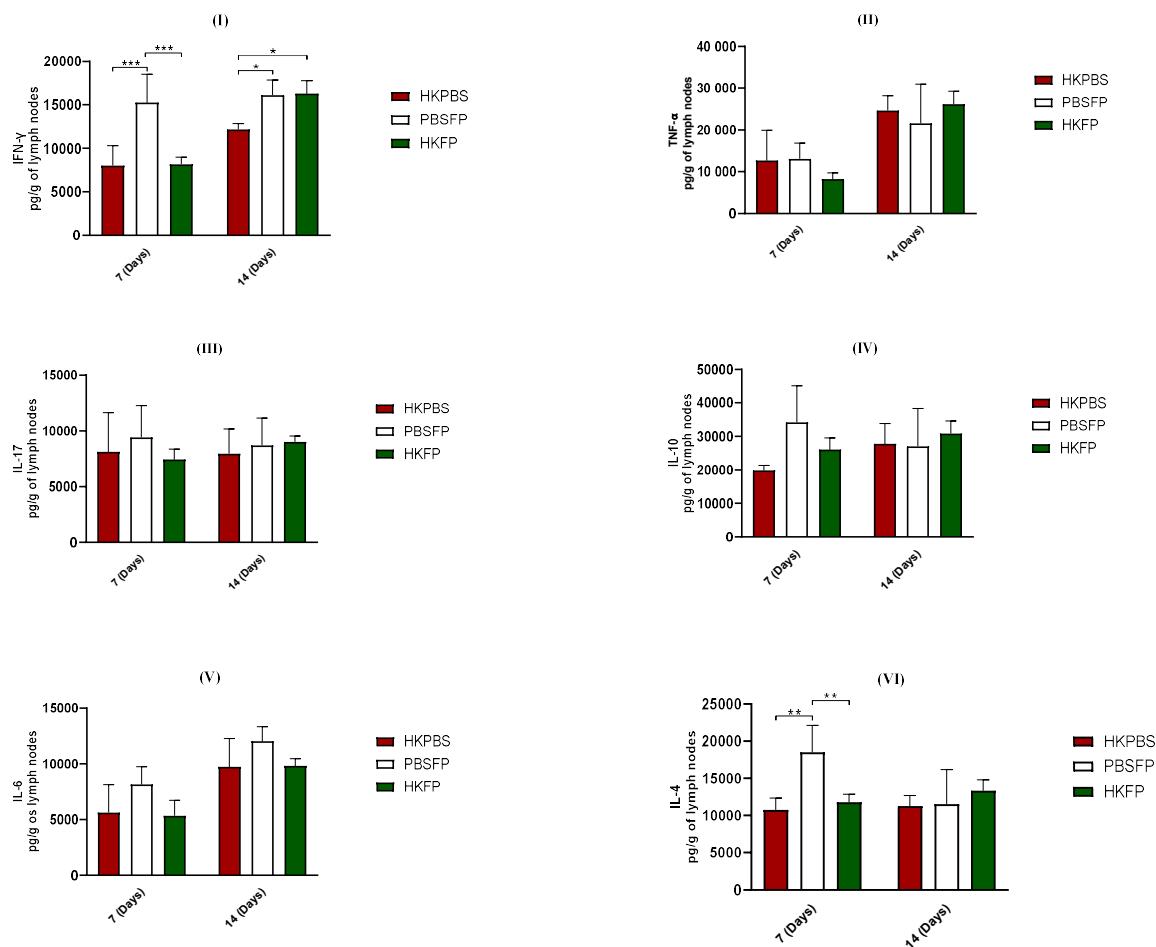
Figura 4 – Nível de citocinas observadas no sobrenadante do macerado de fígado dos animais.
 Podemos ver uma redução nos níveis de Interferon- γ após 7 dias após a infecção (d.a.i.) nos animais dos grupos HKFP e PBSFP em comparação com os controles de HKPBS (I, 7 d.a.i.). Em relação ao TNF- α , foi possível notar uma diferença estatística aos 7 e 14 dias após a infecção com HKFP e PBSFP apresentando um nível inferior em relação ao HKPBS (II, 7 e 14 d.a.i.). Para IL-17, o grupo HKPBS teve um nível mais alto em comparação com os grupos HKFP e PBSFP (III, 7 d.a.i.). Há um aumento significativo na IL-10 no grupo HKPBS em relação aos grupos infectados (IV, 7 e 14 d.a.i.). Aos 7 e 14 dias após a infecção, uma redução nos níveis de IL-6 é observada nos dois grupos desafiados PBSFP e HKFP (V, 7 e 14 d.a.i.) em comparação com HKPBS. Para IL-4, um nível mais baixo de HKFP e PBSFP é observado quando comparado com HKPBS (VI, 7 d.a.i.), aos 14 dias após a infecção esta significância persiste apenas em relação a HKFP (VI, 14 d.a.i.).



