

Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina – FM
Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Análise da expressão de genes envolvidos na interação inicial entre
macrófagos murinos e *Fonsecaea pedrosoi* ou suas frações**

Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Brasília-DF
Fevereiro-2011

Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina – FM
Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Análise da expressão de genes envolvidos na interação inicial entre
macrófagos murinos e *Fonsecaea pedrosoi* ou suas frações**

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

Orientadora: Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília-DF

2011

YANNA KARLA DE MEDEIROS NÓBREGA

Análise da expressão de genes envolvidos na interação inicial entre macrófagos murinos e *Fonsecaea pedrosoi* ou suas frações

Banca Examinadora:

Presidente: Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca (UnB);

Membro: Prof. Dr. André Corrêa Amaral, UFG;

Membro: Prof. Dr. Florêncio Figueiredo C. Neto, UnB;

Membro: Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira, UnB;

Membro: Profa. Dra. Alice Melo Ribeiro, UnB;

Suplente: Profa. Dra. Cynthia Maria Kiaw, UnB.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) e no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular (CEL), da Universidade de Brasília (UnB), financiado Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

Dedico este trabalho aos meus pais Nilson e Lúcia pelo carinho, apoio e dedicação na minha educação e formação pessoal.

Agradecimentos

A minha família que mesmo longe dos meus braços esteve presente na minha caminhada ao longo da minha vida. Em especial a minha tia Maria José de Medeiros, pelo exemplo profissional e pelo incentivo.

A minha irmã, Ylanna pelo companheirismo e admiração.

Aos meus amores Filipe e Francisco, que me fazem ser uma pessoa feliz e plena diariamente, e me fizeram compreender o sentido do amor.

A Professora Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca pela dedicação, companheirismo, ensinamento e amizade, ao longo de todo o caminho na pós-graduação.

A Professora Dra. Maria Sueli S. Felipe, pelo apoio e por acreditar no projeto e no nosso trabalho.

A todos os colegas de trabalho do Hospital das Forças Armadas (HFA), em especial os do setor Imunologia pela compreensão em todos os momentos. Obrigada Flavinha, Nestor, Isabela, Rodrigo Félix, Silvano, Lorenzoni, Melissa, Lana e Solange. E aos meus chefes Sabino, Fagundes e Espedito pela compreensão e incentivo sempre.

Aos meus amigos Viviane Furlan Lozano, Amabel Fernandes, Renata Leite Chaves, Aliene Coutinho, Lincoln Eduardo Freitas, Irapuan e Charlene Sobral que nunca me deixam desanimar.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) da UnB Isaque, Márcio, Ana Camila e Karina, e todos os alunos de PIBIC.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Adriane, Alex, Patrícia, Marilen, José Carlos, Marcos Teixeira, Larissa, Érika e Laura.

A Simoneide S. Silva, em especial pela valiosa contribuição e orientação ao longo de cada etapa de execução desse trabalho.

A professora Ildinete e seus alunos pela ajuda sempre solicita meu muito obrigada, Calliandra, Daniel e Marciano

Aos Professores do Laboratório de Pediatria Riccardo Pratesi e Lenora Gandolfi pelo exemplo de vida e dedicação ao trabalho, e pelo carinho e cuidado que sempre tiveram comigo.

Aos amigos e a todas as pessoas que me acompanharam e me guiaram ao longo dessa caminhada.

A Universidade de Brasília e ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular que possibilitaram a realização deste trabalho.

E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) que financiaram este trabalho.

Todas as pessoas que colaboraram na execução deste trabalho, obrigada.

Índice

Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	IX
Lista de Abreviaturas	X
Resumo	XVI
Abstract.	XVII
1. Introdução	01
1.1. Cromomicose e <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	01
1.2. Interação inicial entre o fungo e o hospedeiro	04
1.3. Resposta imune inata à Cromoblastomicose	07
1.4. Expressão diferencial de genes de patógeno envolvidos na interação com o hospedeiro	08
2. Objetivo	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1. Cultivo dos fungos	13
3.2. Obtenção das frações da parede celular do <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	13
3.2.1. Extração da Fração F1 de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	13
3.2.2. Extração da Fração F2 de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	14
3.2.3. Produção de conídios	14
3.3. Cultura de macrófagos	14
3.4. Interação de macrófagos com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	15
3.5. Análise da cinética de interação de conídios de <i>F. pedrosoi</i> com macrófagos J774A.1	16
3.6. Análise da expressão diferencial dos genes dos macrófagos	17
3.6.1. Delineamento Experimental	17
3.6.2. Definição dos genes analisados no estudo	18
3.7. Extração do RNA das células J774A.1	19
3.8. Análise do RNA total	20
3.9. Tratamento e quantificação do RNA das células J774A.1	20
3.10. Reação da síntese do cDNA	21
3.11. Reação de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo-Real (<i>Real Time</i> -PCR)	21
3.12. Análise estatística	22
4. Resultados	23
4.1. Cinética de ativação do macrófago J774A.1 com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	23
4.2. Validação de dados processados pela técnica de RT-PCR em tempo real	23
4.3. Análise por RT-PCR em tempo real dos genes dos macrófagos J774A.1 após interação com conídios e as frações F1 e F2 do <i>F. pedrosoi</i>	26
4.3.1. Genes relacionados com receptores de reconhecimento padrão	26
4.3.2. Genes relacionado com ativação celular	32
5. Discussão	37
6. Conclusão	48

7. Referências	49
8. Anexos	58
8.1. Anexo I – Tabelas com valores de <i>fold-change</i> dos experimentos realizados em RT-PCR em tempo Real	58
8.2. Anexo II - Produção Científica	61
8.2.1. Artigo completo publicado	61
8.2.2. Resumos em Congressos	62

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação da curva de amplificação do experimento de RT-PCR em tempo real representativo para os genes do macrófago após 1h de tratamento com conídios de *F.pedrosoi*, *Rps9* (constitutivo) e o *Nfkb*

Figura 2 – Picos de desnaturação dos genes *Rps9* e *Nfkb*. No eixo da ordenada está a derivada da intensidade da fluorescência e abscissa está representada a temperatura.

Figura 3 - Modulação da expressão do gene *Itga5* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais.

Figura 4 - Modulação da expressão do gene *Clec2* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais.

Figura 5 - Modulação da expressão do gene *CD14* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais. Os dados estão apresentados em *folds changes* de dois experimentos realizados independentemente, feitos em triplicata em cada um dos tempos analisados (30min, 1h, 3h, 6h e 24h).

Figura 6 - Modulação da expressão do gene *Tlr2* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais.

Figura 7 - Modulação da expressão do gene *Tlr4* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais.

Figura 8 - Modulação da expressão do gene *Myd88* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais.

Figura 9 - Modulação da expressão do gene *Nfkb* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais.

Figura 10 - Modulação da expressão do gene *Nkfr* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais.

Figura 11 - Modulação da expressão do gene *TNF- α* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais.

Figura 12 – Representação esquemática da cascata de sinalização induzido via receptores *Toll-like* (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006).

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Genes de macrófagos J774A.1 analisados após cinética de interação com as frações F1, fração F2 e conídios de *Fonsecaea pedrosoi*

Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos desenhados para a RT-PCR em tempo real

Tabela 3 – Níveis de expressão do gene *Itga5* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Tabela 4 - Níveis de expressão do gene *Clec2* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Tabela 5 - Níveis de expressão do gene *Cd14* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Tabela 6 - Níveis de expressão do gene *Tlr2* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Tabela 7 - Níveis de expressão do gene *Tlr4* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Tabela 8 – Níveis de expressão do gene *Myd88* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Tabela 9 - Níveis de expressão do gene *Nfκb* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Tabela 10 - Níveis de expressão do gene *Nkrf* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Tabela 11 - Níveis de expressão do gene *Tnf-α* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Lista de Abreviaturas

Ags - α -glicana sintase subunidade 1p

AP1 – proteína ativadora 1, um fator de transcrição

ATCC - *American Type Culture Collection*

BCL3 – proteína co-ativadora de NF- κ B

Bcl2 – gene que codifica proteínas envolvidas com apoptose

Bcl3 – gene que codifica a proteína co-ativadora de NF- κ B

Bcl6 – gene que codifica proteína BCL6, repressora

°C - Graus Celsius

CBM – cromoblastomicose

CCL3 – quimiocina CCL3

Ccl3 – gene que codifica a quimiocina CCL3

CCL4 – quimiocina CCL4

Ccl4 – gene que codifica a quimiocina CCL4

CCL8 – quimiocina CCL8

Ccl8 – gene que codifica a quimiocina CCL8

CCL18 – quimiocina 18

Ccl18 – gene que codifica a quimiocina CCL18

CCL20 – quimiocina CCL20

Ccl20 – gene que codifica a quimiocina CCL20

CD5 – receptor 5 *scavenger*

CD14 – co-receptor para os receptores TLR2 e TLR4

Cd14 – gene que codifica a molécula co-receptora CD14

cDNA - Sequência de DNA complementar

CLEC – Receptor de proteína do tipo lectina-C

Clec – gene que codifica o receptor de proteína do tipo lectina-C

cm³ – centímetro cúbico

CO₂ – Dióxido de carbono

CR3 – Receptor 3 do complemento

CT - *crossing threshold* ou ciclo limiar

CXCL1 – quimiocina CXCL1

Cxcl1 – gene que codifica a quimiocina CXCL1

CXCL10 – quimiocina CXCL10

Cxcl10 – gene que codifica a quimiocina CXCL10

CXCL19 – quimiocina CXCL19

Cxcl19 – gene que codifica a quimiocina CXCL19

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DNase - Desoxirribonuclease

dNTP - Desoxinucleotídeos 5'-trifosfato

D.O. – Densidade Óptica

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

Egr4 – gene que codifica proteína que inibe a sinalização celular via TGFβ e XBP1

FC - *fold-change*

x g - Força Gravitacional

g - grama

h - hora

Hif1α - gene que codifica proteína que inibe a sinalização celular via TGFβ e XBP1

H₃PO₄ - ácido ortofosfórico

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

IF – Índice de Fagocitose

IFN - interferon

IL-1- Interleucina-1

Il-1 – gene que codifica a citocina IL-1

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

Il-8 – gene que codifica a citocina IL-8

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 – Interleucina-12

ISG – genes estimulados por interferon

Itga5 – gene que codifica a cadeia α_5 da integrina

L – Litro

LPS – Lipopolissacarídeo

M - molaridade

mg- miligrama

mili-Q - água reagente tipo 1 livre de Rnase

min - minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

MyD88 – molécula adaptadora usada na via de sinalização dos receptores do tipo *Toll-like*

Myd-88 – gene que codifica a molécula adaptadora usada na via de sinalização dos receptores do tipo *Toll-like*

N - Normalidade

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

Nfatc1 - gene que codifica proteína que inibe a sinalização celular via TGF β e XBP1

NF- κ B – Fator de transcrição NF- κ B

Nfkb – gene que codifica do fator de transcrição NF- κ B

NF- κ R – repressor de transcrição, interage com elementos regulatórios que reprimem a transcrição de alguns genes que responde ao NF- κ B

Nfkr – gene que codifica o NF- κ R

nm - nanômetro

NO Sintase - Óxido Nítrico Sintase

NO - Óxido Nítrico

NO₂⁻ - Nitrito

NO₃⁻ - Nitrato

p – significância estatística

PAMP – Padrão Molecular Associado à Patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*)

pg - picograma

PBS – Tampão Fosfato

PCM – Paracoccidiodomicose

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

PRR – Receptor de Reconhecimento de Padrões (*Pattern recognition receptors*)

RNA - Ácido ribonucleico

RNase – Ribonuclease

RT – Transcrição Reversa

RT-PCR - Transcrição Reversa- Reação em cadeia da polimerase

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura)

SFB - Soro Fetal Bovino

Smad7 - gene que codifica proteína que inibe a sinalização celular via TGFβ e XBP1

STAT 1, 4 e 5A – proteínas envolvidas com transdução de sinal e ativação de transcrição

SYBR Green ou SyBrgreen – corante fluorescente que se liga a fita de DNA

TANK - proteína da via de sinalização NF-κB

TGF-β – citocina Fator de Crescimento Tumoral beta

Th1 - Células T auxiliares do tipo I

Th2 - Células T auxiliares do tipo I

Th17 – Células T auxiliares que produzem interleucina 17 (IL-17)

TLR – receptor *Toll-like*

Tlr – gene que codifica o receptor *Toll-like*

TLR2 – receptor *Toll-like 2*

Tlr2 – gene que codifica o receptor *Toll-like 2*

TLR 4 – receptor *Toll-like 4*

Tlr4 – gene que codifica o receptor *Toll-like 4*

TLR6 – receptor *Toll-like 6*

Tm - *melting temperature* ou temperatura de dissociação

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral alfa (α)

Tnf-α – gene que codifica a citocina Tnf-α

TRADD – proteína da via de sinalização NF-κB

TRAF1 e 6 - proteínas da via de sinalização NF-κB

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

v/v/v – volume/volume/volume

XBP1 – fator de transcrição que regula a expressão de genes importantes da resposta imune

α -1,3-glicana - Alfa 1,3-glicana

β -1,3-glicana - Beta 1,3-glicana

μg - microgramas

μL - microlitros

μmol - micromolar

% - Percentual

100x – aumento de 1000x no microscópio óptico, usando objetiva com 100 vezes de aumento

Resumo

A cromoblastomicose é uma micose crônica, supurativa e granulomatosa desenvolvida no tecido cutâneo e subcutâneo, causada por vários fungos dematiáceos sendo o *Fonsecaea pedrosoi*, o principal fungo isolado de pacientes acometidos por esta doença. A parede celular deste fungo é composta pelas frações F1 (β -1-3- glicana e quitina) e F2 (α -1-3-glicana e melanina), sendo importantes estruturas de reconhecimento pelo hospedeiro. Os eventos iniciais da ativação das células da resposta imune inata após a interação com o patógeno tem despertado grande interesse. Na resposta imune ao *F. pedrosoi* os macrófagos têm um papel fundamental no curso da infecção, pois estão envolvidas no desenvolvimento da resposta inflamatória granulomatosa e nos mecanismos microbicidas. Para que essas células produzam intermediários reativos microbicidas é necessário que sejam ativados, no curso da cromoblastomicose, *F. pedrosoi* é capaz de modular a ativação dos macrófagos, tornando-os apenas fungistático. Uma forma de avaliar o padrão de ativação dos macrófagos, após contato com o patógeno, é analisar a expressão de genes envolvidos no reconhecimento, adesão do fungo e na produção de citocinas. Considerando que o perfil da expressão gênica de macrófagos após a interação com *F. pedrosoi* até o momento não foi analisado, o objetivo deste trabalho foi definir o padrão de expressão dos genes (*Itga5*, *Clec2*, *Cd14*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Myd88*, *Nfkb*, *Nkrf* e *Tnf- α*) envolvidos nas etapas iniciais de interação (30min, 1h, 3h, 6h e 24h) com o fungo ou seus componentes de parede isolados. Quando analisamos a modulação da expressão de genes pela interação entre macrófagos e os conídios, os resultados demonstram que houve o aumento no número de transcritos do gene *Tlr4* e *Myd88* (em 30min) e *Cd14* e *Tlr2* (em 6h), embora os transcritos dos genes que participam da ativação da via de sinalização do NF- κ B (*Nfkb*, *Tnf- α* e *Nkrf*) não tenham sido detectados. Quando analisamos a interação entre macrófagos e a fração F1 de *F. pedrosoi*, vimos que houve aumento do número de transcritos nos genes *Cd14*, *Tlr2*, *Nfkb* e *Tnf- α* (em 6h) e repressão para o gene *Nkrf*, apontando para uma sinalização da via de NF- κ B, sendo possível sugerir que a interação entre o macrófago e essa fração pode modular a ativação dessa célula. Para a interação entre macrófagos e a fração F2, o tempo mais expressivo também foi de 6h, quando houve aumento no número de transcritos dos genes *Clec-2*, *Nfkb* e *Tnf- α* , com repressão do gene *Nkrf*, sugerindo que essa fração parece modular a resposta do macrófago ao fungo, através do indução de transcritos do gene *Clec-2* inicialmente. Os resultados sugerem que os componentes de parede celular do fungo *F. pedrosoi* após interagirem com macrófagos são capazes de modular os genes destas células, aumentando a capacidade destas células de reconhecer os componentes da parede celular do fungo, com subseqüentes mudanças funcionais, que a tornam incapaz de eliminar esse fungo.

Palavras-chaves: Cromoblastomicose, *Fonsecaea pedrosoi*, macrófagos, expressão gênica, fração F1 e F2 de parede celular de *F. pedrosoi*.

Abstract

The chromoblastomycosis is a chronic, suppurative and granulomatous mycosis that affects the skin and subcutaneous tissue and is caused by various different dematiaceous fungi. *Fonsecaea pedrosoi* is the main fungus isolated from patients suffering from this disorder. The cell wall of this fungus is composed by two fractions – the F1 fraction (β -1-3-glucan and chitin) and the F2 fraction (α -1-3-glucan and melanin). These structures are important in the recognition of the fungus by the host immune system. Macrophages play a key role in the initial events of the innate immune reaction to this pathogen since they are involved in the development of a granulomatous inflammatory response and bactericidal activity. The macrophage microbicidal activity depends on reactive intermediates that need to be activated during the course of chromoblastomycosis. However, *F. Pedrosoi* is capable to modulate the activation of the macrophages reducing their activity only to fungistatic. The analysis of the expression of the genes involved in the recognition and adhesion of the fungus and the production of cytokines is a way to assess the pattern of activation of macrophages after their contact with the pathogen. The gene expression profile of the macrophages after their interaction with *F. pedrosoi* has not been analyzed so far. Consequently the aim of the present study was to define the expression pattern of the genes (*Itga5*, *Clec2*, *Cd14*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Myd88*, *Nfkb*, *Nkrf* and *Tnf- α*) involved in the initial stages of interaction of the macrophage with the fungus or the distinct components of its wall (at 30min, 1h, 3h, 6h and 24h). The analysis of the modulation genes expression caused by the interaction between macrophages and conidia disclosed an increase in the number of transcripts *Tlr4* and *Myd88* (at 30min) and of *Cd14* and *Tlr2* (at 6h), although transcripts of genes participating in the activation of the signaling pathway of NF- κ B (*Nfkb*, *Tnf- α* and *Nkrf*) could not be detected. In addition, the analysis of the interaction between macrophages and the fraction F1 of *F. pedrosoi* showed an increased in transcripts of the genes *Cd14*, *Tlr2*, *Nfkb* and *Tnf- α* (at 6h) and inhibition of the gene *Nkrf*, pointing to a signaling pathway of NF- κ B, which suggests that the interaction between this fraction and the macrophage can modulate the activation of this cell. The analysis of the interaction between macrophages and the fraction F1 of *F. pedrosoi*, disclosed an increased numbers of transcribed genes *Cd14*, *Tlr2*, *Nfkb* and *Tnf- α* (at 6h) and repression of the gene *Nkrf*, pointing to a signaling pathway of NF- κ B, which might suggest that the interaction between this fraction and the macrophage can modulate the activation of this cell. In considering the interaction between macrophages and the fraction F2 the time with more expression was also at 6 hours when an increase in the number of transcripts of the genes *Clec-2*, *Nfkb* and *Tnf- α* was detected, with simultaneous repression of the *Nkrf* gene, which suggests that this fraction apparently initially modulate the macrophage response to the fungus through the induction of the gene transcript *Clec-2*. These results suggest that components of the fungal cell wall of *F. pedrosoi*, after interacting with macrophages are able to modulate the genes of these cells, increasing their capacity to recognize the components of the fungal cell wall, with subsequent functional changes, which result in their inability to eliminate the fungus.

Keywords: chromoblastomycosis, *Fonsecaea pedrosoi*, macrophages, gene express, F1 and F2 fraction of the cell wall of *F. pedrosoi*.

1.Introdução

1.1. Cromoblastomicose e *Fonsecaea pedrosoi*

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose crônica, supurativa e granulomatosa desenvolvida no tecido cutâneo e subcutâneo, causada por vários fungos dematiáceos sendo o *Fonsecaea pedrosoi*, seu principal agente etiológico (GIMENES *et al*, 2006, MARQUES *et al*, 2006).

O fungo polimórfico *F. pedrosoi* apresenta mais de duas formas de desenvolvimento, como os conídios, hifas ou micélios, que são considerados as formas saprofitas, e os corpos escleróticos ou células muriformes (também chamados corpos Medlar) isolados ou ligados às hifas, que são considerados a forma patogênica (ALVIANO *et al*, 1992, SILVA *et al*, 2002). Este fungo vive na natureza como saprófita, sendo encontrado no solo, nos vegetais (*Mimosa pudica* e no coco Babaçu) e em troncos de madeira apodrecidos (LACAZ *et al*, 2002, NIMRICHTER *et al*, 2004, SALGADO *et al*, 2004, MARQUES *et al*, 2006, MAHREEN, 2010).

Em cultura, este fungo *F. pedrosoi* cresce lentamente e produz colônias com texturas aveludadas a cotonosas, de coloração escura a 25°C. A forma filamentosa é obtida quando o cultivo é mantido à temperaturas que variam de 25 a 37°C, com estruturas microscópicas características como as hifas pretas e septadas, os conidióforos altamente ramificados no ápice e liberação de conídios (SANTOS *et al*, 2007).

Além do fungo *F. pedrosoi*, outras espécies de fungos foram isoladas das lesões de pacientes diagnosticados com cromomicose, sendo que todos são membros da família *Dematiaceae* como *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora carrionni*, *Fonsecaea compacta* e *Rinocladiella aquaspersa* (GIMENES *et al*, 2005). Dentre estes, *F. pedrosoi* é o fungo mais isolado das lesões dos pacientes nas regiões de florestas tropicais como a Amazônia, e todas as regiões temperadas da América Latina, enquanto o fungo *Cladophialophora carrionni* é o mais encontrado em países secos ou de clima desértico como a Austrália, África do Sul e Cuba (SANCHE, SUTTON E RINALDI, 2003, LUPI, TYRING E MCGINNIS, 2005).

No Brasil foram diagnosticados 71 casos no estado do Paraná entre 1985 e 1996, (QUEIROZ FILHO, 1997), 100 casos no estado do Rio Grande do Sul entre 1963 e 1998 (MINOTTO *et al*, 2000) e 325 casos na região Amazônica entre 1942 e 1997, que foi considerada uma área endêmica (SILVA *et al*, 1999), além dos estados do Rio

Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (MATTE *et al*, 1997). Além dos casos relatados no Brasil, outros casos de cromomicose têm sido relatados no México, Estados Unidos, Sri Lanka e Japão (NIMRICHTER *et al*, 2004).

A cromomicose foi descrita pela primeira vez por Alexandre Pedroso no Brasil em 1911, mas os primeiros casos desta micose só foram descritos em 1914 por Max Rudolph (FUCHS E PECHER, 1992). Rudolph isolou e cultivou o fungo além de estabelecer o modelo experimental desta doença. Em 1915, Lane e Medlar descreveram os aspectos histopatológicos da CBM (BRIGOO E DESTOMBES, 1922).