O nível de citocinas apresentado no grupo HKFP demonstra uma tendência a uma resposta mais branda em relação aos demais grupos desafiados, tal condição provavelmente ocorre em decorrência desse grupo ter sido previamente sensibilizado com o antígeno – na forma de conídios inativados pelo calor.

Não observamos diferenças significativas na expressão de TNF- α , IL-17, IL-10 e IL-6 no sobrenadante de linfonodos entre os grupos (Figura 5).

Figura 5 – Nível de citocinas observado no sobrenadante do macerado de linfonodo dos animais.
 Podemos observar diferença estatística em relação ao grupo PBSFP, cujo tratamento induziu maior nível aos 7 e 14 dias de infecção (I, 7 e 14 d.a.i.). Em relação aos níveis de IL-4, observa-se maior quantidade de PBSFP aos 7 dias de infecção em relação aos demais grupos (VI, 7 d.a.i.). Não há diferenças estatísticas em relação às outras citocinas.

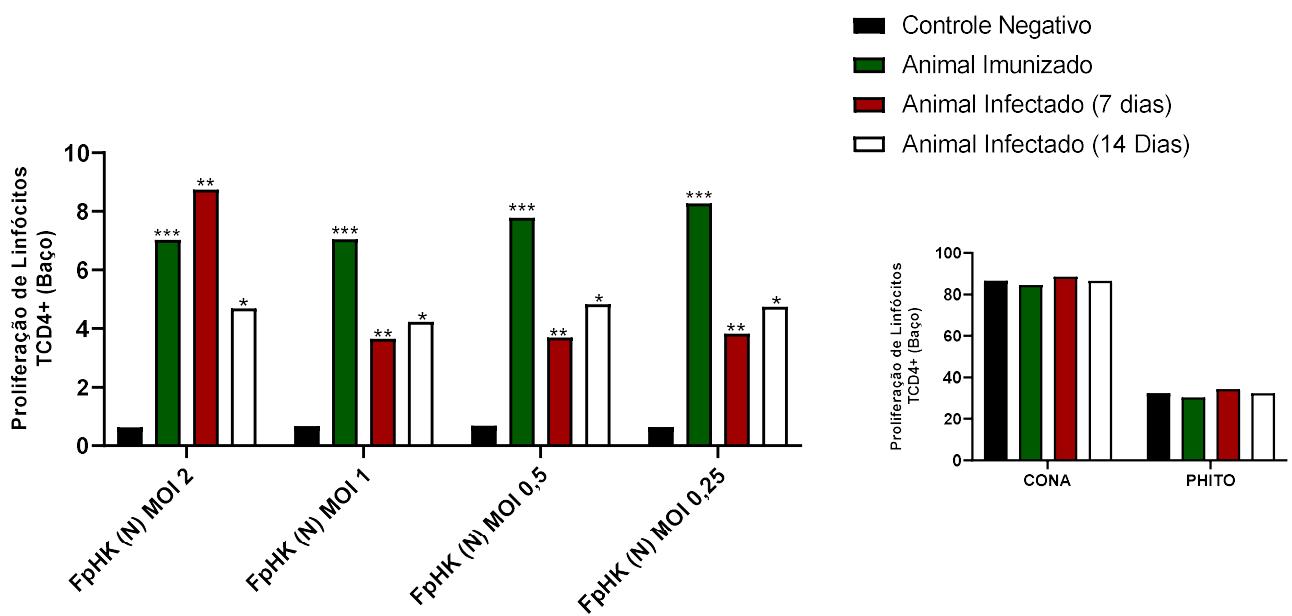


Os níveis de IL-4 foram semelhantes no sobrenadante do baço e do fígado. Os camundongos infectados demonstraram baixo nível dessa citocina e camundongos HKPBS foram capazes de produzir IL-4 em todos os momentos de infecção no fígado. Curiosamente, camundongos imunizados com PBS antes da infecção (PBSFP) promoveram maior expressão de IL-4 em nódulos linfáticos (após 7 dias de infecção) em comparação com todos os grupos (Figura 5).

4.2. Proliferação de células do baço *in vitro* induzida por *F. pedrosoi* inativado pelo calor.

Avaliamos se conídios de *F. pedrosoi* inativados pelo calor foram capazes de induzir a proliferação celular de linfócitos T em células que foram previamente sensibilizadas com o fungo vivo, em células de animais imunizados, e células de animais não sensibilizados. Os camundongos foram imunizados com conídios inativados pelo calor ou PBS1x (como descrito anteriormente) e as células foram cultivadas por uma semana após a última dose (21 dias após a primeira administração). Os animais que foram infectados com o fungo vivo tiveram suas células cultivadas por uma ou duas semanas após a infecção. A proliferação celular foi realizada com células de baço marcadas com CFSE em resposta ao estímulo com conídios inativados por calor em diferentes concentrações.