A infecção inicia-se a partir de um trauma com a implantação no tecido subcutâneo de conídios e fragmentos de hifas do fungo, causando a lesão inicial característica desta doença (CORBELLINI *et al*, 2006). No hospedeiro essas estruturas do fungo, que são as formas infectantes, aderem às células epiteliais e se diferenciam em corpos escleróticas, estabelecendo a doença (GIMENES *et al*, 2006). A inalação de esporos seguida pela disseminação hematogênica já foi descrita como uma possível via de disseminação da doença (HOWARD *et al*, 1991).

Durante a fase inicial da cromomicose pode ocorrer a eliminação transepitelial ou dermoepitelial espontânea do fungo, resultando em pontos negros na superfície da lesão (LIMONGI *et al*, 1997, SILVA *et al*, 2002), que possuem fungo capazes de sobreviver por longos períodos e recidivar a lesão (ROSEN E OVERHOLT, 1996).

Os padrões histológicos descritos na cromomicose variam de acordo com o local das lesões, podendo ser eritematosos ou verrucosos. As lesões eritematosas apresentam dermatite granulomatosa superficial e intensa, com granuloma supurativo. Ocorre na derme com infiltrado celular misto e difuso, composto de macrófagos, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, células epidermóides, células multinucleadas gigantes isoladas e de numerosos mastócitos. Nestas lesões são observados alguns microabcessos com uma grande quantidade de fungos, geralmente em divisão, e há intensa proliferação de vasos capilares e fibrose dérmica. Na epiderme observa-se hiperplasia pseudoepiteliomatosa, com presença de linfócitos T CD4⁺ distribuídos difusamente e algumas células expressando interleucina IL-10 na sua superfície (D'ÁVILA *et al*, 2002).

As lesões verrucosas apresentam aspecto histológico de dermatite granulomatosa superficial e granuloma tuberculóide bem formado, com a presença de células epitelióides, células de Langerhans e linfócitos. Na epiderme o infiltrado inflamatório é superficial, com formação de granuloma circundado pelos linfócitos T CD4⁺, com

expressão de interferon-gama (IFN- γ). Os mastócitos estão presentes em pequeno número, não são observados microabscessos e os fungos estão no interior das células gigantes e/ou livres na lesão. Na derme, há uma moderada proliferação de vasos capilares e fibrose densa (D'ÁVILA *et al*, 2002). Independentemente do tipo de lesão, após o estabelecimento da fase crônica da cromoblastomicose, ocorre extensa e progressiva fibrose da derme e o centro da lesão verrucosa é caracterizado por uma reação de fibrose envolvendo toda a espessura da derme, com um padrão similar a da escleroderma. A zona de fibrose contém essencialmente colágeno tipo I, laminina, elastina e fibronectina. Já a região de infiltrado inflamatório contém colágenos tipo III e IV, laminina e fibronectina (RICHARD-BLUM *et al*, 1998, D'ÁVILA *et al*, 2002, SOTTO *et al*, 2004).

O diagnóstico da doença é geralmente realizado tardiamente, o que dificulta a erradicação do fungo das lesões, que progridem lentamente por anos. Considerando o tempo de desenvolvimento das doenças, naqueles casos onde a evolução é lenta e longa, o tratamento não é eficiente para a eliminação do fungo, sendo então adotado para conter a progressão da doença e prevenção das complicações, como infecções bacterianas secundárias e desconforto estético dos pacientes (D'ÁVILA *et al*, 2002, MAHREEN, 2010).

Alguns esquemas terapêuticos têm sido descritos e adotados no tratamento dos pacientes. As drogas mais utilizadas são os triazólicos (DAFAVERI E GRAYBILL, 1990), a terbinafina (RICHARD-BLUM *et al*, 1998, ESTERRE *et al*, 2000), o itraconazol (QUEIROZ FILHO, 1997, OGAWA *et al*, 2003, GIMENES *et al*, 2006), a anfotericina-B e a 5-fluorocitosina (MATTE *et al*, 1997), isoladas ou associados entre si, como por exemplo, anfotericina-B e itraconazol (PANIZ-MANDOLFI *et al*, 2008). Apesar de alguns protocolos terapêuticos apresentarem sucesso em alguns casos isolados, não existe descrito até o momento nenhum tratamento efetivo (NIMRICHTER *et al*, 2004). Além destas drogas, os triazólicos de segunda geração como o posaconazol e o voriconazol, têm sido propostos para o tratamento dessa micose, mas considerando o tempo necessário de tratamento, os custos desta terapia são elevados (MAHREEN, 2010).

Outras estratégias terapêuticas tem demonstrado eficiência no tratamento da cromoblastomicose. Utilizando o modelo murino experimental de cromoblastomicose, recentemente o nosso grupo demonstrou que o tratamento intralesional associando itraconazol e anfotericina B, foi tão eficiente quanto o tratamento realizado com a

vacina de DNA contendo o gene da *Hsp65* do *Micobacterium leprae* (Siqueira, 2010 - dados não publicados). O tratamento foi mais efetivo quando o antifúngico anfotericina B foi associado a um imunomodulador do que a outro antifúngico, o que demonstra a importância da ativação da resposta imune nas micoses.

1.2. Interação inicial entre o fungo e o hospedeiro

O desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva na eliminação dos fungos depende das fases de reconhecimento e subsequente desenvolvimento da resposta inflamatória aos patógenos invasores (MEDZHITOV E JANEWAY, 2000 *apud* MOGENSEN, 2009). Na fase inicial da resposta imune aos fungos, os principais receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes na superfície das células do hospedeiro e que estão envolvidos nesta resposta são os receptores *toll-like* (TLR), principalmente os TLR2, TLR4 e TLR6 e os receptores do tipo lectina-C, como os receptores de dectina, receptores de manose e CLEC-2. Além deles, outros receptores como receptor 3 do complemento (CR3) e receptor *scavenger* (CD5) também participam deste reconhecimento na resposta imune inata contra fungos patogênicos importantes como a *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Criptococcus neoformans* e *Pneumocystis jirovecii* entre outros (ROEDER *et al*, 2004, DENNEHY E BROWN, 2007).

Nos últimos anos a interação entre os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na parede celular de fungos, e os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) tem sido bem investigados. Entre os PAMPs, foi demonstrado que o zimosan, presente na parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, é reconhecido principalmente pelo TLR2 na sua forma de homodímero ou na sua forma de heterodímero quando associado ao TLR6 (TLR2/TLR6) (MOGENSEN, 2009). Outros PAMPs importantes são as mananas que podem ser detectadas por TLR4, como as derivadas de *C. albicans* (TADA *et al*, 2002). Outros componente importante para o reconhecimento dos fungos são as fosfolipomananas de *C. albicans* (JOUAULT *et al*, 2003), e as β -glicanas presentes na parede celular de muitos fungos patogênicos (MOGENSEN, 2009), que podem ser reconhecidas por TLR2. As β -glicanas também podem ser reconhecidas pelo receptor CR3 do complemento ($\alpha_M\beta_2$: CD11b/CD18) presente na superfície dos polimorfonucleares (VETVICKA, THORNTON E ROSS, 1996, TSIKITIS *et al*, 2004, GOODRIDGE, WOLF E UNDERHILL, 2009). O

principal polissacarídeo da cápsula de *C. neoformans*, a glucuronoxilomanana, é reconhecida pelo TLR4 (SHOHAM *et al.*, 2001).

A importância dos receptores TLR 2 e TLR4 na paracoccidiodomicose (PCM) foi recentemente descrita (LOURES *et al.*, 2009, LOURES *et al.*, 2010). Foi demonstrado que a ausência dos receptores TLR2 e TLR4, não alterou o padrão de susceptibilidade desta doença, no entanto estes receptores estão associados a modulação de uma resposta inflamatória adequada ao controle do crescimento dos fungos. O balanço final entre crescimento do fungo e a ativação do sistema imune é decisivo para a evolução da doença, onde o estabelecimento de uma resposta imune intensa, com indução de um padrão de resposta do tipo Th17 e diminuição das células T regulatórias (Treg) é tão comprometedora ao hospedeiro quanto uma resposta inflamatória limitada controlada principalmente pelas células Treg. A ativação celular mediada pelos receptores TLR2, TLR4 e a molécula adaptadora MyD88, influenciam as taxas fagocitárias, a migração celular, a ativação e secreção de citocinas e quimiocinas e a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície das células apresentadora de antígeno. A deficiência da molécula adaptadora MyD88 torna a PCM mais severa, associada a uma resposta efetiva diminuída e menor sobrevivência do hospedeiro em modelo experimental (CALICH *et al.*, 2008).

Entre os receptores tipo-C não clássico, a Dectina-1 é o principal e foi originalmente descrito como um receptor específico de célula dendrítica. Esse receptor reconhece β -1-3-glicana, que está presente na parede celular de vários fungos estando associado ao reconhecimento de *Candida albicans* (TAYLOR *et al.*, 2007), *Pneumocystis carinii* (SAIJO *et al.*, 2007), *Coccidioides posodaii* (VIRIYAKOSOL *et al.*, 2005), *Aspergillus fumigatus* (GERSUK *et al.*, 2006), *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* (RAPPEYE E GOLDMAN, 2006). Sua expressão em macrófagos é regulada positivamente por IL-4 e IL-13 e negativamente por LPS, IL-10 e dexametasona. A diminuição da expressão deste receptor pode estar relacionada com o mecanismo de escape desenvolvido por alguns fungos (RAPPEYE, EISSENBERG E GOLDMAN *et al.*, 2007).

F. pedrosoi apresenta em sua parede celular PAMPs como os descritos anteriormente e que podem ser reconhecidos pelos mesmos receptores (PRR) estudados para outros fungos patogênicos. Os PAMPs presentes na parede celular de *F. pedrosoi* podem ser isolados através das frações de sua parede celular, onde a fração F1 é composta predominantemente de β -1-3-glicana e quitina, e a fração F2 é composta de

α -1-3-glicana e melanina (SZANISZLO *et al*, 1972, SILVA E FAZIOLI *et al*, 1985), sendo assim, *F. pedrosoi* pode ser reconhecido pelos receptores TLR e pelos receptores tipo-C não clássico.

Uma proteína importante para a interação entre as células da resposta imunológica inata e adaptativa e o patógeno são as integrinas. O aumento da expressão destas proteínas na superfície celular aumenta a quimiotaxia de neutrófilos durante a resposta inflamatória e são capazes de regular sua resposta efetora a PAMPs de parede celular de fungos como as β -glicanas, com ativação da produção de ânions superóxido em neutrófilos, sem que ocorra a fagocitose. O bloqueio das β -glicanas com β 1-integrina é capaz de suprimir a produção dos radicais de oxigênio (LAVIGNE *et al*, 2007). As integrinas presentes nas células do hospedeiro estão envolvidas na ligação de diversos isolados de *C. albicans* com as proteínas da matriz celular (KLOTZ, PENDRAK E HEIN, 2001) demonstrando que os componentes da parede celular de diversos fungos são capazes de se ligarem as integrinas.

Outro receptor importante para a interação hospedeiro-patógeno é o CLEC-2, que também é um receptor tipo-C não clássico, expresso principalmente em neutrófilos, com função de mediar a fagocitose de moléculas opsonizados por anticorpos e a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α através de uma via que, não ativa a explosão respiratória (KERRIGAN *et al*, 2009).

A α -glicana é outra importante molécula envolvida na interação patógeno-hospedeiro, considerando a sua disposição na parede celular dos fungos e a incapacidade dos fagócitos em destruírem esta glicana. San-Blas & San-Blas (1977) propuseram que a α -glicana atuaria como cápsula protetora contra os mecanismos de defesa do hospedeiro devido a falta de α -glicanase no conteúdo enzimático das células fagocitárias. A α -glicana da parede celular de conídios de *Pseudallescheria boydii* é capaz de reduzir o índice de fagocitose e a internalização de conídios pelos macrófagos, sem interferir na produção de citocinas por macrófagos através do reconhecimento por TLR2 e CD14 (BITTENCOURT *et al* 2006). A α -glicana também apresenta um papel importante na patogênese de outros fungos patogênicos como *A. fumigatus*, *H. capsulatum* e *C. neoformans*, onde a deleção do gene da enzima α -glicana sintase (Ags) de *A. fumigatus* altera a morfologia da hifa e reduz a conidiogênese (BEAUVAIS *et al*, 2005 *apud* REESE *et al* 2007), além de aumentar a virulência do fungo (MAUBON *et al*, 2005 *apud* REESE *et al* 2007). O *H. capsulatum* que apresenta uma diminuição da síntese de α -glicana tem sua capacidade de induzir a morte de macrófagos *in vitro* e de

colonizar pulmões murinos diminuída, estabelecendo que a α -glicana é um importante fator de virulência deste fungo (RAPPEYE et al, 2004 *apud* REESE et al 2007). Da mesma forma, a ausência da α -glicana está associada com a termotolerância e virulência do *C. neoformans* (REESE E DOERING, 2003 *apud* REESE et al 2007).

1.3. Resposta imune inata à cromoblastomicose

Para que os fagócitos sejam ativados e desempenhem suas funções microbicidas é necessário que ocorra a adesão e/ou internalização do patógeno. Estes mecanismos microbicidas desenvolvidos podem ser dependentes e/ou independentes de oxigênio e nitrogênio (ALTAMURA et al, 2001, SANTOS et al, 2007). Os macrófagos têm um papel dúbio na infecção pelo *F. pedrosoi*. Os macrófagos são células do sistema mononuclear fagocitário, vital para a defesa do hospedeiro, que depende do seu estado de ativação (STEEVELS E MEYAARD, 2011). Durante o processo de ativação, o macrófago sofre modificações morfológicas e adquire capacitação fisiológica e bioquímica. A competência que o macrófago adquire para desempenhar múltiplas funções é o reflexo de uma diversidade de sinais indutores e supressivos presentes no microambiente (PATIAL et al, 2010, STEEVELS E MEYAARD, 2011) que resulta na modulação de grande número de importantes proteínas funcionais que são secretadas ou se distribuem ao longo de sua membrana celular (PATIAL et al, 2010, 2010).

Essas células e seus produtos estão envolvidos no desenvolvimento da resposta inflamatória granulomatosa no curso desta micose. A importância da ativação dos macrófagos na eliminação do fungo foi demonstrada por Ahrens et al (1989), onde macrófagos residentes não apresentam atividade fungicida e fungistática *in vitro* quando incubados com leveduras do *F. pedrosoi*. Estes dados foram confirmados por Farbiarz et al (1992), que cultivando macrófagos residentes com conídios de *F. pedrosoi* observaram a baixa atividade citotóxica destas células sobre o fungo, que é independente da sua adesão na superfície dos macrófagos ou de serem fagocitados. Após a ativação, os macrófagos são fungistáticos, sendo capazes conter o crescimento do *F. pedrosoi*, sem desenvolver atividade fungicida (ROZENTAL et al, 1994).

F. pedrosoi é capaz de modular a ativação dos macrófagos, induzindo a produção de altas concentrações de peróxido de hidrogênio e baixas concentrações de óxido nítrico (NO) (BOCCA et al., 2006). Estes dados foram confirmados por Hayakawa et al (2006) que após compararem a interação entre os macrófagos e as

espécies *C. carrionii*, *F. pedrosoi*, *P. verrucosa* e *R. aquaspersa* observaram que apesar do *F. pedrosoi* ser o mais fagocitado também foi capaz de induzir uma baixa expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e da proteína de superfície CD80, além de uma baixa produção de NO. A modulação na ativação dos macrófagos é decorrente da interação entre os componentes de parede do fungo com os PRRs na superfície dos macrófagos. A fração F2 é capaz de induzir uma diminuição na produção de óxido nítrico (BOCCA *et al.*, 2006), aumentar a produção de IL-10 além de influenciar negativamente a fagocitose mediada pelos macrófagos *in vitro* (NÓBREGA *et al.*, 2010). A melanina do *F. pedrosoi* confere resistência ao fungo frente aos mecanismos microbicidas desenvolvidos pelos macrófagos, como o peróxido de hidrogênio e o NO, sendo um importante mecanismo de escape dos mecanismos oxidativos dos macrófagos (CUNHA *et al.*, 2010).

1.4. Expressão diferencial de genes de patógenos envolvidos na interação com o hospedeiro

Para que o fungo sobreviva no hospedeiro uma série de fatores adversos precisa ser superado por esse patógeno, como resistir ao aumento da temperatura (termotolerância), às influências hormonais e aos mecanismos efetores das células do sistema imunitário. Os fungos patogênicos em geral apresentam a capacidade de sobreviver a estas condições adversas e infectar o hospedeiro, devido aos fatores de virulência do fungo. Dentre os mais importantes fatores de virulência estão: o dimorfismo e/ou polimorfismo, os componentes presentes na parede celular, presença de cápsula no fungo, a produção de melanina e enzimas, e os mecanismos de evasão (KUROKAWA *et al.*, 1998).

O desequilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e o desenvolvimento dos fatores de virulência do fungo favorece a infecção, quando os mecanismos de infecção do fungo sobrepujam os mecanismos desenvolvidos pela resposta imunológica. Um fator importante para este desequilíbrio é a modulação da expressão gênica do hospedeiro pelo patógeno, modificando um repertório de genes envolvidos em todas as etapas do processo infeccioso (adesão, colonização e invasão).

O entendimento das bases moleculares da resposta do hospedeiro à infecção por patógenos tem sido considerado essencial para o conhecimento de mecanismos e vias pelas quais patógenos evadem-se do sistema imunitário, visando o desenvolvimento de

novas estratégias para prevenção, bem como a definição de alvos terapêuticos mais eficientes (YOWE *et al.*, 2001, JENNER E YOUNG, 2005). A interação patógeno-hospedeiro pode resultar em diversas alterações na célula hospedeira, incluindo alterações fenotípicas com os rearranjos do citoesqueleto e a ativação de vias de sinalização celular que levam a uma grande reprogramação do transcriptoma (JENNER E YOUNG, 2005). Apesar dos mecanismos pós-transcricionais serem importantes na regulação da resposta celular à infecção, essa regulação ocorre principalmente via modulação dos níveis de RNA, revelando sua grande importância na resposta do hospedeiro à infecção (STAUDT E BROWN, 2000).

A estratégia de avaliação da expressão gênica da interação patógeno-hospedeiro vem sendo cada vez mais utilizada no entendimento dessa relação para alguns modelos de fungos patogênicos. Neste sentido Jenner e Young (2005) analisaram e compararam os dados resultantes de 32 trabalhos originais publicados sobre mudanças do perfil transcricional do hospedeiro em resposta a diferentes patógenos. Dos 5041 genes analisados, um grupo de 511 genes mostrou ser co-regulado na sua transcrição. Esta assinatura de expressão foi denominada de resposta comum do hospedeiro, pois a indução da maioria desses genes ocorre em diferentes tipos celulares em resposta a interação com diversos patógenos. Estes genes envolvidos na resposta comum do hospedeiro foram descritos segundo 6 grupos funcionais como: I) genes mediadores de inflamação (*Tnf*, *Il-1*, *Il-6* e *Il-8*, quimiocinas como *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl20*, *Cxcl1* a 5, enzima cicloxigenase 2 entre outros), II) genes estimulados por interferon (ISGs) (*Ccl8*, *Cxcl9* a 11, genes de metaloproteínas, entre outros), III) genes que ativam a resposta imune (a família do fator de transcrição NFκB e seu co-receptor BCL3, componentes do fator de transcrição AP1, fatores que mediam o efeito de IFN como o STAT 1, 4 e 5A, fator de transcrição *Bcl6*-repressor, *Egr4*, *Hif1α*, *Nfatc1*, *Smad7*-inibe a sinalização via TGFβ e XBP1; IV) genes de proteínas adaptadoras de vias de sinalização celular (*MyD88*, *TRADD*, *TRAF1* e 6, entre outros), V) genes que limitam a resposta imune (genes que inibem a ação de NFκB e TANK que inibe o recrutamento de TRAFs para o receptor de TNF; genes de fatores tanto pró-apoptóticos como os anti-apoptóticos e membros da família *Bcl2*) e VI) outros genes da resposta comum ao hospedeiro (genes envolvidos na ativação de linfócitos, na apresentação de antígenos, na adesão celular, metaloproteinases e os genes não relacionados com a resposta). Apesar dos genes da resposta comum do hospedeiro serem induzidos em diferentes tipos celulares durante a infecção, alguns grupos gênicos são preferencialmente induzidos em tipo celular

específico. Essas diferenças provavelmente refletem os diferentes papéis celulares durante a resposta imune. Recentemente Silva *et al.*, 2007 avaliaram o perfil transcricional de macrófagos peritoneais murinos em resposta à infecção por *P. brasiliensis in vitro*, durante 6, 24 e 48 horas. Estes autores observaram que diversos genes pertencentes à resposta comum do hospedeiro tiveram seus níveis de transcritos alterados, principalmente aqueles relacionados a mecanismos inflamatórios, proteínas de membranas, fatores de transcrição e apoptose (SILVA *et al.*, 2007). Estes mesmos autores em estudo posteriores mostraram que assim como observado para *P. brasiliensis*, após interagir com os macrófagos o fungo *H. capsulatum* também modula a expressão de genes envolvidos no processo pró-inflamatório. Dessa forma, os dados observados indicam que tanto *P. brasiliensis* quanto *H. capsulatum* induzem uma intensa reorganização celular dos macrófagos no estágio inicial da infecção para responder a invasão pelo patógeno. A ligação tanto de *P. brasiliensis* quanto de *H. capsulatum* com moléculas da matriz extracelular do hospedeiro transduz sinais que irão culminar na ativação de fatores de transcrição responsáveis por ativar genes relacionados a produção de citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas e moléculas de adesão responsáveis por auxiliar na fagocitose do microrganismo e na ativação dos fagócitos (SILVA *et al.*, 2010, dados não publicados). O aumento da expressão de genes relacionados a uma resposta pró-inflamatória também tem sido detectado a partir de macrófagos infectados com *C. albicans*, *A. fumigatus* e *M. tuberculosis* (CORTEZ *et al.*, 2006).

O fungo *Cryptococcus neoformans* quando infecta o sistema nervoso central modula positivamente genes relacionados com a resposta ao estresse, sinalização celular, transporte celular, metabolismo de lipídios e carboidratos, sugerindo que estes genes estão envolvidos com as funções necessárias para a sobrevivência e proliferação do fungo no curso da infecção (STEEN *et al.*, 2003). De forma similar, *P. brasiliensis* é capaz de modular genes na célula hospedeira, como integrinas, *Clec*, *Cd14*, *Tnf* e *Tlr* (*Toll-like*), genes relacionados a apoptose, na tentativa de sobreviver no interior do macrófago (SILVA *et al.*, 2007) Estudos adicionais também analisando a expressão gênica de células de defesa do hospedeiro em interação com *C. albicans*, *A. fumigatus*, *M. tuberculosis* e *C. neoformans* demonstraram a modulação de genes citados acima, demonstrando a importância destes genes na indução da resposta inicial do hospedeiro ao patógeno (CORTEZ *et al.*, 2006, STEEN *et al.*, 2003, JENNER E YOUNG 2005).

Embora existam muitos estudos sobre a importância de diversas moléculas moduladas por diferentes fungos, o perfil de expressão gênica de macrófagos após a interação com *F. pedrosoi* até o momento não foi analisado. Portanto é importante avaliar este perfil para melhor compreender os mecanismos de interação deste patógeno e/ou seus componentes de parede isoladamente com os macrófagos, que são células de defesa importantes do organismo. Esta análise poderá desta forma auxiliar no melhor entendimento da patologia induzida por este fungo no estágio inicial da infecção.

2. Objetivo

Considerando os dados apresentados, o objetivo deste trabalho foi analisar capacidade do fungo *Fonsecaea pedrosoi* e/ou seus componentes de parede de induzir a expressão diferencial de determinados genes dos macrófagos envolvidos no reconhecimento, adesão do fungo e na produção de citocinas.

Metas:

- 1- Analisar a cinética de internalização de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*
- 2- Avaliar a produção de citocinas produzidas pelos macrófagos após a internalização de *Saccharomyces cerevisiae*
- 3- Analisar a expressão diferencial dos genes *Itga5*, *Clec2*, *Cd14*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Myd88*, *Nfkb*, *Nkrf* e *Tnf- α* dos macrófagos.

3. Materiais e métodos

3.1. Cultivo do Fungo

A forma filamentosa do fungo *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, cedida pela Profa. Dra. Maria Lúcia Scrofernek, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) foi cultivada em ágar Sabouraud Dextrose à 37°C por 14 dias. Posteriormente o fungo cultivado foi utilizado para obtenção das frações da parede celular e para a obtenção dos conídios.

3.2. Obtenção das frações da parede celular do *F. pedrosoi*

3.2.1. Extração da Fração F1 de *Fonsecaea pedrosoi*

Após o cultivo, as células do fungo foram inativadas com formaldeído a 5%, por um período de 24h e filtradas em papel de filtro, lavadas por 3 vezes com água destilada e secas a temperatura ambiente. A seguir o material foi macerado com nitrogênio líquido, ressuspensão em água destilada e centrifugado por 5 vezes a 2000 x g para retirada de resíduos celulares. A etapa seguinte foi a extração lipídica, feita com uma solução de clorofórmio e metanol (proporção 2:1). A extração foi realizada sob agitação magnética, à temperatura ambiente por 4 horas. O material foi então centrifugado a 2000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, filtrado em papel de filtro e seco em estufa a 37°C por 48h.

A parede celular bruta obtida da massa do fungo foi pesada e ressuspensa em NaOH 1N (para cada 10 mg da massa do fungo foi usado 1mL de NaOH 1N) à temperatura ambiente por 1h e centrifugada a 3000 x g a temperatura ambiente por 20 minutos. O sobrenadante obtido contém as frações F2 e F3 e foi reservado para obtenção da fração F2. O precipitado foi submetido ao mesmo tratamento com 75 mL de NaOH 1N por 4 vezes, originando um resíduo alcali-insolúvel, que foi lavado com água destilada até que o pH do precipitado fosse igual a 7,0. Após a neutralização, o resíduo foi lavado com uma solução de etanol, acetona e éter (na proporção v/v/v), e foi seco em estufa a 37°C, sendo então denominada de fração F1 (ALVIANO *et al*, 1991, SILVA E FAZIOLI *et al*, 1985).

A partir da fração F1 obtida, foi preparada uma solução cuja concentração foi de 300µg/mL em tampão fosfato (PBS). Essa fração é constituída de β-1-3-glicana e quitina (Sá-Nunes *et al*, 2004).

3.2.2. Extração da fração F2 de *Fonsecaea pedrosoi*

Para isolamento e purificação da fração F2, o sobrenadante reservado na extração da fração F1 foi acidificado com HCl 1M. O precipitado foi centrifugado a 3000 x g por 10 minutos a 4°C, e lavado três vezes com água destilada. O precipitado insolúvel foi ressuspenso em HCl 0,1M e centrifugado a 12000 x g, para retirada de resíduos celulares por várias vezes até que o sobrenadante formado ficasse incolor. O precipitado foi dialisado em água destilada, por 2 dias e com 5 trocas no total (ALVIANO *et al*, 1991).

Com 10mL da fração F2 obtida, foi preparada uma solução na diluição 1:10 em tampão fosfato (PBS). Essa fração é constituída de α-1-3-glicana e melanina.

3.2.3. Produção de conídios

O fungo *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 foi cultivado em ágar batata e glicose (50g de batata, 5g de glicose e 500mL de água destilada), mantido a 25°C sob rotação constante por 4 dias para a produção de conídios (forma infectante do fungo). Após esse período, o meio com o fungo foi filtrado em filtro Whatman #1 para separar os conídios, o filtrado foi contado em câmara de Neubauer e a concentração de conídios ajustada para uso na infecção da cultura de macrófagos (4 x 10⁶ conídios) (TEIXEIRA DE SOUZA, GHOSN E ALMEIDA, 2006).

3.3.Cultura de macrófagos

As células dos macrófagos peritoneais utilizadas foram da linhagem J774A.1, adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro, onde estão depositadas sob o nº CR109. O macrófago J774.1 é uma linhagem de macrófagos peritoneais de fêmeas de Balb/c com sarcoma adaptadas para cultura desde 1978, que apresenta receptores do complemento e de Imunoglobulinas, e que produz IL-1, Lisozimas e NO sintase (RJCB,UFRJ).

Os macrófagos armazenados em criotubos (500µL células/criotubo) foram congelados em nitrogênio líquido. Antes do uso, os criotubos contendo os macrófagos foram descongelados e transferidos para garrafa de cultura de células de 75mL contendo 10mL de RPMI 1640 simples com 20% de soro fetal bovino. As garrafas de cultura foram mantidas na posição horizontal, em estufa a 37°C com 5% de CO₂, por aproximadamente 72h, até a formação de monocamada de células que pode ser observado ao microscópio invertido.

Após esse período de incubação, parte dos macrófagos em culturas foram mantidos em estoque com a substituição do meio RPMI 1640 simples com 20% de soro fetal bovino por um com 10% de soro fetal bovino. E outra parte foi utilizada nos experimentos.

Depois da formação da monocamada de células, foi realizada a raspagem das células da garrafa de cultura, e as células foram transferidas para um tubo Falcon de 15mL, centrifugar a 300 x g por 8 min a 22°C e todo o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o sedimento celular foi ressuscitado em 4mL de meio RPMI 1640 simples com 10% de soro fetal bovino, e a contagem dos macrófagos foi realizada utilizando câmara de Neubauer, ajustando a concentração para cada etapa do experimento, conforme descrito nos tópicos a seguir..

Quando as garrafas de cultura foram utilizadas, cada garrafa de 25cm³ ou 60mL apresentava um volume final de 5mL da solução celular por garrafa (macrófagos e meio RPMI simples com 2% soro fetal bovino). Em seguida, os macrófagos foram incubados por 24h em estufa a 37° com 5% de CO₂ para controlar a taxa de crescimento celular. Após esse período as culturas estavam prontas para as condições experimentais descritas a seguir.

3.4. Interação de macrófagos com conídios de *F. pedrosoi*

Macrófagos J774A.1 na concentração de 1 x 10⁵ células foram cultivados por 24h em microplacas de 24 orifícios contendo lamínulas. Conídios de *F. pedrosoi* foram suspensos em 1mL de meio RPMI simples com 2% soro fetal bovino (SFB) e usados na concentração de 0,4 x 10⁶ conídios, seguindo a proporção macrófago-conídio de 1:5. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa a 37° com 5% de CO₂.

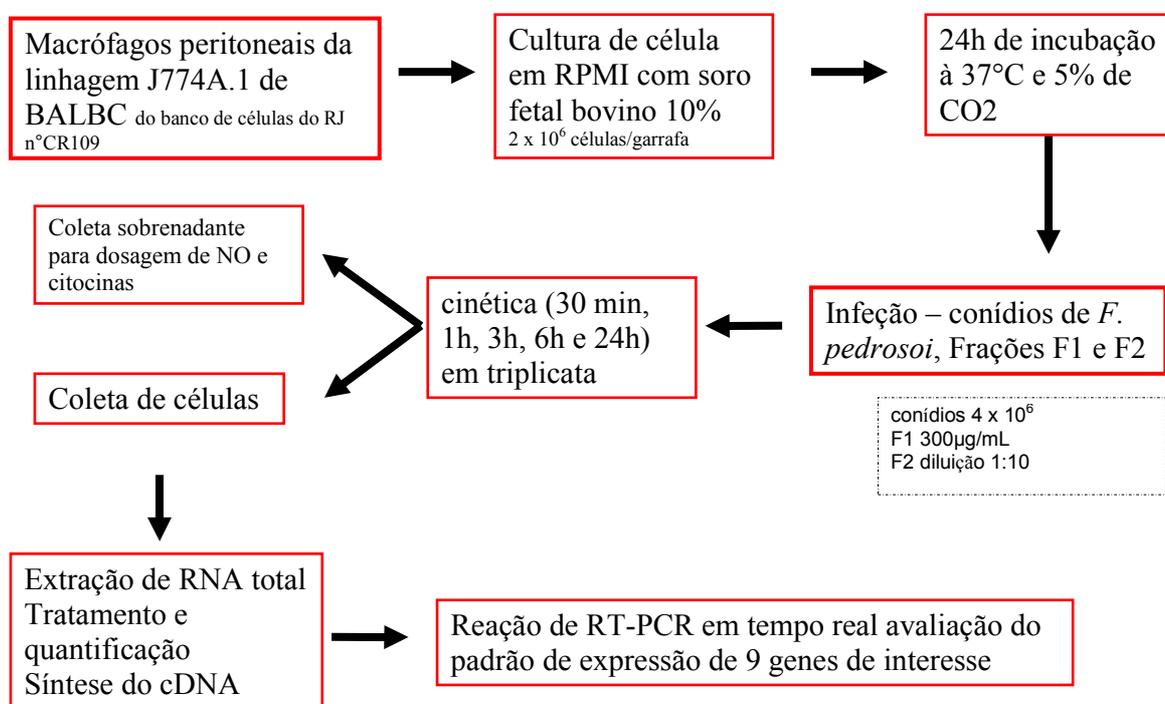
3.5. Análise da cinética de interação de conídios de *F. pedrosoi* com macrófagos J774A.1

Nesta análise inicialmente foi utilizado protocolo padronizado no laboratório para o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, que seguia os tempos de 6h, 12h e 24h após a infecção. Após cada um desses períodos, o sobrenadante foi desprezado e cada orifício da placa foi lavado com meio RPMI simples a 37°C para retirada de conídios não aderidos ou não fagocitados. Os macrófagos aderidos a lamínula foram fixados com metanol e corados com solução de Giemsa a 8%. Foram analisadas 100 células de cada preparação com objetiva de imersão (100x).

Após a análise das lamínulas observamos que o período da cinética precisava ser ajustado para intervalos de tempos menores, pois em 6 horas já é possível observar uma grande quantidade de conídios de *F. pedrosoi* internalizados, ao contrário do que se observa em *P. brasiliensis* no mesmo tempo. Para *P. brasiliensis* em 6 horas a maioria das leveduras se encontra apenas aderida aos macrófagos (TAVARES *et al* 2007). Desta forma a cinética de internalização de *F. pedrosoi* foi definida em 30min, 1h, 3h, 6h e 24h, que foram processados seguindo o mesmo protocolo. Foram realizados 3 experimentos independentes.

3.6. Análise da expressão diferencial dos genes dos macrófagos

3.6.1. Delineamento Experimental



Após as 24h de cultivo dos macrófagos, conforme descrito anteriormente (item 3.3), em estufa a 37°C com 5% de CO₂ em garrafa de 25cm³ ou 60mL contendo um volume final de 5mL de meio RPMI com 2% soro fetal bovino, a infecção foi realizada usando 500µL de cada estímulo (conídios, Fração F1 e F2), totalizando um volume final de 5,5mL por garrafa. As concentrações usadas foram: conídios 4 x 10⁶ ou 2:1, Fração F1 300µg/mL (SÁ-NUNES *et al*,2004), Fração F2 diluição 1:10 (NÓBREGA *et al*, 2010). Após cada tempo previsto na cinética (30min, 1h, 3h, 6h e 24h) o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e óxido nítrico (NO) (dados não mostrados). Em seguida as células foram lavadas com RPMI 1640 simples sem soro fetal bovino a 37°C para retirar os fungos não internalizados, e 2 mL de Trizol foi adicionado para lise com os macrófagos em cada garrafa, e o lisado foi transferido para um tubo Falcon de 15mL. A seguir o material foi centrifugado a 2200 x g por 8 min, o sobrenadante foi retirado para outro tubo Falcon de 15mL e os restos celulares foram descartados. O sobrenadante foi congelado a – 20°C para posteriormente seguir o protocolo para extração de RNA.

3.6.2. Definição dos genes analisados no estudo

Os genes chaves analisados no presente trabalho foram selecionados baseados em trabalhos prévios realizados por Silva *et al* (2007) e estão descritos na tabela 1. Todos os genes foram avaliados em todos os tempos definidos na cinética.

Tabela 1 - Genes de macrófagos J774A.1 analisados após cinética de interação com as frações F1, fração F2 e conídios de *Fonsecaea pedrosoi*

Categoria	Descrição	Gene
Proteína de membrana	Cadeia 5 da alfa integrina (adesão)	<i>Itga5</i>
Proteína de membrana	Receptor de proteínas do tipo lectina-C	<i>Clec2</i>
Proteína de membrana	Co-receptor CD14	<i>Cd14</i>
Proteína Intracelular	Molécula adaptadora para os receptores TLR2 e TLR4	<i>Myd88</i>
Proteína de membrana	Receptor de Reconhecimento de Padrão (RRP) do tipo <i>Toll-like 2</i>	<i>Tlr2</i>
Proteína de membrana	Receptor de Reconhecimento de Padrão (RRP) do tipo <i>Toll-like 4</i>	<i>Tlr4</i>
Regulação Transcricional	Subunidade P50 de NFkappaB	<i>Nfkb</i>
Regulação Transcricional	Fator de repressão do NFkappaB	<i>Nkrf</i>
Gene de citocina	Citocina inflamatória	<i>Tnf-α</i>

Na tabela 2, estão representados os oligonucleotídeos desenhados para a RT-PCR em tempo real. Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o programa *Primer Express* (Applied Biosystems) com base nas seqüências obtidas da base de dados do transcriptoma de camundongo (<http://www.informatics.jax.org>).

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos desenhados para a RT-PCR em tempo real

Genes	Oligos	
	Senso (5'-3')	Anti-senso (5'-3')
<i>Rps</i>	5' rps9 CGCCAGAAGCTGGGTTTGT 3'	5' rps9 CGAGACGCGACTTCTCGAA 3'
<i>Itga5</i>	5' itga5 CCGAGTGCCTGAAGTTTGATA 3'	5' itga5 GGGCTTTTCTTCAAAGGGATA 3'
<i>Cd14</i>	5' cd14 CGCAGCCTGGAATACCTTCTA 3'	5' cd14 CCGCTTTAAGGACAGAGACTT 3'
<i>Clec2</i>	5' clec2 CTCTTCTTGGTGGCGTGTGA 3'	5' clec2 AACAACCAGCCCCATGGA 3'
<i>Myd88</i>	5' myd88 ACTGGCCTGAGCAACTAGGA 3'	5' myd88 CGTGCCACTACCTGTAGCAA 3'
<i>Tlr2</i>	5' toll2 AAGAGGAAGCCCAAGAAAGC 3'	5' toll2 CGATGGAATCGATGATGTTG 3'
<i>Tlr4</i>	5' toll4 GAACAAAACCTCTGGGGCCTAA 3'	5' toll4 CATGGGCTCTCGGTCCATAG 3'
<i>Nfkb</i>	5' nfkb AGCCAGCTCCCGTGTGTTGTT 3'	5' nfkb AGGGTTTCGGTTCAGTTTCC 3'
<i>Nkrf</i>	5' nkr ACCTTTCAACCTACGATGGTCAGA 3'	5' nkr GAGCTCTCACATGGAATTTGGAA 3'
<i>Tnf-α</i>	5' tnf GTACCTTDTCTACTCCCAGGTTCTCT 3'	5' tnf AGGGTTTCGGTTCAGTTTCC 3'

3.7. Extração do RNA total das células J774A.1

O sobrenadante do macrófago lisado em 2mL de Trizol foi usado para a extração do RNA total dos macrófagos tratados e do controle (macrófago não tratado). Inicialmente essas amostras do lisado que estavam congeladas a – 20°C foram mantidas a temperatura ambiente por 5 min com a finalidade de permitir a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Em seguida 200µL de clorofórmio foi adicionado a 1mL do lisado, e após uma agitação vigorosa de 15s em cada ependorf e uma incubação por 3 min a temperatura ambiente (entre 15-30°C), as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g em uma temperatura de 4°C por 15min. Após a centrifugação a amostra é separada em três fases, a fase inferior fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma

fase aquosa superior onde o RNA permanece. Essa fase aquosa foi separada para outro ependorf novo e estéril.

A cada ependorf contendo a fase aquosa foi acrescentado 0,5 mL de álcool isopropílico e homogeneizado 5 vezes por inversão, a temperatura ambiente (15-30°C) por 10 min. Ao completar o tempo as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g em uma temperatura de 4°C por 10 min para recuperação do RNA. Na etapa seguinte, todo o sobrenadante é descartado e 1 mL de etanol 75% é acrescentado para lavagem do RNA, em seguida uma nova centrifugação a 7500 x g em temperatura de 4°C por 5min foi realizada. O RNA precipitado foi então seco a temperatura ambiente quando pode ser ressuscitado em 40µL de água reagente tipo 1 (*mili-Q*) livre de Rnase, e armazenado a - 20°C.

3.8. Análise do RNA total

A qualidade do RNA total extraído foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5µg/mL). A quantidade do RNA extraído foi determinada através do equipamento *GeneQuant* (*Biochrom, UK*), que utiliza a leitura espectrofotométrica nas densidade ótica (DO) 260 e 280nm, quando a razão dessas densidades óticas (A_{260}/A_{280}) foi superior a 1.4, o grau de pureza do RNA foi considerado adequado.

3.9. Tratamento e quantificação do RNA das células J774A.1

Depois de quantificado, o RNA foi tratado com DNase I na presença de um inibidor de RNase com o kit *Promega's PolyAtract mRNA isolation system* da marca Roche (Lote M198A, *USA*), com a finalidade de eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico, conforme protocolo do fabricante.

Novamente os RNAs, agora tratados foram quantificados no equipamento *GeneQuant* (*Biochrom, UK*), e o valor da relação A_{260}/A_{280} considerado foi acima de 1.4.

3.10. Reação da síntese do cDNA

Depois de tratado e quantificado o RNA total foi usado na síntese do cDNA usando o *kit TaqMan® Gene Expression Assays* da marca *Applied Biosystems* (Lote N808, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

Quantidades iguais de RNA (0,4µg) foram submetidas à transcrição reversa. O mix foi preparado utilizando: 2µL (10x RT Buffer), 0,8µL (25X dNTP Mix (100mM)), 2,0µL (10X RT Random Primer), 1.0 µL (Reverse Transcriptase), 1.0 µL (RNase Inhibitor), 3.2 µL (Nuclease-free H₂O), para um volume total de 10µL.

3.11. Reação de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo-Real (*Real Time-PCR*)

As análises das expressões gênicas por RT-PCR em tempo real utilizaram os sistema de detecção por SYBR Green, uma molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA. Os ensaios de amplificação foram realizados no *7500 Fast Real-Time PCR System* da marca *Applied biosystems (USA)*, em reações de 10µL, contendo 5µL de SyBrgreen, 0,4µl de cada oligonucleotídeo (10 µM), 2,0 µl do cDNA (diluído 1:10) como molde e água reagente tipo 1 (*mili-Q*) q.s.p. 10 µl, para completar o volume final.

Após a desnaturação inicial a 95°C por 10 min, as amplificações foram realizadas por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A utilização do SYBR Green demanda cuidadosa padronização, pois este fluoróforo se intercala a qualquer dupla fita de DNA presente na reação. Dessa maneira, a quantificação do produto de PCR específico pode ser afetada pela formação de dímeros de oligonucleotídeos ou pela formação de produtos de PCR inespecíficos. A fim de confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. Nesta 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 (T_m)* 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).

O método de comparação do ciclo limiar (CT) ou *crossing threshold* foi empregado para a análise da variação de expressão de cada gene analisado (LIVAK *et al.*, 2001). Como controle constitutivo interno para todas as condições experimentais e controle analisados, foi empregado para normalização na avaliação da variação de expressão (*fold-change* - FC), o gene da proteína ribossomal *Rps9*, de expressão constitutiva em macrófago. Desta forma, na avaliação da variação de expressão (FC) de cada gene de interesse para todas as condições experimentais (tratamento com fungo, ou com as frações F1 e F2 da parede celular do fungo), a variação da expressão do gene *rsp9* foi considerado na realização dos cálculos.

O CT é o número de ciclos no qual a quantidade de alvo amplificado atinge o limiar de fluorescência emitida ou *threshold* definido pelo pesquisador. O limiar deve estar obrigatoriamente na faixa onde a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras é significativamente maior que a fluorescência de base ou *background*.

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 $\Delta CT_{\text{experimento}} = CT_{\text{gene de interesse no experimento}} - CT_{\text{gene constitutivo no experimento}}$ e $\Delta CT_{\text{controle}} = CT_{\text{gene de interesse no controle}} - CT_{\text{gene constitutivo no controle}}$. A equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ é baseada na amplificação exponencial da PCR e sua derivação e validação foram anteriormente descritas (Boletim do usuário Applied Biosystems N°.2 P/N 4303859 e LIVAK *et al.*, 2001).

3.12. Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo método pós-teste (Bonferroni e *t-teste*). Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Cinética de ativação do macrófago J774A.1 com conídios de *F. pedrosoi*

A fim de avaliar a interação entre os conídios e os macrófagos J774A.1, uma cinética de internalização do fungo foi realizada. A internalização dos conídios de *F. pedrosoi* pelos macrófagos iniciou aos 30min e aumentou progressivamente ao longo do tempo, atingindo seu ápice nos tempos de 3 e 6h quando 85 a 90% dos conídios estavam internalizados. Como o estudo pretende avaliar as alterações produzidas sobre as atividades funcionais dessas células, a cinética foi considerada em todos os tempos.