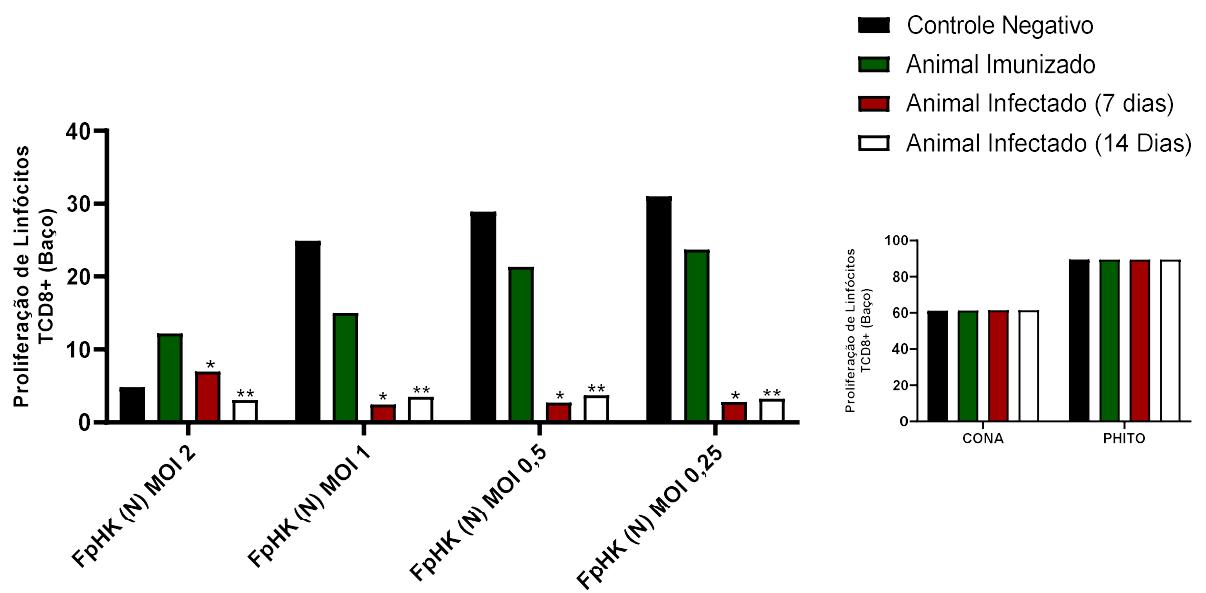
Figura 6 – Proliferação de Linfócitos TCD4+ no baço de animais de acordo com o tratamento.



Para o ensaio avaliando a proliferação de células TCD4+, em relação ao controle negativo, os animais que foram imunizados e infectados apresentaram proliferação significante. O grupo que foi apenas imunizado mostra uma tendência de proliferação maior em MOI 1; 0,5 e 0,25. Os controles mitogênicos de Concavalina A

(CONA) e Fitohemaglutinina (PHITO) foram positivos, indicando que as células estavam em plenas condições de proliferação.

Figura 7 – Proliferação de Linfócitos TCD8+ no baço de animais de acordo com o tratamento



Para o ensaio avaliando a proliferação de células TCD8+, em relação ao controle negativo, apenas os animais que foram infectados apresentaram proliferação significante, sendo esta menor que o controle em todas as concentrações. Os controles mitogênicos de Concavalina A (CONA) e Fitohemaglutinina (PHITO) foram positivos, indicando que as células estavam em plenas condições de proliferação.

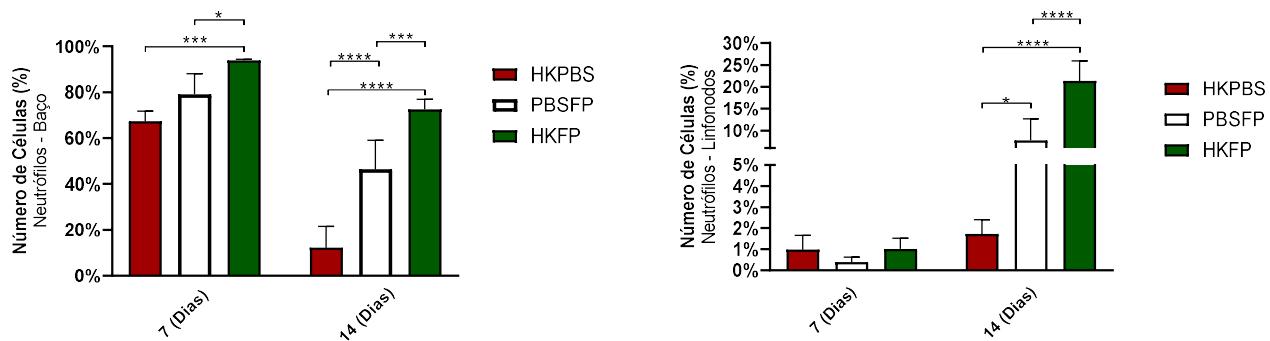
A avaliação desses dois resultados leva a uma hipótese de que a imunização prévia dos animais com o fungo inativado pelo calor pode levar a uma indução de proliferação de células TCD4⁺.