Após definição da cinética de tempos os macrófagos J774A.1 foram cultivados e colocados em contato com conídios e frações de parede celular do fungo *F. pedrosoi*, e em seguida o padrão expressão de 9 genes (*Itga5*, *Clec2*, *Cd14*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Myd88*, *Nfkb*, *Nkrf* e *Tnf- α*) foram avaliados para melhor compreensão das alterações produzidas sobre as atividades funcionais dessas células utilizando a metodologia de RT-PCR em tempo real.

4.2. Validação de dados processados pela técnica de RT-PCR em tempo real

A figura 1 mostra as curvas de amplificação do experimento de RT-PCR em tempo real para os genes *Rps9* (constitutivo) e o *Nfkb* dos macrófagos após 1h de tratamento com conídios de *F. pedrosoi*. Os valores de CT obtidos pela análise das curvas de amplificação foram utilizados na avaliação da expressão do gene, para o cálculo do *fold-change*, de cada um dos genes de interesse através do método de comparação do CT, utilizando o gene constitutivo *Rps9* para normalização.

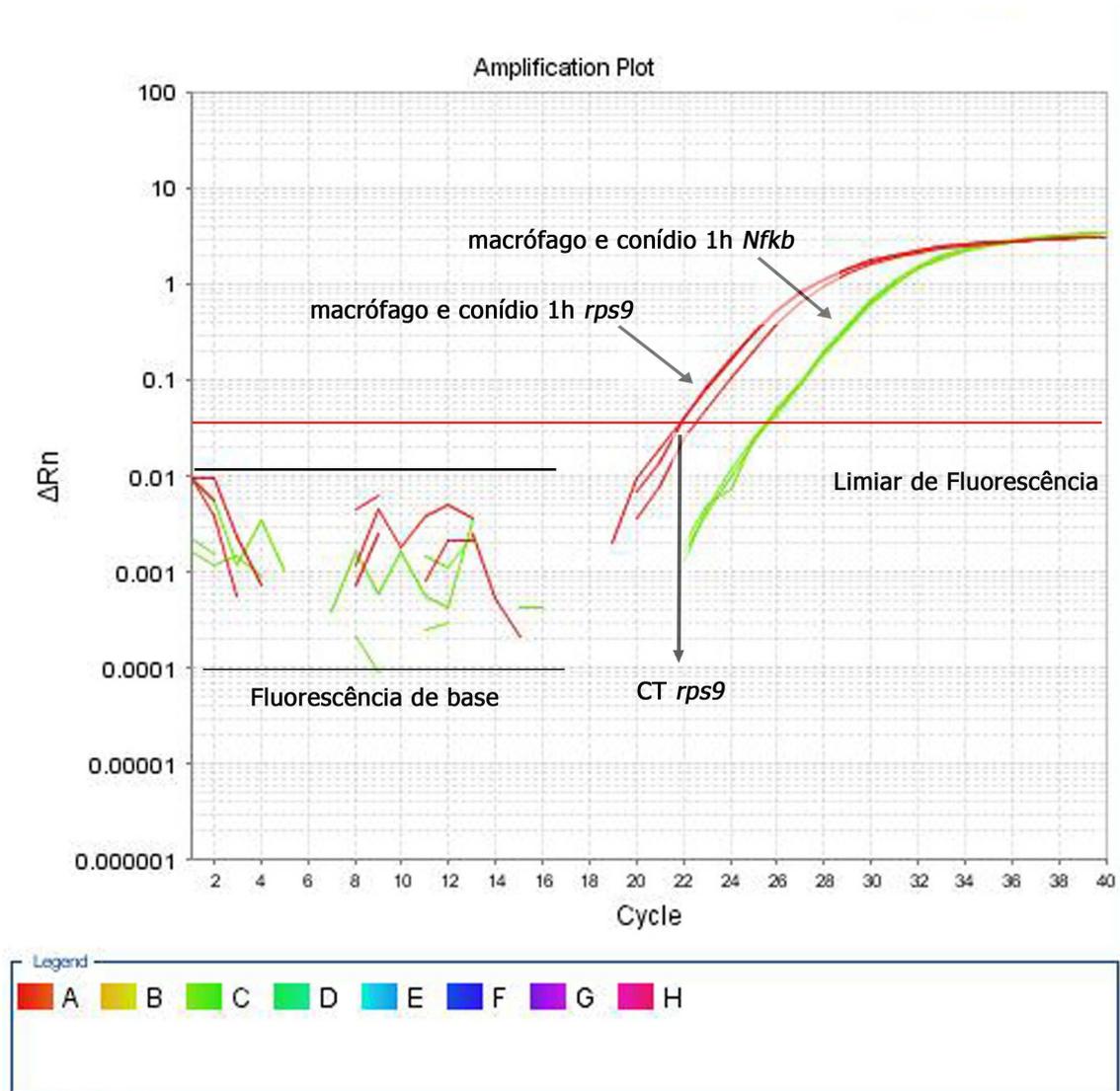


Figura 1 – Representação da curva de amplificação do experimento de RT-PCR em tempo real representativo para os genes do macrófago após 1h de tratamento com conídios de *F.pedrosoi*, *Rps9* (constitutivo) e o *Nfkb*

Na figura 2 foram observados os picos de desnaturação dos genes, que são gerados a partir da derivada da intensidade de fluorescência da curva de desnaturação, onde se observa um único pico de T_m (um para cada gene), demonstrando a presença de um único produto.

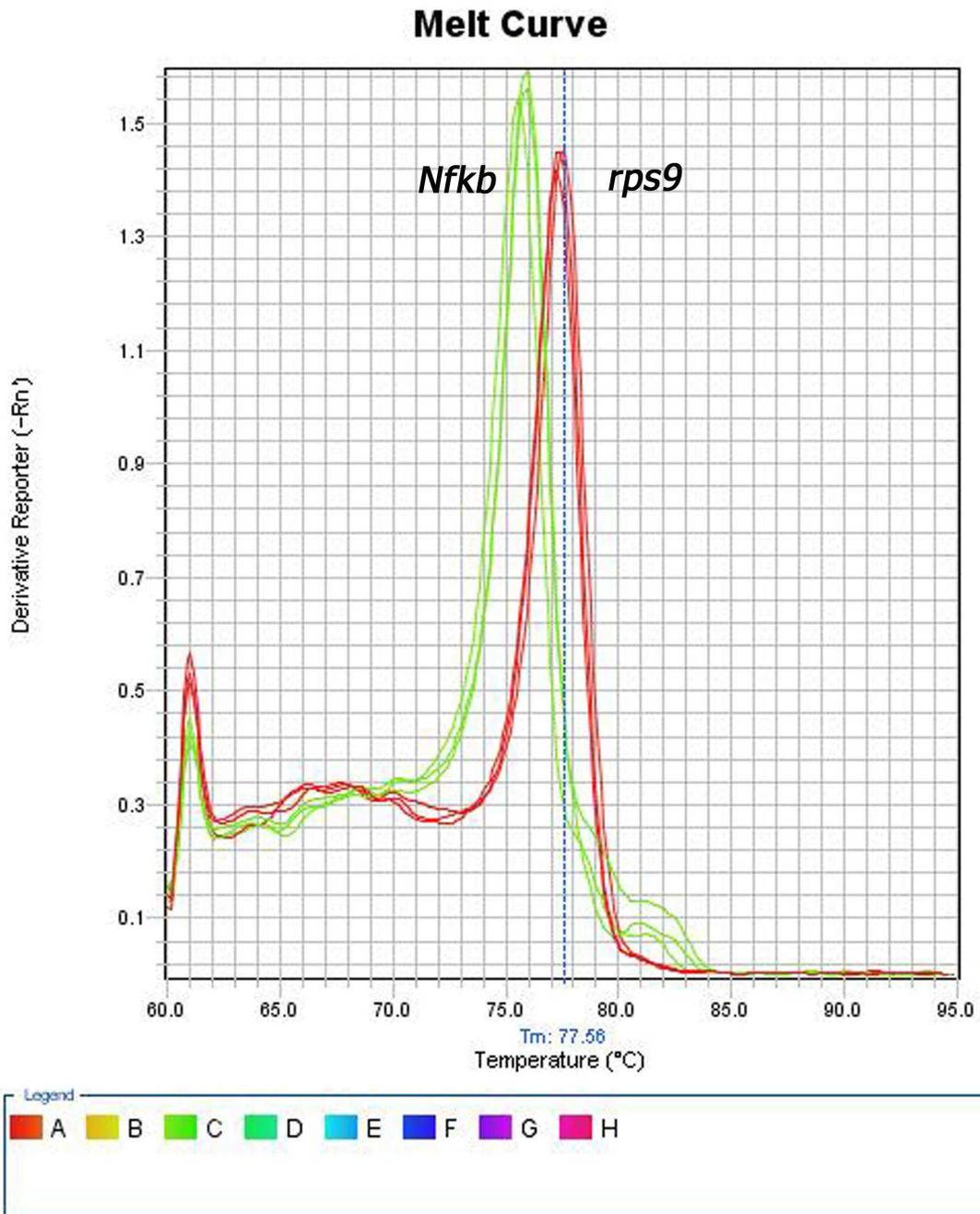


Figura 2 – Picos de desnaturação dos genes Rps9 e Nfkb. No eixo da ordenada está a derivada da intensidade da fluorescência e abscissa está representada a temperatura.

4.3. Análise por RT-PCR em tempo real dos genes dos macrófagos J774A.1 após interação com conídios e as frações F1 e F2 de *F.pedrosoi*

O resultado final expresso após a amplificação do cDNA no 7500 *Fast Real-Time PCR System* é o *fold change* (FC) do gene analisado e o desvio-padrão da triplicata de amostras.

Para todos os *fold changes* analisados (tabelas no Anexo I) apenas aqueles genes que tiveram a variação de sua expressão alterada em no mínimo duas vezes ($FC \pm 2,0$) foram considerados como diferencialmente expresso (induzido ou reprimido).

Para essas figuras foram realizadas análise estatística de variância (ANOVA), e o método pós-teste de (Bonferroni ou *t-test*). Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$, que foram destacadas nas figuras.

Com o objetivo de analisar a modulação de macrófagos após a interação com o fungo ou seus componentes de parede celular, foi avaliada a expressão de alguns genes envolvidos com a resposta inicial dos macrófagos.

4.3.1. Genes relacionados com receptores de reconhecimento padrão

Os genes analisados neste item são os genes relacionados com a adesão, fagocitose e ativação das células. O primeiro gene a ser analisado foi o gene *Itga5* (figura 3), que codifica a cadeia alfa 5 da integrina e está envolvido com adesão celular (NCBI Entrez Gene).

Na figura 3 observou-se que este gene teve sua expressão reprimida em macrófagos tratados com conídio do *F. pedrosoi* até 1h de estímulo e depois deste tempo não se observou alteração na sua expressão. Após 1h de estimulação com a fração F1 houve uma repressão significativa do gene. Após este tempo, observou-se uma indução da expressão deste gene. No tratamento com a fração F2 foi observada uma pequena repressão da expressão deste gene, seguida de uma pequena indução.

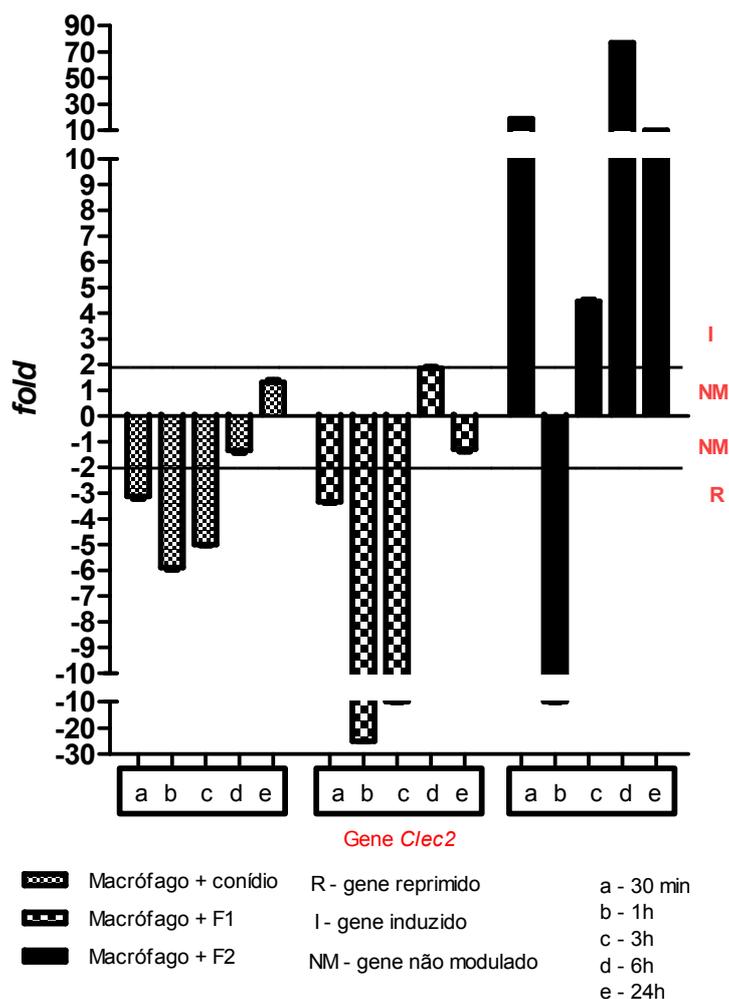


Figura 4 - Modulação da expressão do gene *Clec2* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais. Os dados estão apresentados em *fold*s changes de dois experimentos realizados independentemente, feitos em triplicata em cada um dos tempos analisados (30min, 1h, 3h, 6h e 24h). Os genes que tiveram a variação de sua expressão alterada em no mínimo duas vezes ($FC \pm 2,0$) foram considerados como diferencialmente expresso (induzido ou reprimido).

Outro gene analisado foi o *Cd14*, que codifica o receptor CD14, e está envolvido no reconhecimento de lipopolissacarídeo (LPS) e de outros componentes de parede celular bacteriana. A análise da expressão deste gene está representada na figura 10 e não teve sua expressão modulada pela fração F2, em nenhum dos tempos analisados. Os conídios induziram uma forte repressão do gene apenas com 1h de co-cultura e uma leve estimulação nos tempos seguintes (Figura 5).

No tratamento realizado com a fração F1 de *F. pedrosoi* (Figura 5) observou-se, a partir do tempo de 3h até o final da cinética, uma indução do gene *Cd14*, que com 6h atingiu o pico máximo de estimulação.

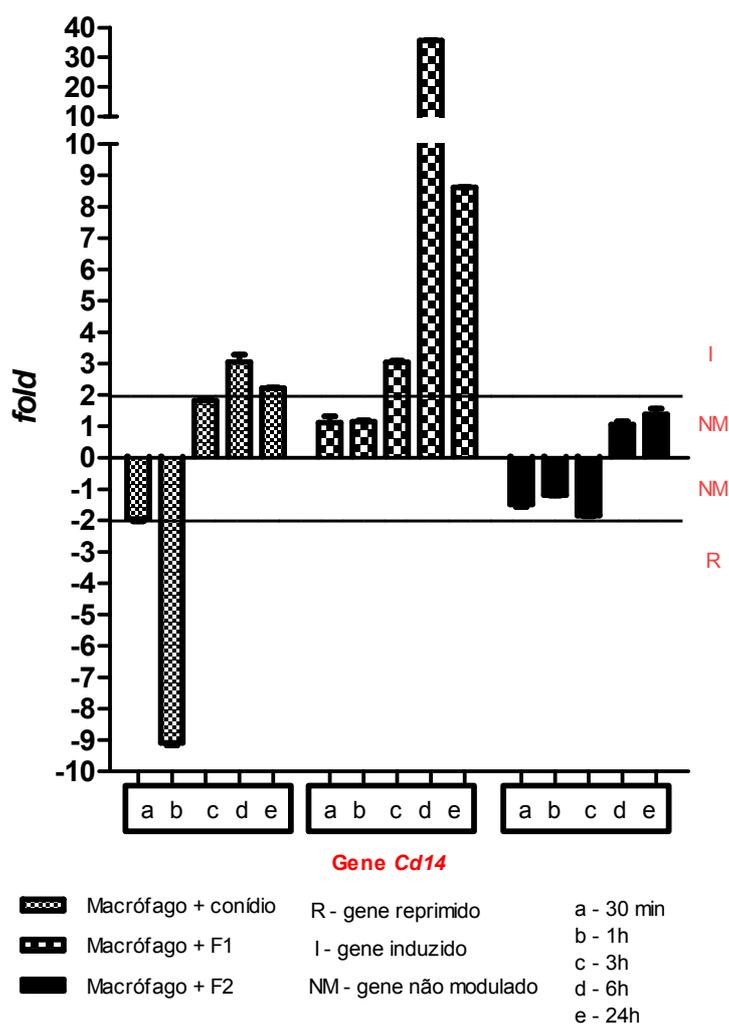


Figura 5 - Modulação da expressão do gene *Cd14* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais. Os dados estão apresentados em *fold*s changes de dois experimentos realizados independentemente, feitos em triplicata em cada um dos tempos analisados (30min, 1h, 3h, 6h e 24h). Os genes que tiveram a variação de sua expressão alterada em no mínimo duas vezes ($FC \pm 2,0$) foram considerados como diferencialmente expresso (induzido ou reprimido).

O gene *Tlr2* codifica o receptor do tipo *Toll-like 2*, que é um importante receptor de reconhecimento padrão (PRR) capaz de reconhecer proteínas de bactérias gram-positivas e zimosan em fungos (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006). A expressão deste gene no modelo estudado está descrito na figura 6. Após o tratamento com os conídios do *F. pedrosoi* observou-se uma repressão da expressão com 1h a seguir observou-se uma indução com 6h após interação dos macrófagos com conídios. Quando o tratamento foi realizado com a fração F1 observou-se um comportamento semelhante, com repressão do gene até 1h de estímulo e uma forte indução do gene no tempo de 6h.

A estimulação com a fração F2 reprimiu a expressão do gene até 3h de estimulação, diminuindo esta repressão até que induziu sua expressão no tempo de 24h.

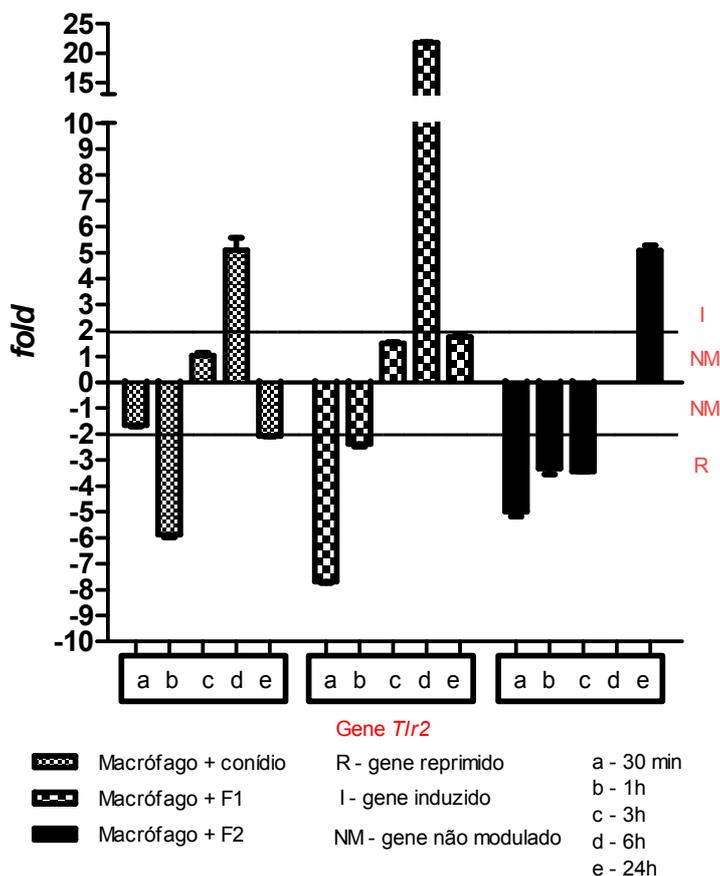


Figura 6 - Modulação da expressão do gene *Tlr2* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais. Os dados estão apresentados em *folds changes* de dois experimentos realizados independentemente, feitos em triplicata em cada um dos tempos analisados (30min, 1h, 3h, 6h e 24h). Os genes que tiveram a variação de sua expressão alterada em no mínimo duas vezes ($FC \pm 2,0$) foram considerados como diferencialmente expresso (induzido ou reprimido).

O gene *Tlr4* codifica o receptor do tipo *Toll-like 4*, que reconhece principalmente lipopolissacarídeos (LPS) e outras moléculas como hifas de *Aspergillus fumigatus* e polissacarídeos da cápsula de *Cryptococcus neoformans* (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006, SHOHAM *et al*, 2007). Na figura 7 observou-se que a partir de 1h de tratamento com os conídios do *F. pedrosoi* houve uma baixa repressão ou ausência de modulação deste gene. A estimulação dos macrófagos com a fração F1 não apresentou modulação significativa para este gene.

A estimulação dos macrófagos com a fração F2 induziu aumento na expressão deste gene apenas no tempo de 24h, nos demais tempos analisados não houve modulação da expressão do gene.

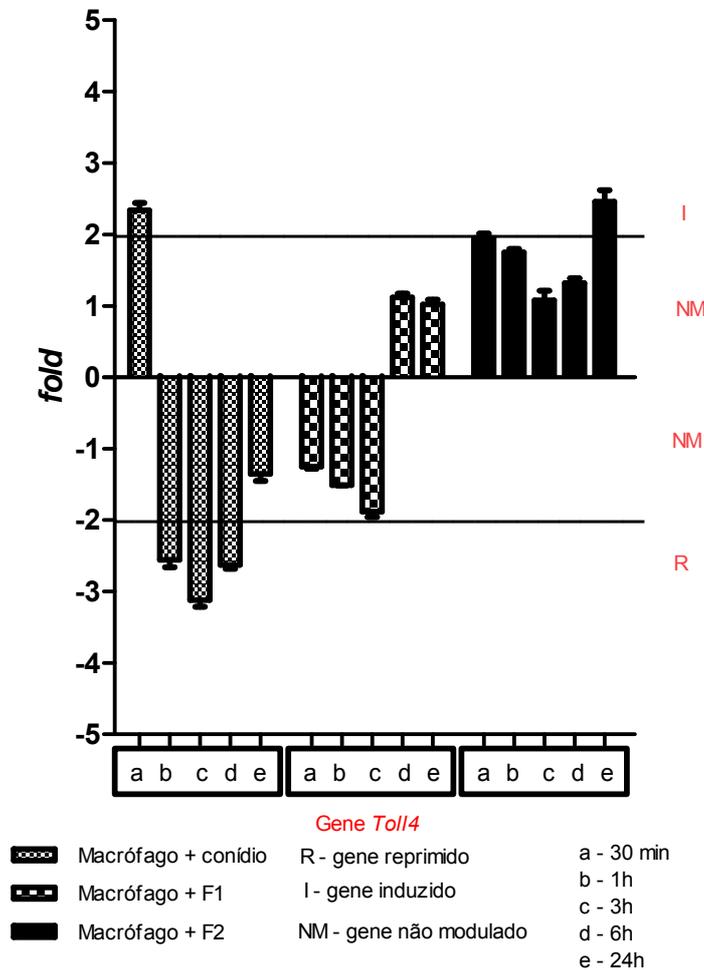


Figura 7 - Modulação da expressão do gene *Tlr14* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais. Os dados estão apresentados em *folds changes* de dois experimentos realizados independentemente, feitos em triplicata em cada um dos tempos analisados (30min, 1h, 3h, 6h e 24h). Os genes que tiveram a variação de sua expressão alterada em no mínimo duas vezes ($FC \pm 2,0$) foram considerados como diferencialmente expresso (induzido ou reprimido). Estatisticamente significativo $*p < 0,02$ em comparados macrófagos com conídios com macrófagos com a fração F2 os tempos da cinética, utilizando o teste de Bonferroni.

4.3.2. Genes relacionado a ativação celular

Após a interação entre os componentes da parede celular do fungo e os receptores presentes na sua membrana celular, ocorre uma importante etapa de ativação celular, que envolve diversas proteínas, algumas delas analisadas a seguir.

O gene *Myd88* codifica a proteína citoplasmática MyD88, que é uma proteína adaptadora envolvida na via de sinalização dos receptores da IL-1 e do tipo *Toll-like* (TLR) para ativar o fator de transcrição NF- κ B (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006). A indução deste gene foi demonstrada na figura 8, e observou-se que até 1h de estimulação com o conídio não houve alteração na modulação do gene. Nos demais tempos observou-se uma alternância na indução/repressão, sendo que com 24h houve uma forte indução do mesmo. Este perfil de expressão foi também observado com a estimulação da fração F1, onde houve uma forte estimulação da expressão do gene após 24h de estímulo (Figura 8).

Quando o tratamento dos macrófagos foi realizado com a fração F2, o gene *Myd88* apresentou-se reprimido até 3h de estimulação. A partir deste tempo, a sua expressão foi indetectável.

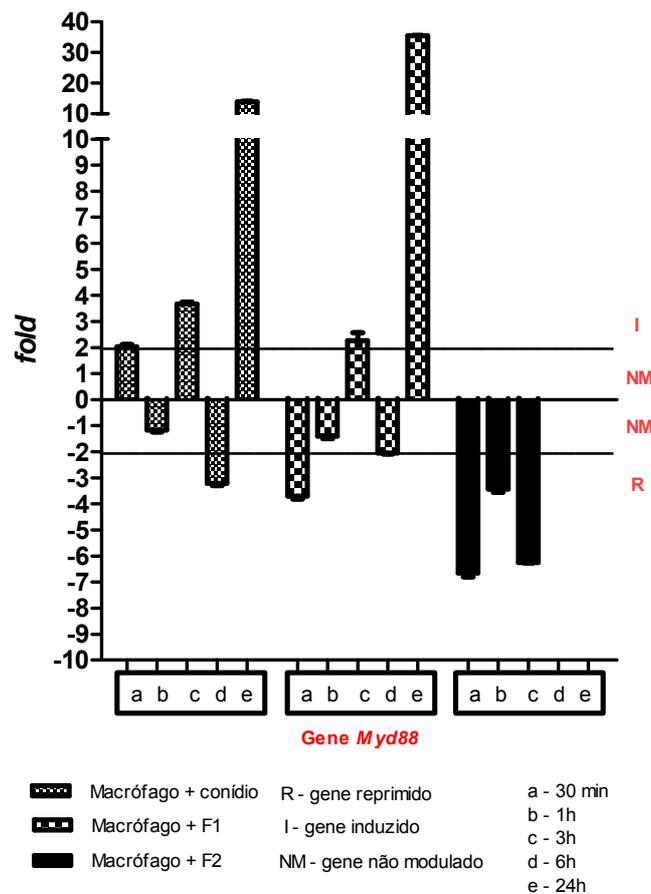


Figura 8 - Modulação da expressão do gene *Myd88* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais. Os dados estão apresentados em *fold changes* de dois experimentos realizados independentemente, feitos em triplicata em cada um dos tempos analisados (30min, 1h, 3h, 6h e 24h). Os genes que tiveram a variação de sua expressão alterada em no mínimo duas vezes ($FC \pm 2,0$) foram considerados como diferencialmente expresso (induzido ou reprimido).

O gene *Nfkb* codifica o fator de transcrição NF- κ B, que após a ligação com a região promotora de genes de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL12 induz o aumento da expressão destes genes. Na figura 9 foi demonstrada a modulação do *Nfkb* e é possível observar que houve uma repressão na expressão do gene durante toda a cinética, quando os macrófagos foram incubados com os conídios.

As frações F1 e F2 apresentaram um comportamento similar, com uma repressão moderada do gene no tempo de 1h e um aumento na expressão desse gene no tempo de 6h.

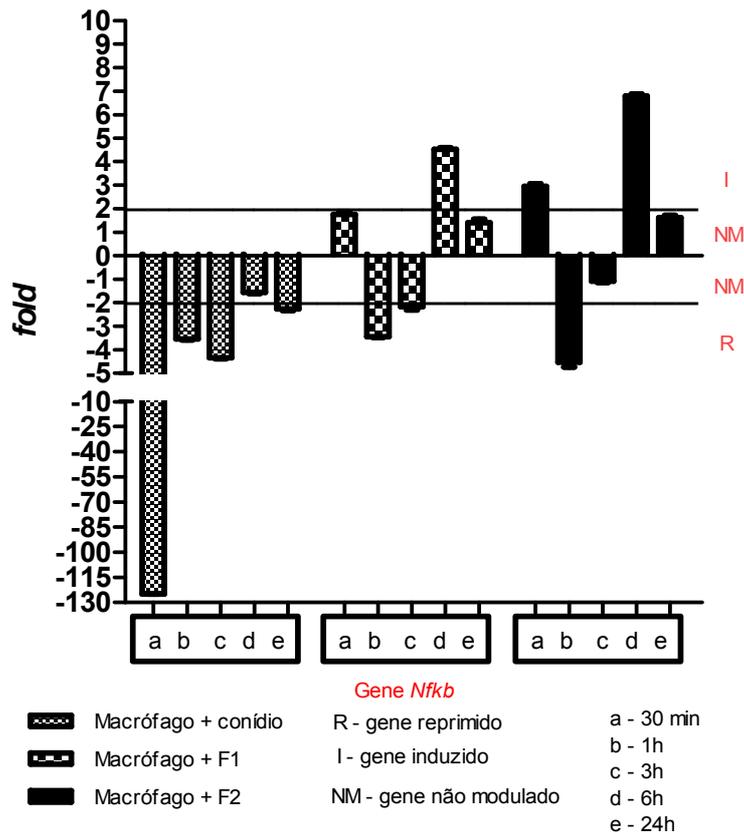


Figura 9 - Modulação da expressão do gene *Nfkb* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais. Os dados estão apresentados em *fold changes* de dois experimentos realizados independentemente, feitos em triplicata em cada um dos tempos analisados (30min, 1h, 3h, 6h e 24h). Os genes que tiveram a variação de sua expressão alterada em no mínimo duas vezes ($FC \pm 2,0$) foram considerados como diferencialmente expresso (induzido ou reprimido).

O gene do fator de repressão de NFkappaB (*Nkrf*) codifica a proteína NkRF. Conforme representado na figura 10, o gene *Nkrf* estava fortemente induzido em 30 min de tratamento dos macrófagos com os conídios. Após este tempo, a sua expressão passou a ser reprimida nos demais pontos da cinética. A fração F1 inicialmente não modulou a expressão deste gene, mas a partir do tempo de 3h foi observado repressão do gene. A fração F2 induziu a expressão do *Nkrf* nos tempos de 30min e 1h seguido por uma diminuição da expressão do gene.

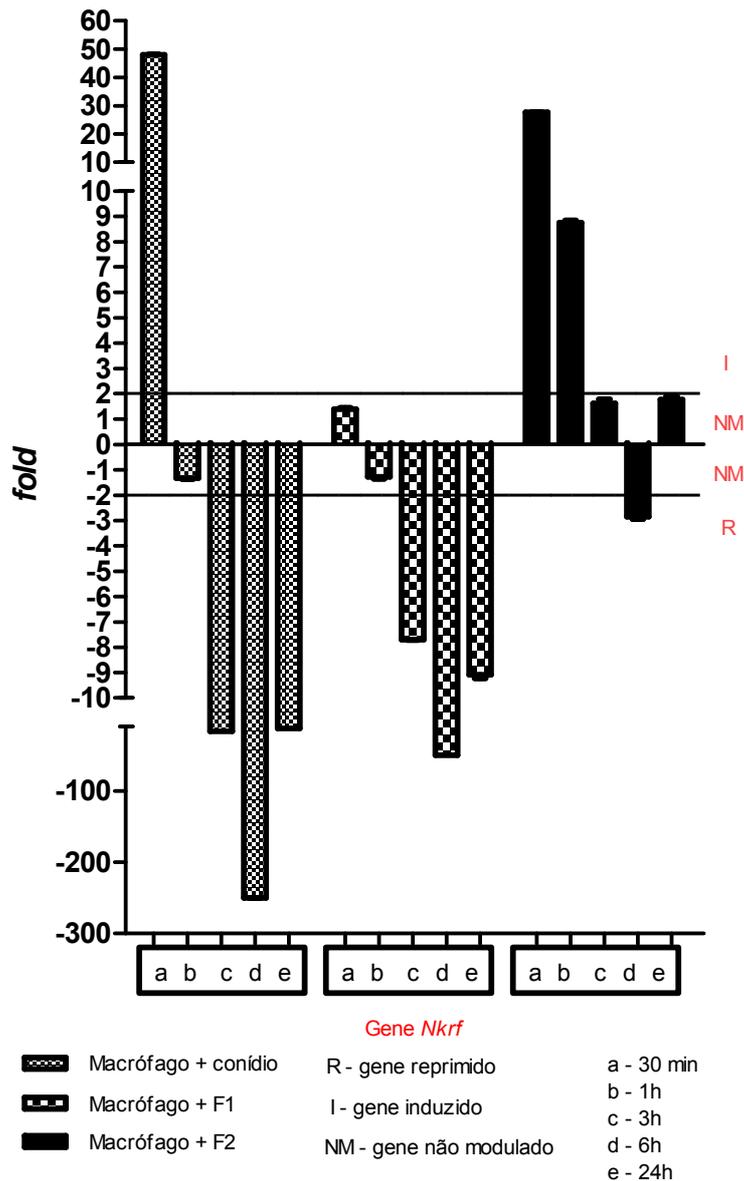


Figura 10 - Modulação da expressão do gene *Nkrf* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais. Os dados estão apresentados em *folds changes* de dois experimentos realizados independentemente, feitos em triplicata em cada um dos tempos analisados (30min, 1h, 3h, 6h e 24h). Os genes que tiveram a variação de sua expressão alterada em no mínimo duas vezes ($FC \pm 2,0$) foram considerados como diferencialmente expresso (induzido ou reprimido).

O fator de transcrição nuclear NF- κ B, após ser ativado por diferentes estímulos, é capaz de se ligar a regiões promotoras de diversos genes, entre eles o que codifica o gene *Tnf- α* responsável pela produção da citocina TNF- α . A variação da expressão deste gene e foi demonstrada na figura 11. Os conídios do fungo *F. pedrosoi* praticamente não modularam a expressão do gene *Tnf- α* até o tempo de 6 horas de tratamento. Com 24 horas de incubação observou-se uma repressão moderada. Após a estimulação com a

fração F1 observou-se uma alternância entre a repressão e a estimulação deste gene, com repressão no tempo de 3h e a estimulação nos tempos de 30min e 6h. A fração F2 estimulou a expressão deste gene nos tempos entre 30min a 6h. Apenas com 24h que não se observou modulação do gene (Figura 11).

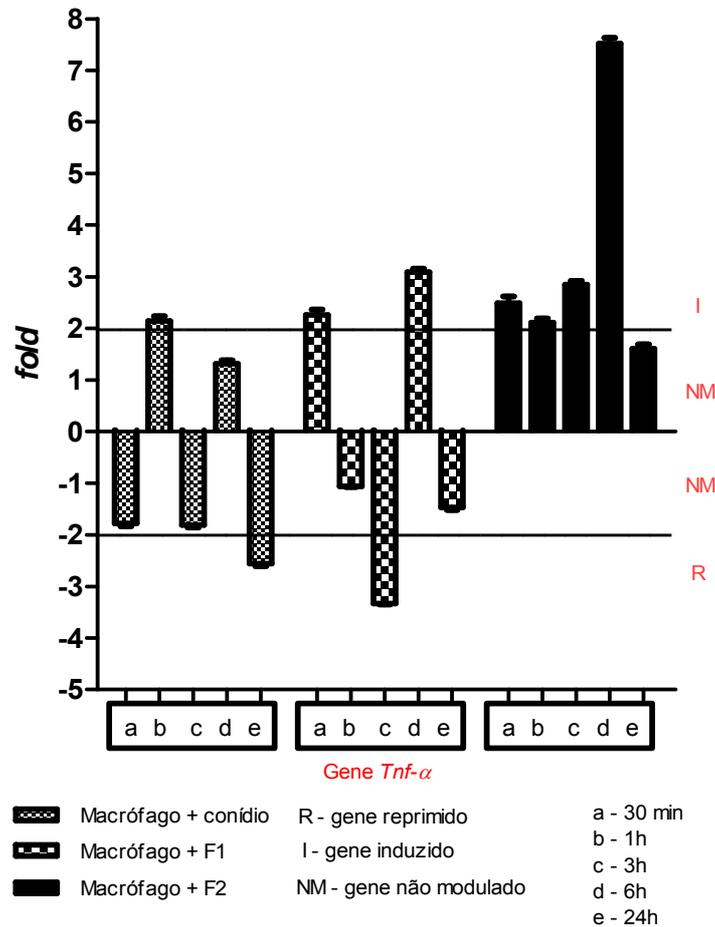


Figura 11 - Modulação da expressão do gene *Tnf-α* durante a cinética de interação de com macrófagos J774A.1 nas diferentes condições experimentais. Os dados estão apresentados em *folds changes* de dois experimentos realizados independentemente, feitos em triplicata em cada um dos tempos analisados (30min, 1h, 3h, 6h e 24h). Os genes que tiveram a variação de sua expressão alterada em no mínimo duas vezes ($FC \pm 2,0$) foram considerados como diferencialmente expresso (induzido ou reprimido).

5. Discussão

Um dos aspectos importantes para que o sistema imunitário estabeleça uma resposta imune eficiente a um patógeno é o reconhecimento antigênico, diferenciando o que é próprio do que é não próprio (EMUCS, 2010). Este reconhecimento pode ocorrer inicialmente ou mais tardiamente, envolvendo diferentes moléculas na superfície das células do hospedeiro. Neste trabalho foi avaliado a cinética de expressão de algumas destas moléculas de reconhecimento antigênico bem como de outras envolvidas no processo de ativação celular. O ponto de partida deste estudo foi a definição de uma cinética de internalização de conídios de *F. pedrosoi* por macrófagos J774A.1. Essa cinética foi baseada nos dados definidos por Tavares *et al* (2007), que utilizando macrófagos murinos e *Paracoccidioides brasiliensis* numa cinética de 1, 3, 6 e 12h obtiveram índice de internalização de 90% das leveduras no tempo de 6h. Resultados similares foram encontrados também para *F. pedrosoi*, onde os mesmos índices foram observados no tempo de 6h, embora a cinética utilizada para essa interação avaliou todos os tempos, uma vez que não há para esse fungo nenhum trabalho semelhante.

Os mecanismos envolvidos na eliminação do *F. pedrosoi*, principal agente etiológico da cromoblastomicose, tem sido de grande interesse. A eliminação total do fungo no organismo do hospedeiro depende tanto de uma terapia efetiva como da integridade da resposta imunológica. Na infecção causada pelo *F. pedrosoi*, o principal mecanismo de defesa é mediado pelos fagócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos. A participação dos macrófagos na eliminação do fungo foi demonstrada por Ahrens *et al* (1989), sendo que a atividade fungistática é dependente da sua ativação, uma vez que os macrófagos residentes não apresentavam nenhuma atividade fungicida e fungistática *in vitro* quando incubados com leveduras do *Fonsecaea pedrosoi*, dados confirmados por Farbiarz *et al* (1990). Após a ativação, os macrófagos são capazes de apresentar atividade fungistática sobre o *F. pedrosoi* (ROZENTAL *et al*, 1994) porém não apresentaram atividade fungicida. Apesar desta incapacidade de eliminar o fungo, os macrófagos apresentam alta capacidade fagocítica (BOCCA *et al.*, 2006, NÓBREGA *et al.*, 2010).

Considerando que os macrófagos estão presentes nas lesões granulomatosas sem desenvolver atividade microbicida efetiva, foi analisado a expressão de alguns genes envolvidos com o processo de ativação destas células.

A adesão de microrganismos a tecidos do hospedeiro é um evento crucial no desenvolvimento da infecção e está relacionada como o primeiro passo da colonização dos microrganismos patogênicos. Da mesma forma a adesão à matriz extracelular pelos fagócitos é um evento importante no processo de migração celular e estabelecimento de um processo inflamatório. As integrinas são responsáveis inicialmente por este processo de adesão, estando presentes na superfície celular de polimorfonucleares (WILLIAMS E SOLOMKIN, 1999) e monócitos/macrófagos (ABSHIRE *et al*, 2011), e a partir de estímulos intracelulares, ocorrem mudanças na conformação do receptor da integrina e subsequentemente da afinidade do ligante (HARJANTO e ZAMAN, 2010). As integrinas são capazes de se ligar à matriz extracelular, e são dímeros, compostas por duas cadeias, as subunidades α e β , associadas por ligações não covalentes. A cadeia alfa 5 da integrina é codificada pelo gene *Itga5* de camundongo (NCBI Entrez Gene), associa-se a subunidade $\beta 1$, formando o complexo $\alpha 5\beta 1$, que é o receptor de fibronectina expresso em macrófagos, (SHIMA *et al*, 1995). As integrinas regulam a motilidade do macrófago na migração para o local da inflamação, uma vez que a sua depleção ou bloqueio impede a formação de uma resposta inflamatória completa (LAVIGNE *et al*, 2007, ABSHIRE *et al*, 2011).

Conforme demonstrado na figura 3, a fração F1 do fungo que contem β -1-3-glicana, induziu a expressão do gene *Itga5* a partir de 3h. Este aumento da expressão do gene pode ser decorrente principalmente da interação entre outros receptores com a β -1-3-glicana., como o CR3 do complemento que é um dímero de integrina formado por $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18), expresso constitutivamente em monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK (BLYSTONE E BROWN, 1999). O CR3 embora seja um ligante responsável pela fagocitose de partículas opsonizadas pelo iC3b também liga uma diversidade de outros ligantes como fator X da coagulação, fibrinogênio, ICAM-1 e uma variedade de moléculas presentes na superfície de parasitas, bactérias e fungos (GOODRIDGE E UNDERHILL, 2009). Conforme demonstrado em outros estudos, a β -1-3-glicana pode ser reconhecida por este receptor em polimorfonucleares (VETVICKA, THORNTON E ROSS, 1996, TSIKITIS *et al*, 2004). O reconhecimento está na cadeia α_M do CR3 que possui alta afinidade por β -1-3-glicana, embora o mecanismo esclarecendo como a ligação acontece não esteja totalmente definido (GOODRIDGE E UNDERHILL, 2009). A repressão da expressão deste gene nos tempos de 30 min e 1h da cinética pode está relacionada com a baixa expressão deste receptor na superfície dos macrófagos o que pode também interferir na sua adesão aos

conídios do fungo. Este mecanismo de adesão entre as células do hospedeiro e o fungo já foi descrito para vários fungos, entre eles o *P. brasiliensis*, que possui várias adesinas que possibilitam o acesso ao interior das células para colonização e crescimento (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2006).

Outro receptor importante na adesão e ativação de monócitos e neutrófilos do sangue periférico é o CLEC-2 (KERRIGAN *et al.*, 2009). O CLEC-2 é expresso na superfície de monócitos e quando ativado via TLR, leva ao aumento da fagocitose e produção de citocinas pró-inflamatórias, mas não é capaz de induzir a explosão respiratória. Em neutrófilos, este receptor está envolvido na fagocitose de corpos opsonizados por anticorpos e produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (KERRIGAN *et al.*, 2009). O CLEC-2 é também expresso em outras células mielóides (células dendríticas e granulócitos), células da medula óssea, do sangue periférico e do fígado e células NK (SOBANOV *et al.*, 2001). Este receptor pertence a subfamília do *cluster* Dectina-1 (HYSAMEN E BROWN, 2009). Um número de ligantes endógenos e exógenos tem sido identificados para CLEC-2, incluindo a rodocitina (veneno de cobra) (SUZUKI-INOUE *et al.*, 2006), HIV-1 (CHAIPAN *et al.*, 2006), um ligante endógeno a podoplanina (SUZUKI-INOUE *et al.*, 2006) e outras proteínas endógenas (como moléculas relacionadas com o MHC-1 não clássico como o HLA-E, principalmente Qa-1) (YOKOYAMA E PLOUGASTEL, 2003). O CLEC-2 é também capaz de reconhecer antígeno siálico X de Lewis (sLeX) (presente em várias células cancerosas e interage com selectinas) ligados com β -glicanas de cadeias curtas (IMAIZUMI *et al.*, 2009).

Observando as modulações do padrão de expressão do gene *Clec2* (figura 4), vimos que apenas os macrófagos estimulados com a fração F2 apresentaram indução no padrão de expressão deste gene em todos os tempos da cinética, exceto em 1h. Essa indução associada a fração F2 do *F. pedrosoi* pode estar relacionada ao reconhecimento de proteínas ou carboidratos presentes nessa fração que é composta de α -1-3-glicana e melanina. Nossos dados corroboram com os dados da literatura que demonstram uma associação entre a ativação dos fagócitos via CLEC-2 e aumento da produção da expressão dos genes do TNF- α (figuras 4 e 11). A estimulação dos macrófagos via CLEC-2 pela fração F2 pode aumentar a internalização dos fungos, aumentar a produção de TNF- α , mas não estimular a produção de mecanismos microbicidas pelos macrófagos, como a explosão respiratória. Por outro lado, nas demais condições com conídios ou fração F1 nos tempos de 30 min, 1h e 3h houve uma repressão na expressão desse gene, provavelmente porque os conídios e a fração F1 apresentam uma quantidade

de β -glicana maior na sua parede celular, que ativaram o macrófago por uma outra via como Dectina-1.