4.3. *F. pedrosoi* inativado pelo calor induz o recrutamento de neutrófilos em camundongos (resposta celular dos animais induzida por *F. pedrosoi* heat killed).

Para avaliar a resposta imune mediada por células induzidas por *F. pedrosoi* HK, camundongos Balb/c foram imunizados com conídios de *F. pedrosoi* inativados por calor antes da infecção. Camundongos de controle negativo foram imunizados e/ou infectados com PBS 1x estéril no mesmo protocolo.

A Figura 8 mostra o perfil celular obtido do baço e dos nódulos linfáticos de camundongos por citometria de fluxo. Nossos resultados indicam aumento de neutrófilos no baço dos grupos infectados por *F. pedrosoi* (HKFP e PBSFP) em todos os tempos de infecção, e nos linfonodos somente após 14 dias de infecção. Curiosamente, quando comparamos os dois camundongos infectados, o recrutamento de neutrófilos foi maior no grupo HKFP do que no grupo PBSFP, mostrando que a imunização com HK antes da infecção aumentou o recrutamento de neutrófilos.

Figura 8 – Perfil celular de citometria fluxo de neutrófilos obtidos do macerado de baço dos camundongos.



Além disso, os camundongos HKFP mostram uma diminuição significativa de células dendríticas (Figura 11) e células T de memória efetora (Figura 9) após 7 dias de infecção em comparação com todos os grupos, bem como macrófagos (Figura 10) e células T CD4 + (Figura 9) após 7 e 14 dias de infecção.

Figura 9 – Perfil celular de citometria fluxo de linfócitos TCD4⁺ obtidos do macerado de baço dos camundongos.

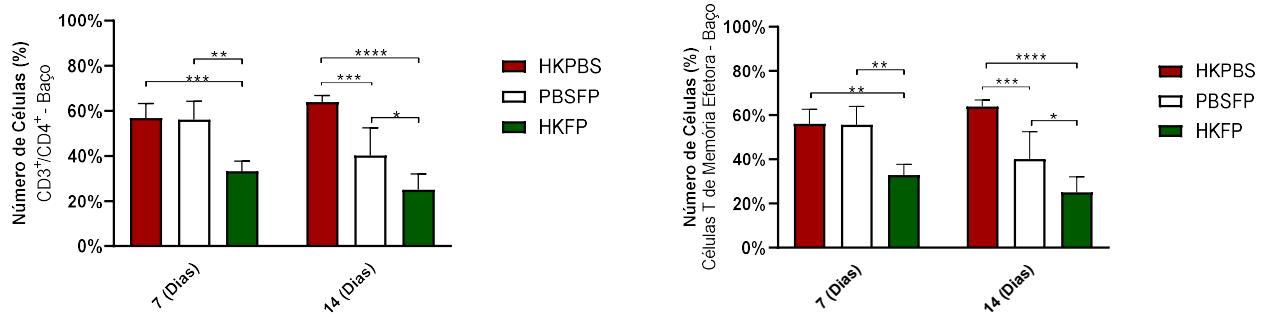
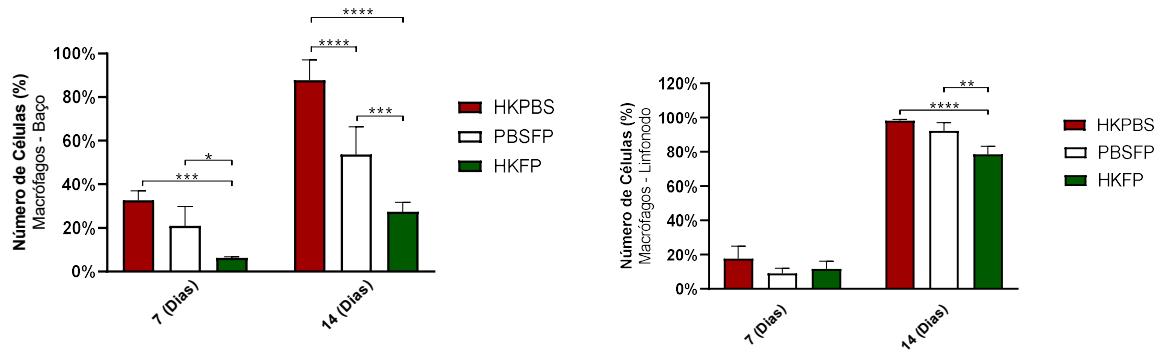


Figura 10 – Perfil celular de citometria fluxo de macrófagos obtidos do macerado de baço dos camundongos.