Outra via de ativação dos macrófagos ocorre através dos receptores CD14 e dos receptores do tipo *Toll-like* (TLR). O CD14 é um receptor de membrana codificado pelo gene *Cd14*, que tem especificidade para lipopolissacarídeo (LPS) (CLEVELAND *et al*, 1996, PALSSON-McDERMOTT E O'NEIL, 2004) e outros componentes de parede bacteriana (ULEVITCH, *et al* 1995). O CD14 é também considerado um co-receptor importante na sinalização de alguns receptores do tipo *Toll-Like* (TLR), principalmente TLR2 e TLR4 (FIGUEIREDO *et al*, 2010). A associação TLR2 e TLR4 com CD14 induzem uma resposta inflamatória com aumento da atividade fagocítica pelos fagócitos (SHOHAM *et al*, 2007, BARBOSA *et al*, 2007). A via de ativação desses receptores ocorre através da cascata de sinalização resultando na translocação nuclear de NF- κ B e na indução de uma resposta pró-inflamatória que inclui a produção de TNF- α (SHOHAM *et al*, 2007). Figueiredo *et al* (2010) analisaram a participação do CD14 na interação com conídios e ramnomanas de *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*). Os macrófagos de camundongos C57BL/6 deficientes *Cd14*^{-/-}, estimulados com conídios de *P. boydii* apresentam uma produção comprometida de TNF- α quando comparada a macrófagos de animais selvagens, inferindo que o reconhecimento dessas estruturas fúngicas pode estar associada ao receptor CD14 e TLR4.

Comparando com os nossos resultados, quando avaliamos a expressão do gene *Cd14*, após o tratamento com o conídio de *F. pedrosoi*, observamos que inicialmente ocorreu repressão na expressão do gene e uma leve estimulação nos outros tempos analisados na cinética (Figura 5). O gene *Cd14* foi induzido após a estimulação dos macrófagos com a fração F1 a partir do tempo de 3h até o final da cinética. Quando β -1-3-glicana de *E. gracilis* purificada foi testada nesse experimento houve também indução do gene (dados não mostrados), demonstrando que a β -1-3-glicana, tanto do controle positivo como presente na fração F1 foi capaz de estimular a expressão dos genes do receptor de CD14. A fração F2, que não possui β -1-3-glicana, não foi capaz de modular a expressão deste gene.

Os tipos de PRRs mais descritos e estudados são os receptores *Toll-like* (TLR), uma família de proteínas transmembrana tipo I, que apresenta um domínio N-terminal com sequências repetidas de leucina (LRR – *leucina-rich-repeat*) para ligação aos PAMPs, um domínio simples transmembrana e um domínio de sinalização intracelular

C-terminal. Esses receptores são expressos nas membranas celulares e em compartimentos subcelulares como os endossomos de diversos tipos celulares como as células epiteliais e endoteliais, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006).

O receptor *Toll-like 2* (TLR2) foi originalmente considerado um ligante de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram positivas. O TLR2 pode associar-se com TLR1 ou TLR6, envolvidos no reconhecimento de uma grande diversidade de produtos microbianos. A associação TLR2/TLR1 reconhece uma série de PAMPs de origem bacteriana, entretanto a associação TLR2/TLR6 ou TLR2 na forma de homodimérico reconhece moléculas de fungos e protozoários, como zimosan (mistura de glicanas, mananas, proteína, quitina e glicolipídeos extraídos de membrana celular de *S. cerevisiae*, o glicosilfosfatidilinositol e o glicoinositolfosfolipídeo do parasita *Trypanosoma cruzi* (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006).

Na figura 6 foi observada a modulação do gene *Tlr2* que após o tratamento com os conídios do *F. pedrosoi* ou com a fração F1 apresentou uma indução de sua expressão no tempo de 6h, e com a fração F2 essa indução ocorreu no tempo de 24h. O componente presente nessas duas frações é β -glicana. Figueiredo *et al* (2010) demonstraram que hifas de *P. boydii* também ricas no mesmo componente (β -glicana) são reconhecidas pela via TLR4 e CD14. Nossos dados sugerem que esse reconhecimento foi realizado via TLR2 (figura 6) e CD14 (figura 5). Para demonstrar que a via de reconhecimento utilizada é realmente via co-receptor CD14, verificamos a estimulação dos níveis de transcritos de *Myd88*, que estava reprimida no tempo de 6h tanto na presença de conídio quanto da fração F1.

Bitencourt *et al* (2006) demonstraram que os conídios *Pseudallescheria boydii* possuem α -glicana em sua parede celular e esse componente pode ser reconhecido pelos receptores TLR2 e CD14 presente na superfície dos macrófagos, estimulando essas células a produção de citocinas. A fração F2 do *Fonsecaea pedrosoi* apresenta α -glicana em maior quantidade, e promoveu a indução apenas no tempo de 24h, entretanto quando observamos o *Cd14* nesse mesmo tempo, observamos que esse gene estava não modulado, indicando que esse reconhecimento utilizando esta via ocorre em um momento mais tardio da cinética que não foi contemplado neste estudo. Para descartar a rota de reconhecimento via MyD88, observamos que nesse tempo esse gene encontrava-se reprimido.

Uma outra possibilidade para explicar esse reconhecimento da fração F2 via TLR2, seria através de homodímeros desse receptor (TLR2/TLR2), que é capaz de reconhecer zimosan (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006). Como a fração F2 possui um segundo constituinte que é a melanina, e esta é rica em carboidratos (manose, galactose e glicose), aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, glicina e alanina) e ácidos graxos saturados (ácidos palmítico, oléico, estearílico e linoléico) (ALVIANO et al, 1991), componentes que também fazem parte do zimosan, o aumento nos níveis de transcritos de *Tlr2* poderia ser explicada pela presença destes componentes na fração F2.

O TLR4 é o receptor do ligante de LPS mais estudado e essa ligação induz uma produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 e IL-6. O TLR4 isolado não é suficiente para uma resposta adequada ao LPS, e a associação com CD14 ou MD-2 são necessários, o que faz com que outros ligantes sejam reconhecidos, entre eles, as hifas de *Aspergillus fumigatus* e polissacarídeos da cápsula de *Criptococcus neoformans* (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006, SHOHAM et al, 2007). Foi demonstrado que a sinalização via TLR4 esta associada a um aumento da severidade da infecção causada por *P. brasiliensis*, com aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias e células T-regulatórias (LOURES et al, 2010) Os genes *Tlr2* e *Tlr4* foram escolhidos no estudo, pois entre os receptores *Toll-like* são os únicos que reconhecem uma grande diversidade de PAMPs, como aqueles presentes na superfície dos fungos (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006). Nos dados demonstrados na figura 7 ocorreu a indução significativa do gene *Tlr4* na presença da fração F2 no tempo de 24h e na presença de conídios no tempo de 30 min.

Shoham et al (2001) estudaram a resposta do hospedeiro a glicuronoxilomana (GXM) de *C. Neoformans* e demonstraram que o reconhecimento desse componente ocorre via receptores TLR4 e CD14, com translocação de NF- κ B para o núcleo, mas com uma ativação incompleta porque não há produção de TNF- α . A fração F2 é composta de melanina, que possui carboidratos como as mananas em sua composição e que podem estar sendo reconhecidas pela mesma via no tempo de 24h (ALVIANO et al, 1991). Quando observamos a modulação do gene *Cd14* no tempo de 24h vemos que esse gene se encontra não modulado, o mesmo ocorreu para o *Myd88*, cujo transcrito não foi detectado nesse tempo. Sabendo que o TLR4 sozinho não responde adequadamente ao antígeno, e necessita sempre de uma molécula adaptadora para ser ativado, e que existem três possíveis moléculas adaptadoras capazes de interagir com

TLR4, como o CD14, MyD88 e MD-2 (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006), como os nossos resultados com os transcritos dos genes *Cd14* e *Myd88* apresentaram-se não modulados, a avaliação do gene *Md-2* talvez traga melhores explicações para esse resultado, confirmando ou descartando o reconhecimento dessa fração por essa via. Outra alternativa de reconhecimento da fração F2, seria através de seu outro componente, a α -glicana. Conforme descrito anteriormente, Figueiredo *et al* (2010) demonstraram que conídios de *Pseudallescheria boydii* que são ricos em α -glicana (BITTENCOURT *et al*, 2006), são reconhecidos por receptores TLR4 e CD14, sendo que o componente presente no conídio responsável por essa ativação são as ramnomanas, com produção da citocina TNF- α . Nos nossos resultados o CD14 não estava modulado o que nos levou a descartar essa via. A segunda ativação do gene *Tlr4* ocorreu na presença conídios no tempo de 30min. Quando conferimos a expressão do gene do *Myd88* observamos uma leve indução no tempo de 30 min proporcional a indução do gene *Tlr4*. Essa via de ativação TLR4/MyD88 não é descrita como sendo capaz de reconhecer componentes fúngicos, embora a ausência do gene do MyD88 seja considerado mais importante que a deficiência dos gene de TLR2 e TLR4 em modelos animais, no reconhecimento de leveduras de *P. brasilienses* (CALICH *et al*, 2008).

O MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) é uma molécula adaptadora utilizada por receptores TLR2 e TLR4. A sinalização dependente de MyD88 é iniciada por uma mudança conformacional no domínio citoplasmático do receptor TLR induzida por um PAMP, que leva a associação de MyD88 com os receptores TLRs através da interação entre seus domínios de tirosina. A via de sinalização dependente de Myd88 está esquematizada na figura 13. A ativação das vias envolvendo o MyD88 modula a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que controla a expressão de diversos genes de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β (WEST, KOBLANSKY E GHOSH, 2006). A indução do gene do Myd88 foi demonstrada na figura 8, e o que nos chama atenção é a oscilação entre indução/repressão desse gene após o tratamento com conídios ou a fração F1 de *F. pedrosoi*, embora nos tempos de 6 e 24h para ambos a indução tenha sido predominante.

Quando foi comparado esses resultados do tratamento com conídios e o CD14, observou-se que esses dados são interessantes. Com o tratamento do conídio, a expressão do *Cd14* está induzido em 6h apenas e seus resultados foram compatíveis com a indução de *Tlr2*, entretanto quando observou-se o *Myd88*, com esse mesmo tratamento, vemos que sua indução ocorreu em 30min, 3h e 24h, ou seja, estas

Com a estimulação com a fração F1, os níveis de expressão do gene *Myd88* estava induzido em 3 e 24h, e reprimido em 6h. Comparando esses dados com *Cd14* observou-se aumento a partir de 3h até o fim da cinética. No tempo de 6h quando *Myd88* estava reprimido, o *Cd14* estava aumentado e seus resultados foram compatíveis com a ativação *Tlr2*, entretanto o aumento de *Myd88* nos tempos de 6 e 24h que não foram compatíveis com os receptores *Tlr2* e *Tlr4*, que são os receptores que interagem com essa molécula. Sendo assim, é necessário o estudo de outras moléculas para compreender o grau de envolvimento do gene *Myd88* e novos experimentos para melhor compreensão desse resultado.

Após a ativação dos receptores *Toll-like*, alguns fatores de transcrição são ativados em decorrência desta ativação, como o NF- κ B e o N κ RF e ocasionando a secreção de citocinas como o TNF- α .

O NF- κ B é um heterodímero formado por duas subunidades p65 (RelA) e p50, que formam a molécula ativa p50/RelA. Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a proteínas inibitórias pertencentes à família de proteínas Rel, que são as I κ B. A formação do complexo I κ B/NF- κ B impede a translocação do NF- κ B para o núcleo (BAEUERLE E BALTIMORE, 1996). Para que o NF- κ B seja translocado ao núcleo é necessário que ocorra fosforilação e degradação da I κ B. Uma vez estimulado a proteína I κ B recebe a adição de ubiquitina pela ubiquitina ligase, e torna-se fosforilada sendo em seguida degradada pelo complexo proteossoma 26S, liberando NF- κ B, que pode ser transportado para o núcleo onde será ligado aos genes que apresentam a sequência regulatória junto à região promotora, levando a um aumento na expressão do gene alvo (BAEUERLE E BALTIMORE, 1996, BALDWIN, 1996, GOSH, MAY E KOPP, 1998).

Na figura 9, foram apresentados os dados da modulação da expressão do gene *Nfkb*. Na presença do conídio durante toda a cinética não houve detecção de transcritos. Para melhor compreender a modulação desse gene observamos o que aconteceu com os genes que possuem uma relação direta com a sua ativação ou repressão (*Cd14*, *Tlr2*, *Tlr4* e *Myd88*). Com 30min após esse tratamento com conídios os genes *Myd88* e *Tlr4* apresentavam um aumento nos níveis de transcritos, mas o *Nfkb* estava reprimido, o que impede a sua translocação para o núcleo e conseqüente transcrição. Essa repressão provavelmente foi controlada pela modulação do padrão de expressão do gene *Nkrf*, que estava induzido nesse mesmo tempo. Com 1h *Cd14*, *Tlr2* e *Tlr4* estavam reprimidos e acompanharam a repressão do *Nfkb*, com 3h *Tlr4* e o *Nfkb* estavam reprimidos embora

Myd88 estivesse induzido, e com 24h o que aconteceu para *Tlr2* desta vez aconteceu para *Tlr4*. No tempo de 6h com esse mesmo estímulo *Cd14* e *Tlr2* estavam induzidos, mas o *Nfkb* estava não modulado, o que também impede sua translocação para o núcleo embora o *Nkrf*, que pode regular negativamente essa translocação estivesse reprimido. Observando a estimulação com a fração F1 no tempo de 1h foi observado que o *Tlr2* estava reprimido e o *NFκB* também reprimido e nenhuma modulação observada para *NκRF* e *Tnf-α*. Com 6h, *Tlr2* e *Cd14* estavam induzidos com *Nfkb* e *Tnf-α* também ativados, com uma via de sinalização completa sendo realmente capaz de reconhecer β-glicana de *F. pedrosoi* por essa via, do mesmo modo que Figueiredo *et al* (2010) demonstrou para hifas de *P. boydii* com esse mesmo componente. Para a estimulação com a fração F2, o *Nfkb* estava reprimido no tempo de 1h, quando foi comparado com os genes que se correlacionam observamos que *Myd88* e *Tlr2* também estavam reprimidos, provavelmente pela indução do *Nkrf*.

O gene *Nkrf* (fator de repressão do *Nfkb*) codifica a proteína NκRF um repressor de transcrição que interage com elementos regulatórios negativos para reprimir a transcrição de alguns genes responsivos ao fator nuclear kappa B (NF-κB).

A modulação da expressão do fator de repressão do NFκB, demonstrado na figura 9, apresentam indução/repressão compatível com a expressão dos genes do *Nfkb*. Para a fração F2 a indução em 30min e em 1h reprimiu o *Nfkb*, que não foi translocado ao núcleo para ser ativado.

A via de ativação do NF-κB dispara uma cascata de sinalização que resulta na translocação nuclear do NF-κB e na indução de uma resposta inflamatória pela ativação do gene *Tnf-α* que induz a produção desta citocina (SHOHAM *et al*, 2007).

O tratamento com a fração F1 no tempo de 6h foi discutida anteriormente com o gene *Nfkb*, a repressão em 3h estava de acordo com a repressão em *Nfkb* e *Nkrf* também reprimidos, e a indução em 30min nossos dados não são capazes de explicar, pois *Myd88* e *Tlr2* estavam reprimidos e *Cd14* e *Tlr4* estavam não modulados. Com conídios a repressão observada com 24h confirma a repressão do *Nkrf* (figura 10). A fração F2 que estimulou a expressão de *Tnf-α* em 30min, 1h, 3h e 6h, apresentou um comportamento que pode ser explicado pelo aumento da expressão do gene para a *Clec-2*, que quando expresso em neutrófilos, é capaz de mediar a fagocitose e induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α em resposta a ligantes como a rodocitina, sem induzir uma explosão respiratória (KERRIGAN *et al*, 2009).

Os resultados obtidos nesse trabalho são pioneiros na identificação de genes expressos após a interação entre o *F. pedrosoi*-fagócito, e proporcionaram o entendimento inicial do processo infectivo deste fungo, além de fornecer dados novos que abrem novas perspectiva no estudo da patogênese da cromomicose.

6. Conclusão

Os dados apresentados no presente estudo avaliaram os tempos iniciais de interação entre os conídios de *F. pedrosoi* ou suas frações de parede celular (F1 e F2) e os macrófagos, através da análise da expressão de genes relacionados com adesão, fagocitose e ativação celular. Após a análise dos nossos resultados, concluímos que as frações da parede celular de *F. pedrosoi*, após interagirem com os macrófagos J774A.1, produzem mudanças temporais na modulação da expressão de genes envolvidos com a ativação destas células, e que essas frações em conjunto na parede celular da forma infectante do fungo poderiam explicar as alterações funcionais induzidas nesta célula, que a tornam incapaz de eliminar esse fungo.

7. Referências

Abshire M.Y., Thomas K.S., Owen K.A., Bouton A.H. (2010). Macrophage motility requires distinct $\alpha 5\beta 1$ /FAK and $\alpha 4\beta 1$ /paxillin signaling events. *Journal of Leucocyte Biology*, 89: 1-7.

Ahrens J., Graybill J.R., Abishawl F.O.T., Rinaldi M.G. (1989). Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 40(6): 651-658.

Alviano C.S., Farbiarz S.R., Souza W., Angluster J., Travassos L.R. (1991). Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Journal of General Microbiology*, 137(4): 837-844.

Alviano C.S., Farbiarz S.R., Travassos L.R., Angluster J., Souza W. (1992). Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propanolol. *Mycopathologia*, 119(1): 17-23.

Altamura M, Casale D, Pepe M, Tafaro A. (2001). Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. *Current Drug Target Immune Endocrine Metabolic Disorders*, 1: 189-97.

Baeuerle P.A., Baltimore D. (1996). NF- κ B: Ten years after. *Cell*, 87: 13-20.

Baldwin, A.S.J. (1996) The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insight. *Annu. Rev Immunol*, 14: 649-83.

Baqueiro G. F., Lopez P.B., Lescay B. R.(1961).Chromoblastomycosis experimental. *Bol. Sec. Cuba Derm. Sif*, 18:19-28.

Barbosa F.M., Fonseca F.L., Figueiredo R.T., Bozza M.T., Casadevall A., Nimrichter L., Rodrigues M.L. (2007). Binding of glucuronoxylomanann to the CD14 receptor in human A549 alveolar cells induces interleukin-8 production. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(1):94-8.

Bittencourt V.C.B., Figueiredo R.T., Silva R.B., Mourão-Sá D.S., Fernandez P.L., Sasaki G.L., Mulloy B., Bozza M.T., Barreto-Bergter E.(2006). An α -glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and toll-like receptor activation. *The journal of Biological Chemistry*, 281(32): 22614-22623.

Blystone S.D., Brown E.J. (1999). Integrin receptors phagocytes. In: Gordon S., ed. Phagocytosis: the host. Stamford, CT: *JAI Press*, 103-147.

Bocca A.L., Brito P.P.M.S., Figueiredo F., Tosta C.E.(2006). Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia*, 161(4), 195-203.

Brygoo E. R., Destombes P. (1975). Epidemiologia de la chromoblastomycose humaine. *Bull Inst. Pasteur*, 74:219-43.

- Calich V.L.G., Pina A., Felonato M., Bernardino S., Costa T.A., Loures F.V. (2008). Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and Myd88 in paracoccidioidomycoses. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 53: 1-7.
- Chaipan C., Soilleux E.J., Simpson P.E. *et al* (2006). DC-SING and CLEC-2 mediated human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J. Virol.* 80: 8951-8960.
- Cleveland M.G., Gorham J.D., Murphy T.L., Toumanen E., Murphy K.M. (1996). Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD-4-dependent pathway. *Infect Immun.*, 64: 1906-1912.
- Corbellini V. A., Scroferneker M. L., Carissimi M., Santolin L.D.(2006). Delayed-type hypersensitivity response to crude and fractionated antigens from *Fonsecaea pedrosoi* CMMI 1 grow in different culture media. *Mycopathologia*, 162(1): 51-55.
- Cunha M.M.L., Franzen A.J., Seabra S.H., Herbst M.H., Vugman N.V., Borba L.P., Souza W., Rozental S. (2010). Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radical. *BMC Microbiol.* 10: 80.
- Dafaveri J., Graybill J. R.(1990). Treatment of chronic murine chromoblastomycosis with the triazole SCH39304. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 42(6): 601-606.
- D'Ávila S.C.G. P., Pagliari C., Duarte M. I. S.(2002). The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of Chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia*, 156(2):51-60.
- Dennehy K.M. & Brown G.D.(2007). The role of the β -glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 82: 253-258.
- Esterre P., Jahevitra M., Andriantsimahavandy A. (2000). Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(3):497-500.
- EMUCS (2010). Acesso em 24.02.11. Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter9.htm>
- Farbiarz S. R., de Carvalho T. V., Alviano C., de Souza W.(1992). Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *J. Med. Vet. Micol*, 30(4):265-273.
- Figueiredo R.T., Fernandez P.L., Dutra F.F., González Y., Lopes L.C., Bittencourt V.C.B., Sasaki G.L., Barreto-Bergter E., Bozza M.T. (2010). TLR4 recognizes *Pseudallescheria boydii* conidia and purified rhamnmannans. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52):40714-723.
- Fuchs J., Pecher S. (1992). Partial suppression of cell mediated immunity in chromoblastomycosis. *Mycopathologia*, 119(2):73-76.
- Genecards. Acesso em 26.01.10. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NKRF>.

Ghosh S., May M.J., Kopp E.B. (1998). NF- κ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.*, 16: 225-60.

Gimenes V. M. F., Souza M. G., Ferreira K. S., Marques S. G., Gonçalves A. G., Santos D. V. C. L., Pedroso e Silva C.M., Almeida S. R. (2005). Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes and Infection*, 7(4):708-713.

Gimenes V. M. F., Criado P. R., Martins J. E. C., Almeida S. R. (2006). Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. *Mycopathologia*, 162 (2): 97-101.

Goodridge H.S., Wolf A.J., Underhill D.M. (2009). β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunological Reviews*, 230: 38-50.

Green L. C., Wagner D. A., Ruiz de Luzureaga K., Istfan N., Young V.R., Tannenbaum S. R. (1981). Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 78 (12): 7764-68.

Harjanto D, Zaman MH.(2010). Computational study of proteolysis-driven single cell migration in a three-dimensional matrix. *Ann Biomed Eng.*, 38(5):1815-25.

Hayakawa M., Ghosn E. E. B., Teixeira de Sousa M. G., Ferreira K. S., Almeida S. R. (2006). Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous fungi that causes chromoblastomycosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(4):382-387.

Howard R. J., Ferrari M. A., Roach D. H., Money N. P. (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24):11281-284.

Hysamen C., Brown G.D. (2009). The fungal pattern recognition receptor, Dectin-1, and the associated cluster of C-type lectin-like receptors. *FEMS Federation of European Microbiological Societies*, 121-128.

Imazumi Y., Higai K., Suzuki C., Azuma Y., Matsumoto K. (2009). NKG2D and CD94 bind to multimeric α -2-3-linked N-acetylneuraminic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382: 604-608.