A quantidade de células B dos nódulos linfáticos foi significativamente maior em camundongos HKFP e PBSFP do que no grupo HKBPS após 7 dias de infecção (Figura 12). Após 14 dias de infecção, os camundongos HKBPS mostram uma diminuição dessas células.

Figura 11 – Perfil celular de citometria fluxo de células dendríticas obtidas do macerado de baço dos camundongos.

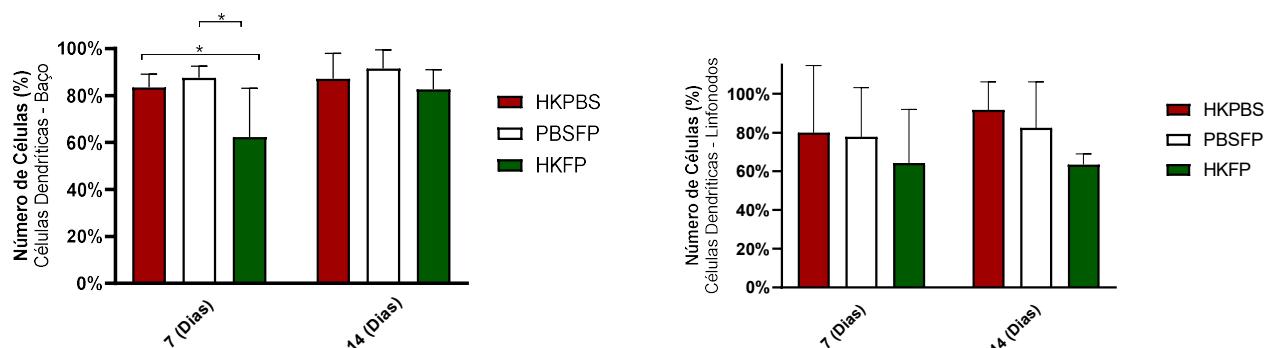
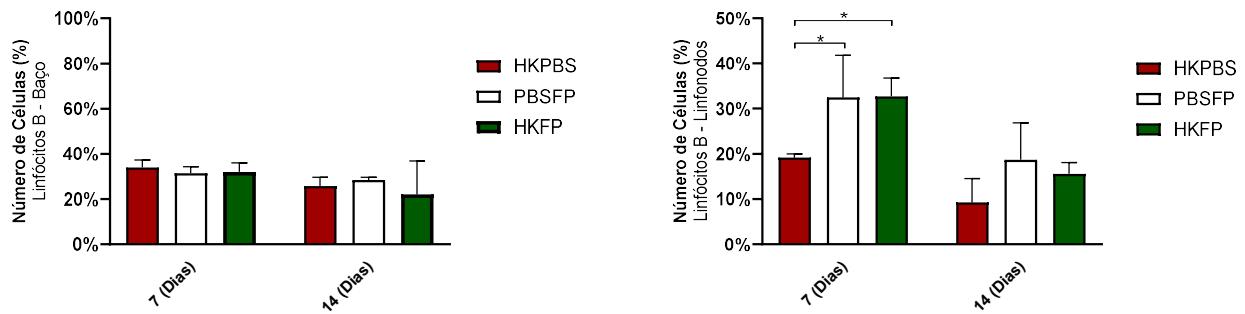


Figura 12 – Perfil celular de citometria fluxo de linfócitos B obtidos do macerado de baço dos camundongos.

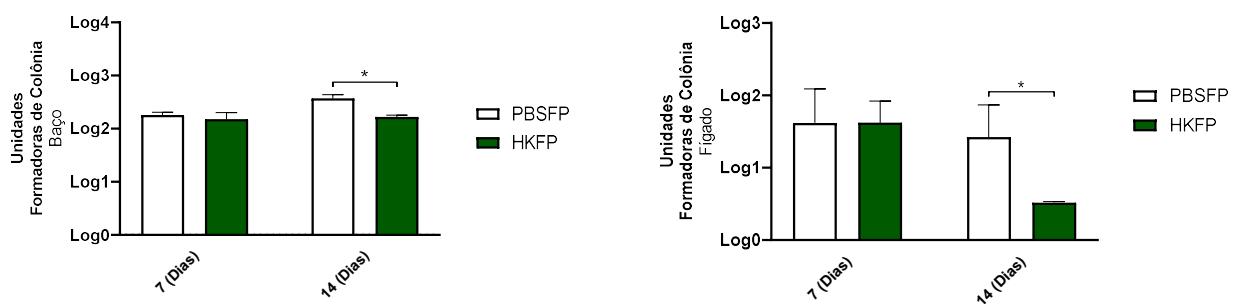


4.4. Avaliação da presença de unidades formadoras de colônia (UFC) em camundongos imunizados.

Para avaliar a colonização de *F. pedrosoi* nos tecidos após imunização com HK, foram coletados baço e fígado de camundongos infectados intraperitonealmente com conídios de *F. pedrosoi*. As UFCs foram contadas e os resultados foram mostrados na Figura 13.

A contagem de UFC foi significativamente menor no baço de camundongos imunizados com HK aos 14 dias de infecção do que em camundongos imunizados com PBS; o mesmo comportamento foi observado relação ao fígado. Curiosamente, após 14 dias de infecção, a carga fúngica nesses animais foi reduzida demonstrando que os camundongos imunizados foram capazes de induzir uma depuração fúngica mais rápida em comparação com os animais não imunizados. Levando a conclusão que a administração de conídios HK antes da infecção ajudou o organismo a montar uma resposta contra o patógeno.

Figura 13 – Contagem de Unidades Formadoras de Colônia no baço e fígado dos camundongos.



5. Discussão

A cromoblastomicose tem sido considerada um desafio terapêutico. Embora métodos e antimicrobianos sejam utilizados na tentativa de cura ou controle da doença, muitos casos de recidivas e poucos relatos de cura definitiva têm sido relatados, principalmente em casos graves e crônicos. Portanto, diversos grupos têm estudado tratamentos alternativos com o objetivo de melhorar o sistema imunológico do hospedeiro contra o patógeno.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune inata e adaptativa de camundongos imunizados com conídios de *F. pedrosoi* inativados por calor (HK) antes da infecção. Além disso, avaliamos se os conídios inativados de *F. pedrosoi* poderiam proteger os animais da cromoblastomicose experimental. Foi demonstrado que a levedura morta pelo calor é capaz de proteger os animais contra infecções fúngicas, como aspergilose sistêmica, coccidiomicose, candidíase e criptococose (Liu et al., 2011; Martinez et al., 2017), porém as vias para este objetivo não são completamente conhecidas.

Os neutrófilos compõem a primeira linha de defesa do sistema imunológico contra patógenos e podem realizar muitas estratégias para essa luta: armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), enxame de neutrófilos e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gazendam et al., 2016). Nossos resultados mostraram uma alta resposta imunológica mediada por neutrófilos quando os animais foram imunizados com HK antes da infecção. De acordo com Rozental et al. (1994), essas células são eficientemente capazes de matar patógenos como *F. pedrosoi* independentemente dos anticorpos. Eles também observaram que macrófagos ativados têm efeito fungostático sobre *F. pedrosoi*, uma vez que o fungo é capaz de manter sua integridade e viabilidade além de proliferar no interior dessas células.

Não observamos diferença significativa de linfócitos B no tecido do baço entre os grupos experimentais. No entanto, a porcentagem de linfócitos T foi menor no grupo imunizado com HK antes da infecção. Sabe-se que os linfócitos T CD4⁺ (especialmente o subconjunto Th1) desempenham um papel importante no controle da CBM pela liberação de IFNy e modulação da resposta celular contra os fungos (Gimenes et al., 2005). A ausência de linfócitos T CD8⁺ em camundongos não

interferiu na gravidade da doença (Sousa et al, 2006). Camundongos deficientes para CD4 e CD8 foram infectados intraperitonealmente com *F. pedrosoi*, e os autores observaram uma carga fúngica maior no baço e tecido do fígado de camundongos deficientes em CD4 do que em camundongos deficientes em CD8 (Sousa et al, 2006).

O sistema imunológico é capaz de adquirir memória imunológica quando o hospedeiro é exposto a um antígeno específico. Então, ele é capaz de montar uma resposta específica para atacar o patógeno, além de desenvolver uma espécie de memória para uma segunda invasão. De forma semelhante, esperava-se que a resposta dos imunizados com HK durante a infecção fosse mais rápida e eficaz, o que justifica o baixo percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ para eliminação do fungo.

Estudos sobre memória imunológica têm observado que o sistema imune inato tem uma característica interessante de reconhecer o patógeno em uma segunda exposição, o que não acontece em um monômero antígeno-específico. Após o reconhecimento, as células podem desenvolver uma resposta eficaz, forte e rápida para matá-las. Esse mecanismo imunológico é chamado de memória imunológica inata ou imunidade treinada (Quinn, 2019). O pré-tratamento intraperitoneal de animais com β -glucanas mostrou um efeito benéfico não específico na peritonite experimental e bacteremia induzida por *Escherichia coli*, que envolve macrófagos e neutrófilos (Elufisan et al, 2011; Williams et al., 1988).

Aqui, demonstramos um recrutamento de neutrófilos associado a uma resposta mais rápida e eficaz contra *F. pedrosoi*. Podemos sugerir que antígenos presentes tanto na imunização quanto no inóculo de infecção, como o β -glucanas, poderiam estimular a imunidade inata e adaptativa melhorando a proteção do hospedeiro. Além disso, o alto nível de IL-17 observado em animais imunizados com HK poderia potencializar o microambiente durante a infecção, induzindo a ativação e migração de neutrófilos. Trentini et al. (2016) mostrou a importância de neutrófilos em induzir uma resposta específica do tipo Th1 e Th17 após vacinação subcutânea com vacina viva de *Micobacterium tuberculosis*. Os autores destacam, ainda, que a presença de IL-17 é fundamental para induzir essa resposta Th1, resultando em maior proteção contra o patógeno.