Jenner, R. and R. Young (2005) Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:281-294.

Jouault T., Iyata-Ombetta, Takeuchi O., Trinel P.A., Sacchetti P., Lefebvre P., Akira S., Poulain D. (2003). *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors. *J. Infect. Dis.* 188:165-172.

Kerrigan A.M., Dennehy K.M., Mourão-Sá D., Faro-Trindade I., Willment J.A., Taylor P.R., Eble J.A., Sousa C.R., Brown G.D. (2009). CLEC-2 Is a phagocytic activation receptor expressed on murine peripheral blood neutrophils. *The journal of Immunology*, 182: 4150-4157.

Klotz S.A., Pendrak M.L., Hein R.C. (2001). Antibodies to $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ integrins react with *Candida albicans* alcohol dehydrogenase. *Mycrobiology*, 147: 3159-3164.

Kurokawa C, S., Sugizaki M. F., Peraçoli M. T. S.(1998). Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 40(3):125-35.

Lacaz C.S., Porto E., Martins J. E. C., Melo N. T.(2002). Tratado de Micologia Médica. 9ª Edição. São Paulo: Sarvier, cap. 18, p. 451-458.

Lavigne L.M., O'Brein X.M., Kim M., Janowski J.W., Albina J.E., Reichner J.S. (2007) Integrin engagement mediated the human polymorphonuclear leucocyte response to a fungal pathogen-associated molecular pattern. *The Journal of Immunology*, 178:7276-7282.

Limongi C. L., Rozental S., Alviano C. S., de Souza W. (1997). The influence of surface carbohydrates on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with Chinese hamster ovary glycosylation mutant cells. *Mycopathologia*, 138(3):127-135.

Livak K.J, T.D Schmittgen. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta CT)$ Method. *Methods*. 25: 402-408.

Loures F.V., Pina A., Felonato M., Araújo F.E.F., Leite K.R.M., Calich V.L.G.(2010). Toll-Like Receptor 4 Signaling Leads to Severe Fungal Infection Associated with Enhanced Proinflammatory Immunity and Impaired Expansion of Regulatory T Cells. *J. Immunol*, 78: 1078-88.

Lupi O., Tyring S.K., McGinnis M.R. (2005). Tropical Dermatology: fungal tropical diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 53: 931-951.

MahreenA.(2010). Managing chromoblastomycosis. *Tropical Doctor*, 40: 65-67.

Marques S.G., Silva C. M. P., Saldanha P.C., Rezende M.A., Vicente V. A., Queiroz-Telles F., Costa J. M. L. (2006). Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the Babassu Coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. *Jpn J. Mycol*, 47(4):305-311.

Matte S. M. W., Lopes J. O., Melo I. S., Espadim L. E. R., Pinto M. S. (1997). Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(4):309-311.

Medzhitov R., Janeway Jr.C. (2000). Innate Immunity. *N. Engl. J. Med.*, 343: 338-44.

Mendes-Giannini M. J. S., Soares C. P., Silva J. L. M., Andreotti P. F. (2005). Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45: 383-94.

Minotto R., Bernardi C. D. V., Mallmann L. F., Edelweiss M. I. A., Scroferneker M. L. (2001). Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 44(4):585-592.

Mogensen T.H.(2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2): 240-73.

NCBI Entrez Gene. Acesso em 26.01.11. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Mm&CID=16234>.

Nimrichter L., Barreto-Bergter E., Mendonça-Filho R. R., Kneipp L. F., Mazzi M. T., Salve P., Farias S. E., Wait R., Alviano C. S., Rodrigues M. L. (2004). A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. *Microbes Infection*, 6(7):657-65.

Nóbrega Y.K.M., Lozano V.F., Araújo T.S., Carvalho D.D., Bocca A.L. (2010). The cell wall fraction from *Fonsecaea pedrosoi* stimulate production of different profiles of cytokines and nitric oxide by murine peritoneal cells in vitro. *Mycopathologia*, 170:89-98.

Ogawa M. M., Alchorne M. M. A., Barbieri A., Castiglioni M. V., Penna A. P. B., Tomimori-Yamashita J. (2003). Lymphoscintigraphic analysis in chromoblastomycosis. *International Journal of Dermatology*, 42(8):622-625.

Palaminos J.C., Armenteros J.A. (1974) Abscesses hipodermicos metastasicos em um caso de chromoblastomicose. *Ver. Sif. Leprol y Dermat.*, 4:63-71.

Palsson-McDermott E.M., O'Neil L.A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113: 153-162.

Paniz-Mandolfi A.E., COLLELLA M.T., NEGRÍN D.C., ARANZAZU N., OLIVER M., REYES-JAIMES O., PÉREZ-ALVAREZ A.M. (2008). Extensive chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* successfully treated with a combination of amphotericin B and itraconazole. *Med Mycol*, 46(2): 179-184.

Patial S., Saini Y., Lee T., Packiriswamy N., Appledom D.M., Lapres J.J., Amalfitano A. G-protein coupled receptor kinase 5 mediates lipopolysaccharide-induced NFκB activation in primary macrophages and modulates inflammation *in vivo* in mice. *J Cell Physiol*. 226(5): 1323-33.

Queiroz Filho F. A.(1997). Cromoblastomicose no estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(4): 345-346.

Rappleye C. A., Goldman W. E. (2006). Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60: 281-303.

Rappleye C. A., Eissenberg L. G., Goldman W. E.(2007). *Histoplasma capsulatum* α-(1-3)-glucan blocks innate immune recognition by the β-glucan receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 4 (104),: 1366-70.

- Ricard-Blum S., Hartmann D. J., Esterre P. (1998). Monitoring of extracellular matrix metabolism and cross-linking in tissue, serum and urine of patients with chromoblastomycosis, a chronic skin fibrosis. *European Journal of Clinical Investigation*, 28(9):748-54.
- Roeder T., Kirschning C.J., Rupec R.A., Schaller M., Weindl G., Korting H.C. (2004). Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol.*, 42(6):485-98.
- Rosen T., Overholt M. (1996). Persistent viability of the Medlar body. *Int. J. Dermatol.*, 35(2):96-8.
- Rozental S., Alviano C. S., de Souza W. (1994). The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia*, 126(2):85-91.
- Sá-Nunes A., Medeiros A. I., Faccioli L. H. (2004). Interleukin-5 mediates peritoneal eosinophilia induced by the F1 cell wall fraction of *Histoplasma capsulatum*. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, 37(3):343-6.
- Saijo S., Fujikado N., Furuta T., Chung S., Kotaki H., Seki K., Sudo K., Akira S., Adachi Y., Ohno N., Kinjo T., Nakamura K., Kawakami K., Iwakura Y. (2007). Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature Immunology*, 8(1): 34-46.
- Salgado C.G., Silva J.P., Diniz J.A.P., Silva M.B., Costa P.F., Teixeira C., Salgado U.I. (2004). Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 46(1): 33-36.
- Salgado C.G. (2010). Fungal x host interactions in chromoblastomycosis. What we have learned from animal models and what is yet to be solved. *Virulence*, 1(1): 3-5.
- Sanche S.E., Sutton D.A., Rinaldi M.G. (2003). Dematiaceous fungi. In: Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A., eds. *Clinical Mycology*, 325-351.
- Santos A.L., Palmeira V.F., Rozental S., Kneipp L.F., Nimrichter L., Alviano D.S., Rodrigues M.L., Alviano C.S. (2007). Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31(5):570-91.
- Sato M, Sano H, Iwaki D, et al. (2003). Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J. Immunol.* 171(1):417-25.
- Scott P. (1989). The role of Th1 and Th2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.*, 68(3):369-72.
- Shaw D. R., Griffin F. M. (1981). Antibody-independent phagocytosis. In Adams D. O., Elson P. J., Koren H (eds). *Methods for studying mononuclear phagocytes*. London: Academic Press.

- Shima M., Teitelbaum S.L., Holers V.W., Ruzicka C., Osmack P., Ross F.P. (1995). Macrophage-colony-stimulating factor regulates expression of the integrins alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 by murine bone marrow macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92(11):5179-83.
- Shoham S., Huang C., Chen J.M., Golenbock D.T., Levitz S.M. (2001). Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J. Immunol.*, 166:4620-26.
- Silva C. L.; Fazioli R. A.(1985). Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *Journal Med. Microbiol.*, 20(3):299-305.
- Silva J. P., Alviano D. S., Alviano C. S., Souza W., Travassos L. R., Diniz J. A. P., Rozental S. (2002). Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 33(1):63-69.
- Silva J. P., Souza W., Rozental S. (1999) Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia*, 143(3):171-5.
- Silva S.S., Tavares A.H.F.P., Passos-Silva D.G., Fachin A.L., Teixeira S M.R., Soares C.M.A., Carvalho M.J.A., Bocca A.L., Silva-Pereira I., Passos G.A.S., Felipe M.S.S.(2007). Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasilienses* yeast cells. *Microbes and Infection*, 10:12-20.
- Sobanov Y., Bernreiter A., Derdak S., Mechtcheriakova D., Schweighofer B., Duchler M., Kalthoff F., Hofer E. (2001). A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocytic, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex. *Eur. J. Immunol.*, 31: 3493-3503.
- Sotto M. N., De Brito T., Silva A. M. G., Vidal M., Castro L. G. M. (2004). Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *J. Cutan Pathol.*, 31(1):14-18.
- Staudt LM and Brown PO (2000). Genomic views of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 18:829-59.
- Steen, B.R., Zuyderduyn, S., Toffaletti, D.L., Marra, M., Jonas, S.J., Perfect, J.R. and Kronstad, J. (2003). *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. *Eukaryot Cell* 2(6): 1336-49.
- Steevels T.A.M. and Meyaard L. (2011). Immune inhibitory receptors: Essential regulators of phagocyte function. *European Journal of Immunology* 41(3): 575-587.
- Suzuki-Inoue K., Fuller G.L., Garcia A. *et al* (2006). A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood*, 107:542-49.

Szanişzlo P. J., Cooper B. H., Voges H. S.(1972). Chemical compositions of the hyphal walls of three chromomycosis agents. *Sabouraudia*, 10(1): 94-102.

Tada H., Nemoto E., Shimauchi H., Watanabe T., Mikami T., Matsumoto T., Ohno N., Tamura H., Shibata K., Akashi S., Miyake K., Sugawara S., Takada H. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol. Immunol.*, 46: 503-12.

Tavares A.H.F.P., Silva S.S., Dantas A., Campos E.G., Andrade R.V., Maranhão A.Q., Brígido M.M., Passos-Silva D.G., Fachin A.L., Teixeira S.M.R., Passos G.A.S., Soares C.M.A., Bocca A.L., Carvalho M.J.A., Silva-Pereira I., Felipe M.S.S.(2007). Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophage. *Microbes and Infections*, 9:583-90.

Taylor P. R., Tsoni S. V., Willment J. A., Dennehy K. M., Rosas M., Findom H., Haynes K., Steele C., Botto M., Gordon S., Brown G. D.(2007). Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.*,8(1): 31-8.

Teixeira de Sousa M. G., Ghosn E. E. B., Almeida S. R. (2006). Absence of CD4⁺ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(6):595-600.

Tsikitis V.L., Morin N.A., Harrington E.O., Albina J.E., Reichner J.S.(2004). The lectin-like domain of complement receptor 3 protects endothelial barrier function from activated neutrophils. *J. Immunol.*, 173: 1284-1291.

Ulecitch R.J., Tobias P.S. (1995). Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol.*, 13: 437-457.b

Vetvicka V.B., Thornton B.P., Ross G.D. (1996). Soluble β -glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonised target cells. *J. Clin. Invest.*, 98: 50-61.

Viriyakosol S., Fierer J., Brown G.D., Kirkland T.N. (2005). Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun.*, 73(3):1553-60.

West A.P., Koblansky A.A, Ghosh S. (2006). Recognition and Signaling by Toll-like receptors. *Ann. Cell. Dev. Biol*, 22:409-437.

Williams M.A., Solomkin J.S. (1999). Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J. Leucocyte Biol*. 65: 725-736.

Wilson J. W.(1961). Therapy of systemic fungus infections. *Arch. Interm. Med.*, 108:292-316.

Yokoyama W.M., Plougasted B.F.M. (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex, *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 304-315.

Yowe, D., W. Cook and J. Gutierrez-Ramos (2001) Microarrays for studying the host transcriptional response to microbial infection and for the identification of host drug targets. *Microbes Infect.*3:813-821.

8. Anexos

8.1. Anexo I – Tabelas com valores de *fold-change* dos experimentos realizados em RT-PCR em tempo real

Tabela 3 – Níveis de expressão do gene *Itga5* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Condição estudada	Macrófago +	Macrófago +	Macrófago +
Cinética de tempo	conídio	F1	F2
30 min	-2,63 (±0,087)	-1,19 (±0,200)	-1,66 (±0,103)
1h	-2,63 (±0,060)	-4,0 (±0,011)	-2,43 (±0,215)
3h	-1,35 (±0,060)	2,93 (±0,500)	2,37 (±0,033)
6h	1,00 (±0,052)	4,48 (±0,021)	1,73 (±0,076)
24h	1,07 (±0,001)	1,97 (±0,063)	0,97 (±0,072)

Tabela 4 - Níveis de expressão do gene *Clec2* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Condição estudada	Macrófago +	Macrófago +	Macrófago +
Cinética de tempo	conídio	F1	F2
30 min	-3,12 (±0,093)	-3,33 (±0,046)	19,1 (±0,036)
1h	-5,88 (±0,093)	-25,0 (±0,070)	-10,0 (±0,217)
3h	-5,0 (±0,035)	-10,0 (±0,207)	4,46 (±0,080)
6h	-1,33 (±0,101)	1,86 (±0,064)	77,1 (±0,047)
24h	1,32 (±0,098)	-1,28 (±0,091)	10,1 (±0,055)

Tabela 5 - Níveis de expressão do gene *Cd14* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Condição estudada	Macrófago +	Macrófago +	Macrófago +
Cinética de tempo	conídio	F1	F2
30 min	-1,96 (±0,074)	1,12 (±0,200)	-1,49 (±0,085)
1h	-9,99 (±0,080)	1,15 (±0,041)	-1,20 (±0,007)
3h	1,82 (±0,080)	3,04 (±0,053)	-1,85 (±0,015)
6h	3,05 (±0,237)	35,5 (±0,200)	1,06 (±0,098)
24h	2,21 (±0,018)	8,61 (±0,012)	1,38 (±0,179)

Tabela 6 - Níveis de expressão do gene *Tlr2* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Condição estudada	Macrófago + conídio	Macrófago + F1	Macrófago + F2
Cinética de tempo			
30 min	-1,66 (±0,043)	-7,69 (±0,049)	-5,0 (±0,185)
1h	-5,88 (±0,105)	-2,38 (±0,099)	-3,33 (±0,215)
3h	1,03 (±0,106)	1,50 (±0,043)	-3,44 (±0,015)
6h	5,10 (±0,066)	21,8 (±0,068)	Indetectável
24h	-2,08 (±0,010)	1,74 (±0,053)	5,08 (±0,200)

Tabela 7 - Níveis de expressão do gene *Tlr4* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Condição estudada	Macrófago + conídio	Macrófago + F1	Macrófago + F2
Cinética de tempo			
30 min	2,34 (±0,103)	-1,25 (±0,031)	1,95 (±0,062)
1h	-2,56 (±0,130)	-1,51 (±0,003)	1,75 (±0,048)
3h	-3,12 (±0,097)	-1,88 (±0,079)	1,08 (±0,135)
6h	-2,63 (±0,055)	1,12 (±0,051)	1,32 (±0,068)
24h	-1,35 (±0,099)	1,02 (±0,070)	2,46 (±0,159)

Tabela 8 – Níveis de expressão do gene *Myd88* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Condição estudada	Macrófago + conídio	Macrófago + F1	Macrófago + F2
Cinética de tempo			
30 min	2,03 (±0,091)	-3,70 (±0,129)	-6,66 (±0,146)
1h	-1,16 (±0,078)	-1,40 (±0,100)	-3,44 (±0,120)
3h	3,68 (±0,070)	2,26 (±0,311)	-6,25 (±0,015)
6h	-3,22 (±0,076)	-2,04 (±0,051)	Indetectável
24h	13,84 (±0,200)	35,5 (±0,109)	Indetectável

Tabela 9 - Níveis de expressão do gene *Nfkb* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Condição estudada	Macrófago + conídio	Macrófago + F1	Macrófago + F2
Cinética de tempo			
30 min	-125,0 (±0,113)	1,76 (±0,125)	2,95 (±0,110)
1h	-3,57 (±0,034)	-3,44 (±0,028)	-4,54 (±0,194)
3h	-4,34 (±0,034)	-2,17 (±0,135)	-1,08 (±0,058)
6h	-1,56 (±0,049)	4,53 (±0,062)	6,80 (±0,078)
24h	-2,27 (±0,066)	1,40 (±0,163)	1,62 (±0,094)

Tabela 10 - Níveis de expressão do gene *Nkrf* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Condição estudada	Macrófago + conídio	Macrófago + F1	Macrófago + F2
Cinética de tempo			
30 min	48,0 (±0,113)	1,39 (±0,044)	27,6 (±0,053)
1h	-1,33 (±0,028)	-1,28 (±0,071)	8,75 (±0,085)
3h	-16,6 (±0,028)	-7,69 (±0,015)	1,62 (±0,154)
6h	-250,0 (±0,077)	-50,0 (±0,084)	-2,85 (±0,081)
24h	-12,5 (±0,081)	-9,09 (±0,140)	1,77 (±0,120)

Tabela 11 - Níveis de expressão do gene *Tnf- α* de macrófagos nas diferentes condições experimentais

Condição estudada	Macrófago + conídio	Macrófago + F1	Macrófago + F2
Cinética de tempo			
30 min	-1,78 (±0,059)	2,26 (±0,106)	2,49 (±0,130)
1h	2,14 (±0,096)	-1,06 (±0,015)	2,11 (±0,088)
3h	-1,81 (±0,052)	-3,33 (±0,026)	2,85 (±0,069)
6h	1,31 (±0,071)	3,09 (±0,067)	7,52 (±0,108)
24h	-2,56 (±0,052)	-1,47 (±0,053)	1,60 (±0,092)

8.2. Anexo II – Produção Científica

8.2.1. Artigo completo publicado

The Cell Wall Fraction from *Fonsecaea pedrosoi* Stimulates Production of Different Profiles of Cytokines and Nitric Oxide by Murine Peritoneal Cells In Vitro

Yanna Karla de Medeiros Nóbrega ·
Viviane Furlan Lozano · Tarciane Silva de Araújo ·
Daniel Diniz de Carvalho · Anamélia Lorenzetti Bocca

Received: 11 November 2009 / Accepted: 10 March 2010 / Published online: 30 March 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract Chromoblastomycosis is a chronic, suppurative and granulomatous mycosis whose main etiologic agent is the fungus *Fonsecaea pedrosoi*. The severity of chromoblastomycosis clinical manifestations correlates with the Th1 or Th2 immune response, and an efficient cellular immune response depends on the interaction between immune cells and the cell wall of the fungi, which is able to promote this activation. The objective of this study was to analyze the influence of cell wall fractions of *Fonsecaea pedrosoi* on the activation of peritoneal phagocytes obtained from mice. Our results revealed that after 4 h of inoculation with fungal cell wall components, there was a cell migration predominantly comprised of neutrophils followed, after 72 h, by migration of the macrophages. After 4 h, the F2 fraction caused increased production of nitric oxide in phagocytes, but this effect was not observed in the phagocytes after 72 h. The F1 fraction stimulated production of IL-12 in cells that migrated after 72 h,

while the inactivated fungus and the F2 fraction led to production of IL-10. The F2 fraction decreased the rate of phagocytosis and increased the production of IL-10. Our results suggest that the F2 fraction and its components caused an important disruption of microbicidal mechanisms negatively modulating the immune response and favoring the persistence of the fungus.

Keywords Chromoblastomycosis · Melanin · *Fonsecaea pedrosoi* · α -1-3-glucan · β -1-3-glucan · Macrophages · Neutrophils · Nitric oxide and cytokines

Introduction

Chromoblastomycosis is a chronic granulomatous fungal infection usually observed in the skin and subcutaneous tissue. It is caused by various dematiaceous fungi, among which *Fonsecaea pedrosoi* is the major causative agent in Brazil [1, 2]. The natural niche of *F. pedrosoi* is the soil, rotten wood and decomposing plant material [3].

Dematiaceous pathogenic fungi form dark polymeric pigments, generally referred to as melanin, which are stored in intracellular vesicles called melanosomes [4] and deposited on the fungal cell wall [5]. As described for similar pathogens, *F. pedrosoi* cell constituents are related to virulence [5] in that the lipids and cell wall

Y. K. de Medeiros Nóbrega · V. F. Lozano
Molecular Pathology Post-graduated Program,
Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília,
DF CEP 70910-900, Brazil

T. S. de Araújo · D. D. de Carvalho · A. L. Bocca (✉)
Department of Cellular Biology, Institute of Biology,
University of Brasília, Brasília, DF CEP 70910-900,
Brazil
e-mail: albocca@unb.br

polysaccharides are responsible for the formation of granulomas [6], and other components can reduce the effectiveness of cell-mediated response [7].

The granulomas in chromoblastomycosis are mostly of the tuberculoid type, which is an infiltrate of chronic inflammatory cells with sclerotic bodies inside giant cells or free in intradermal micro-abscesses and hyphal segments. This lesion is accompanied by extensive and progressive dermal fibrosis [8]. The onset of disease depends on host resistance and fungal virulence. In the course of infection, the fungus comes into contact with phagocytes such as macrophages and neutrophils, which play an important role in the host response [5, 9, 10].

Macrophages are considered fungistatic only if activated; otherwise, they fail to kill ingested fungal cells [9, 10]. Although damage to or death of fungal cells is rarely observed, the interaction between *F. pedrosoi* and activated macrophages induces an oxidative burst [10]. However, peritoneal macrophages from infected mice are unable to produce NO, and macrophages from non-infected mice incubated in vitro with the fungus produce low levels of nitric oxide [7]. Neutrophils can kill *F. pedrosoi*; their extracellular cytotoxicity is marked by an oxidative burst and peroxidative activity is observed, suggesting a synergetic effect of myeloperoxidase production and a respiratory burst, which explains the differences in effectiveness between neutrophils and macrophages in killing the fungus [11].

Fungal persistence and multiplication are related to an inhibition of the Th1 response and an exacerbated Th2 response as a consequence of several host- and pathogen-related factors. Patients with a severe form of the disease produce interleukin (IL)-10 and low levels of interferon gamma (IFN- γ) and display an inefficient proliferation of T cells. Patients with a mild form of the disease, in contrast, produce high levels of IFN- γ , low levels of IL-10 and a powerful T-cell proliferative response. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) production is the same in all patients analyzed [12, 13]. Antifungal therapy does not improve the cellular immune response [14].