IL-17 é uma citocina crucial envolvida na migração de neutrófilos, e a depleção de IL-17 pode prejudicar a quimiotaxia dos neutrófilos para o local da

infecção, levando a um aumento na carga fúngica. Recentemente, animais tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-17A apresentaram maior carga fúngica durante os estágios iniciais do CBM experimental (Siqueira et al, 2020). Experimentos *in vitro* mostraram que *F. pedrosoi* pode promover a diferenciação de células CD4⁺ Th17 (Dong et al, 2014; Wüthrich et al, 2015), e alta expressão de IL-17 foi observada em biópsias de pele obtidas de pacientes CBM (Silva et al, 2014). Embora o papel da IL-17 no controle da CBM tenha sido relatado, mais estudos são essenciais para confirmar sua importância durante a infecção.

Em relação ao fungo recuperado do sobrenadante do baço e do fígado, o grupo controle que não recebeu conídios inativados pelo calor teve maior carga fúngica do que o grupo que recebeu este imunizante em todos os tempos de infecção. Além disso, após 14 dias de infecção, os animais HKFP foram capazes de eliminar quase todos os fungos. Portanto, a imunização prévia à infecção teve importante papel no controle da infecção por *F. pedrosoi*.

Sousa et al. (2011) demonstraram que a cronicidade da CBM se desenvolve devido ao reconhecimento inato deficiente. Além disso, a administração exógena de ligantes de TLR pode eliminar a infecção por *F. pedrosoi* *in vivo*, enfatizando a importância de melhorar o reconhecimento do patógeno pelo sistema imunológico.

Aqui, mostramos que os animais virgens, que não receberam nenhum antígeno, não conseguiram montar respostas protetoras e rápidas aos conídios vivos de *F. pedrosoi*, tendendo a uma doença crônica, frequentemente descrita em relatos clínicos de CBM (Queiroz-Telles et al., 2017). No entanto, o contato prévio com o antígeno (conídios HK) proporcionou uma melhora na resposta imune de camundongos após o desafio com *F. pedrosoi* vivo, levando à eliminação do fungo.

6. Conclusão

Acerca de discussão sobre a importância do desenvolvimento de estudos como esse, podemos enfatizar a necessidade de recorrer abordagens preventivas como a imunização através de vacinas. Uma vez que se tratando de uma doença com características crônicas; com altos índices de recidivas e que muitas vezes causa

incapacidade física do portador bem como trazer prejuízos estéticos, funcionais e psicológicos, onde a terapia convencional medicamentosa não é suficiente para encerrar o quadro patológico.

Nossos resultados destacam que avanços promissores podem ser alcançados por meio de estratégias baseadas na modulação do sistema imunológico ou na profilaxia da cromoblastomicose. Caso contrário, as estratégias baseadas em abordagens terapêuticas representam um desafio devido à cronicidade da doença.

Aqui, mostramos que a imunização prévia com *F. pedrosoi* inativado por calor induziu um alto recrutamento de neutrófilos para o baço, o que foi crucial para o controle da CBM experimental. No entanto, estudos que visem esclarecer os mecanismos envolvidos na infecção fúngica mediada por células são essenciais para subsidiar pesquisas futuras sobre o tratamento da CBM.

7. Referências Bibliográficas

- ABBAS, Abul K. Imunologia Básica: funções e distúrbios do sistema imunológico. 4. ed. San Francisco: Elsevier, 2013. 336 p.
- A. Cassone, Fungal vaccines: real progress from real challenges, *Lancet Infect. Dis.* 8 (2) (2008) 114–124.
- AL-DOORY, Y. Chromomycosis,. In: DI SALVO, A. (Ed.). Occupational mycoses. Philadelphia, PA.: Lea & Febiger, 1982. p.95-121.
- Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saúl A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses [Internet]*. 2001;44(1-2):1-7.
- Breda LCD, Menezes IG, Paulo LNM, de Almeida SR. Immune Sensing and Potential Immunotherapeutic Approaches to Control Chromoblastomycosis. *J Fungi (Basel)*. 2020 Dec 22;7(1):3. doi: 10.3390/jof7010003. PMID: 33375204; PMCID: PMC7822212.
- BRITO, A. C.; BITTENCOURT, M. J. S. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. *An Bras Dermatol*, v. 93, n. 4, p. 495-506, 2018 Jul-Aug 2018. ISSN 1806-4841. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30066754>>.
- C.S. Schmidt, et al., NDV-3, a recombinant alum-adjuvanted vaccine for *Candida* and *Staphylococcus aureus*, is safe and immunogenic in healthy adults, *Vaccine* 30 (52) (2012) 7594–7600.

- Dong B, Li D, Li R, Chen SC, Liu W, Liu W, Chen L, Chen Y, Zhang X, Tong Z, Xia Y, Xia P, Wang Y, Duan Y. A chitin-like component on sclerotic cells of Fonsecaea pedrosoi inhibits Dectin-1-mediated murine Th17 development by masking β -glucans. *PLoS One*. 2014 Dec 9;9(12):e114113. doi: 10.1371/journal.pone.0114113. Erratum in: *PLoS One*. 2015;10(3):e0119244. PMID: 25490199; PMCID: PMC4260783.
- ELUFISAN, T. O.; BUSAYO, O.; J. K., O. The protective effect of beta glucan against *Escherichia coli* infected mice via intraperitoneal administration. *Journal of Bacteriology Research*, 3, p. 4, 2011.
- GAZENDAM, R. P.; VAN DE GEER, A.; ROOS, D.; VAN DEN BERG, T. K. et al. How neutrophils kill fungi. *Immunol Rev*, 273, n. 1, p. 299-311, 09 2016.
- GIMENES, V. M. F.; DA GLÓRIA DE SOUZA, M.; FERREIRA, K. S.; MARQUES, S. G. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect*, 7, n. 4, p. 708-713, Apr 2005.
- LIU, M.; CLEMONS, K. V.; BIGOS, M.; MEDOVARSKA, I. et al. Immune responses induced by heat killed *Saccharomyces cerevisiae*: a vaccine against fungal infection. *Vaccine*, 29, n. 9, p. 1745-1753, Feb 2011.
- MACHADO, A. P.; SILVA, M. R.; 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*, 54, n. 3, p. 202-211, May 2011.
- MARTINEZ, M.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Heat-Killed Yeast as a Pan-Fungal Vaccine. *Methods Mol Biol*, 1625, p. 23-30, 2017.
- Moudgil DK, Westcott N, Famulski JK, Patel K, Macdonald D, Hang H, Chan GK. A novel role of farnesylation in targeting a mitotic checkpoint protein, human Spindly, to kinetochores. *J Cell Biol*. 2015 Mar 30;208(7):881-96. doi: 10.1083/jcb.201412085. PMID: 25825516; PMCID: PMC4384735.
- QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev*, v. 30, n. 1, p.233-276, 01 2017. ISSN 1098-6618.
- QUINTIN, J. Fungal mediated innate immune memory, what have we learned? *Semin Cell Dev Biol*, 89, p. 71-77, 05 2019.
- QUINTIN, J.; SAEED, S.; MARTENS, J. H. A.; GIAMARELOS-BOURBOULIS, E. J. et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe*, 12, n. 2, p. 223-232, Aug 2012.
- Roederer, M., 2001. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 45, 194–205.
- ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W. Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. *J Med Vet Mycol*, 34, n. 5, p. 323-330, 1996 Sep-Oct 1996.

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

SIQUEIRA, I. M.; WÜTHRICH, M.; LI, M.; WANG, H. et al. Early immune response against Fonsecaea pedrosoi requires Dectin-2-mediated Th17 activity, whereas Th1 response, aided by Treg cells, is crucial for fungal clearance in later stage of experimental chromoblastomycosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 14, n. 6, p. e0008386, Jun 2020.

SOUSA, M. A. G. T.; GHOSN, E. E.; ALMEIDA, S. R. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with Fonsecaea pedrosoi. *Scand J Immunol*, 64, n. 6, p. 595-600, Dec 2006.

SOUSA, M. A. G.; REID, D. M.; SCHWEIGHOFER, E.; TYBULEWICZ, V. et al. Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. *Cell Host Microbe*, 9, n. 5, p. 436-443, May 2011.

Trentini MM, de Oliveira FM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. The Role of Neutrophils in the Induction of Specific Th1 and Th17 during Vaccination against Tuberculosis. *Front Microbiol*. 2016 Jun 10;7:898. doi: 10.3389/fmicb.2016.00898. PMID: 27375607; PMCID: PMC4901074.

WILLIAMS, D. L.; SHERWOOD, E. R.; BROWDER, I. W.; MCNAMEE, R. B. et al. Effect of glucan on neutrophil dynamics and immune function in *Escherichia coli* peritonitis. *J Surg Res*, 44, n. 1, p. 54-61, Jan 1988.

Wüthrich M, Wang H, Li M, Lerksuthirat T, Hardison SE, Brown GD, Klein B. 2015. Fonsecaea pedrosoi-induced Th17-cell differentiation in mice is fostered by dectin-2 and suppressed by Mincle recognition. *Eur J Immunol* 45:2542–2552. <https://doi.org/10.1002/eji.201545591>.