Fungal persistence in chromoblastomycosis is associated with the continuous release of cell wall components, which provide a specific stimulus to the development of sustained granulomatous lesions and to constant cell migration to the inflammation site. Different components of *F. pedrosoi* cells such as lipids and cell wall polysaccharides have been

implicated in granuloma formation in chromoblastomycosis [15, 16]. The polysaccharides present in the cell wall of several fungi including *Fonsecaea pedrosoi* can be separated into three fractions. The F1 fraction consists predominantly of β -1-3-glucan and chitin; the fraction F2 is mainly composed of α -1-3-glucan and melanin; and the F3 fraction is composed of galactomannan and most proteins [15, 17–19]. Melanin also influences the course of the disease; its presence correlates with virulence in different microorganisms, such as *Cryptococcus neoformans* [20] and *Paracoccidioides brasiliensis* [21], and appears to contribute to virulence by enhancing the resistance of fungal cells to attack by host immune cells [22].

Considering the importance of cell wall components in granuloma formation and the inability of macrophages to kill the fungus upon internalization, the objective of this study was to evaluate phagocyte activation by different cell wall fractions of *F. pedrosoi* to establish a correlation between these components and pathogenesis.

Materials and Methods

Fungal Strain and Culture

An isolate of *Fonsecaea pedrosoi* was obtained from a patient with chromoblastomycosis and was maintained in the Mycology Laboratory of University Hospital in Brasília -Brazil (HUB/UnB). The strain was cultured at 37°C for 14 days in Sabouraud medium before being used for conidia and hyphae forms. The conidia and hyphae fragments were scraped from the surface in phosphate-buffered saline (PBS), vortexed to detach conidia, and the heavier debris was allowed to settle for 10 min. Fungus cells were quantified with a hemocytometer, and suspensions containing 1×10^6 conidia ml⁻¹ were prepared and killed with heat for 20 min at 120°C.

Cell Wall Fractions

Fraction F1

The mycelia was inactivated with 5% formaldehyde for 24 h, filtered onto tissue paper, washed 3 times with

distilled water and dried at room temperature. Then, the material was frozen with liquid nitrogen to rupture the cells of the fungus, diluted in distilled water and centrifuged 5 times at $2,000\times g$ to remove cells debris. The cell wall was then subjected to lipid extraction with chloroform:methanol (2:1 v/v) as described previously by Silva and Fazioli [15]. The lipid-free wall material was extracted with alkali for 4 h, as described by Kanetsuna et al. [23]. Briefly, the material was suspended in 10 mg/ml 1 N NaOH and gently stirred at room temperature for 1 h. After centrifugation at $5,000\times g$ for 10 min, the supernatant was collected, the procedure was repeated four times and all the supernatants were combined. The alkali-insoluble precipitate was washed with water until it reached pH 7.0, and then sequentially with ethanol, acetone and diethyl ether (v/v/v). The resulting white powder was called fraction F1. The amounts of F1 used in these experiments were based on our previous results of migration kinetics experiments (data not shown). The F1 concentration that induced a total leukocytes migration similar to that of thioglycolate was 300 $\mu\text{g/ml}$ solution in phosphate buffer (PBS) and was inoculated 1.5 ml into the peritoneal cavity of the animals.

Fraction 2

The supernatant of fraction F1 was neutralized by the addition of chloridric acid (HCl 1 M). The precipitate containing the pigment was centrifuged at $5,000\times g$ for 10 min at 4°C and washed three times with distilled water. The insoluble pigment was diluted in 0.1 M HCl and centrifuged repeatedly at $10,000\times g$, until the supernatant was colorless, to remove cell debris. The precipitate was collected, resuspended in water, dialyzed against distilled water [24], forming a fraction F2 (alkali-soluble, acid precipitable) that is liquid. The amounts of F2 used in these experiments were defined on our previous results of migration kinetics experiments (data not shown). The F2 concentration that induced a total leukocytes migration similar to that of thioglycolate was 1.5 ml of a 1:10 solution of F2 fraction in phosphate buffer (PBS) that was inoculated into the peritoneal cavity of the animals.

Animals

Swiss mice, 8 weeks old with food and water ad libidum, were used in all experiments. The project

was reviewed by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Brasilia. The mice were divided into 8 groups of 5 animals each, which were inoculated with 1.5 ml of each of the solutions, according to the group. After 4 (groups 1–4) or 72 h (groups 5–8), the animals were bled and peritoneal cells were collected. Groups 1 and 5 received thioglycolate (3%), groups 2 and 6 received inactivated fungus (1×10^6 fungi cells/ml), groups 3 and 7 received fraction F1 (300 $\mu\text{g/ml}$) and groups 4 and 8 received fraction F2 (1:10). The experiments were carried out in duplicate.

Cell Culture

Treatment-elicited cells were obtained as reported previously. A peritoneal lavage was performed 4 or 72 h after treatment using 10 ml of cold phosphate buffer. The resulting suspension was pelleted at 4°C for 10 min at approximately $300\times g$ and the supernatant removed. The cells were resuspended in RPMI 1,640 containing 2 mM L-glutamine, 12.5 units/ml penicillin and 6.25 mg/ml streptomycin at 3×10^6 cells/ml. One hundred microliters of the cell suspension was plated in a flat-bottom 96-well microtiter plate onto appropriate plastic tissue culture wells, incubated for 30 min at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 , washed three times with PBS to remove non-adherent cells and cultured with fresh medium containing 5% fetal calf serum (FCS). The cultured cells were treated with 100 U/ml interferon gamma (IFN- γ) (Gibco BRL, 1100057, USA) and 1 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS) (Sigma–Aldrich, USA). After 24 h, supernatants were collected and centrifuged at $350\times g$ for 10 min and then stored at -70°C until they were assayed for cytokines and NO.

Citologic Analyses of Leukocytes in the Peritoneal Lavage Fluid

Cells from the peritoneal space of animals of different groups were harvested by peritoneal lavage as described in Cell culture. Before pellet being resuspended in RPMI, 10 μl was used to smear prepared on 1% BSA/PBS-coated slides. The cells were air-dried, fixed with methanol and stained with Giemsa. Differential cell counts were performed under oil immersion microscopy. A total of 400 cells were counted and classified as lymphocytes,

macrophages or neutrophils based on morphological criteria.

Phagocytic Index

Peritoneal macrophages (1.5×10^5) from *F. pedrosoi* infected or non-infected mice adhered onto 24-well plates were incubated with a suspension of *Saccharomyces cerevisiae* (3×10^6 cells/well) in the presence of 10% fresh mouse serum for 30 min in an atmosphere of 5% CO₂ in air. Afterward, the cells were rinsed with RPMI 1,640 medium to remove non-phagocytosed yeast, fixed with absolute methanol and stained with 20% buffered Giemsa solution. The number of attached and/or ingested yeast cells per 200 macrophages in duplicate preparations was microscopically evaluated. The phagocytic index was calculated by the average number of yeasts ingested by macrophages multiplied by the percentage of these cells engaged in phagocytosis.

Evaluation of Production of Nitric Oxide

Nitric oxide (NO) was indirectly evaluated through the release of nitrite (NO₂⁻) into culture supernatants of peritoneal cells by the microplate Griess assay, as previously described [25]. Thioglycolate-elicited phagocytes (3×10^5) obtained after 4 or 72 h from normal mice were incubated with melanin diluted in RPMI 1,640 medium for 24 h in a humidified incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ plus air in the presence or absence of IFN- γ (100 U/ml) and LPS (1 μ g/ml). The presence of NO₂⁻ in the supernatants was determined by the microplate Griess assay in an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) microplate reader with a 450 nm filter.

Cytokines

The cytokines produced by peritoneal cells were tested by ELISA. The supernatants of cell cultures were collected and the presence of TNF- α , IL-10 and IL-12 were assayed per the manufacturer's recommendations (BD Biosciences Pharmigen, USA). The concentrations of cytokines were determined using standard curves with serial dilutions of TNF- α , IL-10 and IL-12 and expressed in pg/ml. The curve for TNF- α ranged from 15.6 to 1,000 pg/ml, the IL-10

curve was 31.3 to 2,000 pg/ml and IL-12 curve ranged from 62.5 to 4,000 pg/ml (BD Biosciences Pharmigen, USA).

Statistical Analysis

Differences between control and experimental groups were analyzed by ANOVA, followed by the Bonferroni *t*-test. A probability lower than 0.05 was considered significant.

Results

Influence of *F. pedrosoi* Cell Wall Components on Leukocyte Migration to the Murine Peritoneum

Four hours after addition of the stimulating agent, most leukocytes that migrated to the peritoneum in all groups were neutrophils (88% of all leukocytes in the thioglycolate group; dead fungus, 65%; F1 fraction, 80%; F2 fraction, 60%). After 72 h, we observed that the dead fungus and the F2 fraction predominantly induced lymphocyte migration (80 and 60%, respectively), whereas the F1 fraction mainly attracted macrophages (59%) (Fig. 1). These differences in the late stages of the migratory response influence the inflammatory pattern displayed by the tissue.

Influence of *F. pedrosoi* Cell Wall Components on Nitric Oxide Production

The in vitro adherent cells of the group stimulated with the F2 fraction for 4 h produced nitric oxide both in the presence and in the absence of IFN- γ and LPS. The cells from other groups produced less NO than those from controls (thioglycolate). At 72 h, this compound was not induced in the cells of any group relative to controls; this lack of response was unchanged with in vitro stimulation with IFN- γ or LPS, with the exception of the F2 fraction group, whose NO production was lower than that of the controls under the same conditions (Fig. 2). These results suggest that only the F2 fraction can influence nitric oxide synthesis by neutrophils, but that it cannot evoke the same response in macrophages.

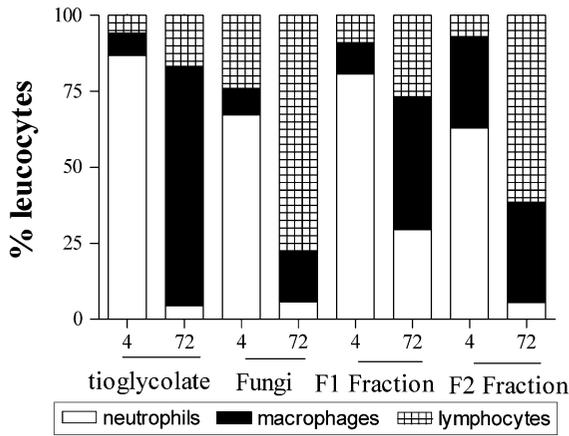


Fig. 1 Kinetics of cellular migration. The cells that migrated to the peritoneal cavity were evaluated after 4 or 72 h of stimulation with thioglycolate, heat-killed fungi, F1 or F2 fractions. Leukocytes were fixed with methanol and stained with Giemsa. The classification of leukocytes (neutrophils, lymphocytes and macrophages) was based on morphological criteria. The results are representative of two independent experiments

Influence of *F. pedrosoi* Cell Wall Compounds on the Production of TNF- α , IL-12 and IL-10

Upon assessment of the cell populations that migrated to the peritoneum after stimulation, cells were cultured in vitro for cytokine profiling; tumor necrosis factor alpha and interleukins 10 and 12 were measured. The F1 fraction stimulated TNF- α production only by phagocytes that had migrated after 4 h, but dead fungus was able to evoke this response in

phagocytes from the 72-h time point (Fig. 3). This demonstrates that TNF- α production, which is observed in the course of this infection, is sustained by different cell populations in contact with the fungal cell wall. Interleukins were measured at the 72-h time point. As seen in Fig. 4, the F1 fraction stimulated IL-12, while dead fungus and the F2 fraction evoked IL-10 production.

Influence of the F2 Fraction on the Phagocytic Index

In order to assess how the F2 fraction influenced phagocytes that had migrated after 4 or 72 h of stimulation with thioglycolate, we analyzed the phagocytic index (PI) of these cells in the presence of this fraction in vitro (Fig. 5). The F2 fraction decreased the PI in both groups. It changed from 325 to 160 at the 4-h time point and from 230 to 156 at the 72-h time point. These trends were reversible by addition of IFN- γ and LPS to the culture. PI reduction was a direct consequence of the lower number of phagocytes sensitive to the F2 fraction and not of the average number of yeast cells ingested by them (data not shown).

Influence of the F2 Fraction on Cytokine and Nitric Oxide Production

In order to evaluate the influence of the F2 fraction on the activation of phagocytes that had migrated to the

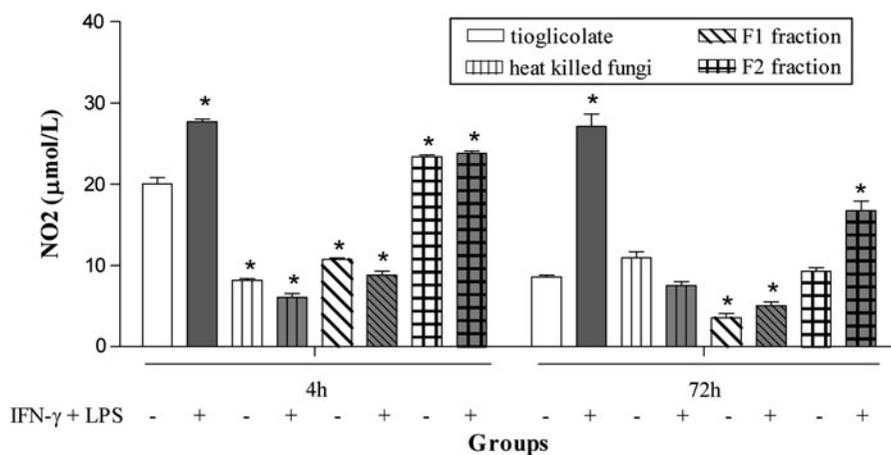


Fig. 2 Nitric oxide production in the supernatant of cultures of peritoneal cells obtained after 4 and 72 h of stimulation with fungal cell wall components. Cells were incubated for 24 h in RPMI medium with or without IFN- γ /LPS, and supernatants

were tested for the presence of (NO₂⁻) (Griess). The results are representative of two independent experiments. * $P < 0.05$ relative to the control group (thioglycolate stimulation)

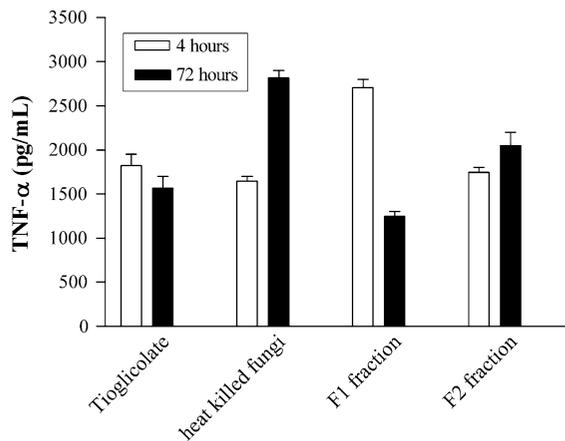


Fig. 3 TNF- α production, as measured in the supernatant of peritoneal cell culture. Cells were incubated for 24 h in RPMI medium and quantification was by ELISA as described previously. The results are representative of two independent experiments. * $P < 0.05$ relative to the control group (thioglycolate stimulation)

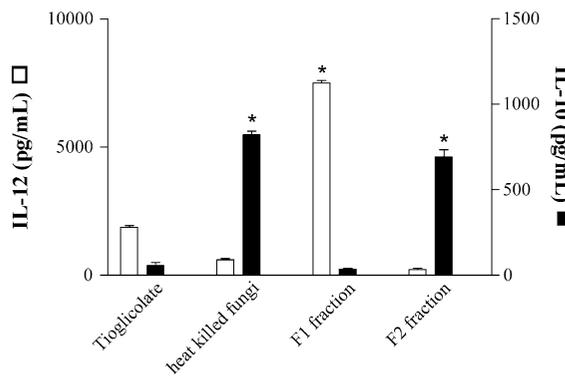


Fig. 4 IL-10 and IL-12 production, as measured in the supernatant of peritoneal cell culture. Cells were incubated for 24 h in RPMI medium and quantification was by ELISA as described previously. The results are representative of two independent experiments. * $P < 0.05$ relative to the control group (thioglycolate stimulation)

peritoneum upon stimulation with thioglycolate for 4 or 72 h, we analyzed for the presence of NO and cytokines in the supernatant of cultures generated from these cells (Fig. 6). The F2 fraction stimulated NO production at the 4-h time point, but this could not be enhanced by adding IFN- γ or LPS. Conversely, NO could not be evoked by either the F2 fraction or IFN- γ /LPS at the 72-h time point. As for interleukins, the IL-12 levels produced in response to IFN- γ and LPS were inhibited by the presence of the F2 fraction. In contrast, the F2 fraction increased

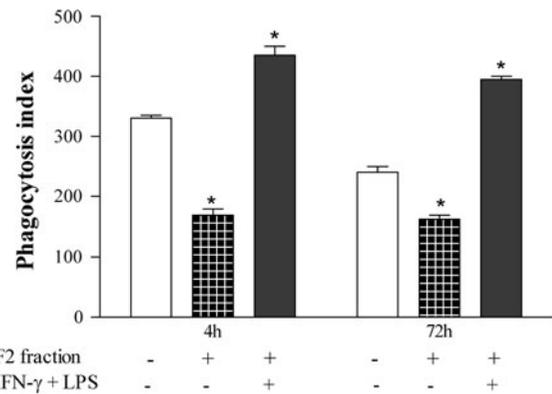


Fig. 5 Measurement of the phagocytic index. Cells were cultured for 48 h, in the first 24, either with or without the F2 fraction, followed by 24 h with or without IFN- γ /LPS. *Saccharomyces cerevisiae* cells were then added for phagocytic index measurement. * $P < 0.05$ relative to the group that was not stimulated with the F2 fraction

IL-10 production, both spontaneous and IFN- γ /LPS-induced (Fig. 7). These effects of the F2 fraction on IL-10 and IL-12 are in agreement with the type of immune response observed in the course of the disease.

Discussion

Host resistance to fungal infection depends on the establishment of effective cellular immunity. The Th1 immune response is described as the most efficient for the clearance of *Histoplasma capsulatum* [26], *Cryptococcus neoformans* [27], *Paracoccidioides brasiliensis* [28, 29], *Candida albicans* [30], *Aspergillus fumigatus* [31], *Fonsecaea pedrosoi* [5] and others.

The cellular immune response occurs upon activation of innate immune cells such as phagocytes, which, besides possessing their own microbicidal mechanisms, contribute to antibody production and modulate the later development of the adaptive immune response by antigen presentation to CD4⁺ T cells, cytokine production and expression of co-stimulatory molecules [5, 12, 32, 33].

For phagocytes to be activated and carry out their microbicidal functions, a crucial step that is conducive to the pathogenesis of chromoblastomycosis is the adhesion and internalization of the pathogen for destruction, which may or may not be dependent on

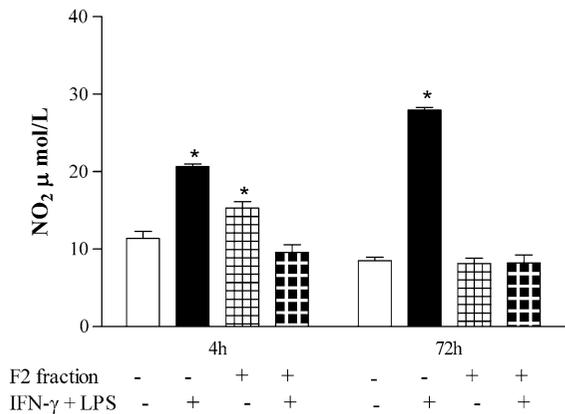


Fig. 6 Nitric oxide production in the supernatant of cultures of peritoneal cells obtained after 4 and 72 h of stimulation with thioglycolate. The cells were cultured for 48 h, in the first 24, either with or without the F2 fraction, followed by 24 h with or without IFN- γ /LPS. The supernatants were tested for the presence of NO₂⁻ (Griess). The results are representative of two independent experiments. * $P < 0.05$ relative to the control group (group not stimulated with the F2 fraction)

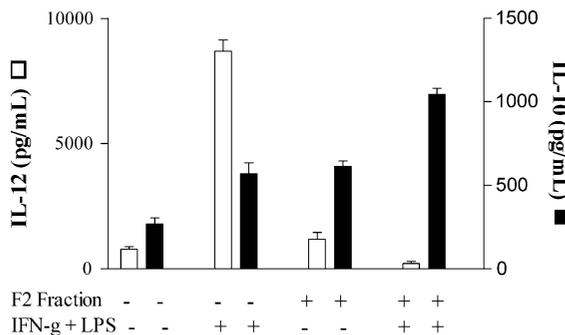


Fig. 7 IL-10 and IL-12 production. Cells were cultivated as in Fig. 5 and supernatants were tested for interleukins by ELISA as described previously. The results are representative of two independent experiments. * $P < 0.05$ relative to the group that was not stimulated with the F2 fraction

nitrogen [5, 29]. Rozental and colleagues [9] demonstrated that macrophages are unable to destroy *F. pedrosoi* conidia, although the production of oxygen reactive species has been observed in the cell membrane and within cytosolic vacuoles that contain the fungus. In neutrophils, the ability to destroy the pathogen is related to the release of cytosolic granules containing peroxidase and toxic derivatives of hydrogen peroxide, thus bearing out the cytotoxicity of these cells [11].

Our data show that adherent cells that migrate to the peritoneum 4 h after inoculation with the F2

fraction of the fungal cell wall produce more NO, which suggests that this population, comprised mainly of neutrophils, is able to produce this microbicidal molecule. However, the cells that migrate after 72 h produce less NO. These observations suggest that, in addition to the molecules already shown to have a role in the removal of this fungus by neutrophils, NO-dependent mechanisms may be involved.

In order to increase the efficacy of the cellular immune response, phagocytes produce an array of cytokines. Macrophages synthesize interleukins (IL-) 12 and 10, which respectively induce two patterns of response: Th1, which leads to phagocyte activation and control/clearance of the fungal infection; and Th2, which is correlated with a diminished microbicidal activity in effector cells and persistence or dissemination of the pathogen [32]. Cytokine production has already been demonstrated in patients infected with *F. pedrosoi* [11] *H. capsulatum* [26], *P. brasiliensis* [29] and *Blastomyces dermatitidis* [34].

According to Gimenes and colleagues [12], cytokine production, especially IL-10 and IL-12, is directly related to the severity of clinical presentation in chromoblastomycosis, since patients with the severe form of the disease have higher levels of IL-10 and their T cells proliferate poorly, whereas those with the mild form show high levels both of IFN- γ and T-cell proliferation.

The pattern of cytokine production by phagocytes may be influenced by components of the fungal cell wall. It is an extremely complex structure consisting of an elastic framework of polysaccharides (glucans and chitin) that surround the plasma membrane and to which a wide array of different proteins, often heavily glycosylated, are anchored in various ways [35] and contribute to fungal persistence [23, 36].

In our work, inoculation of the F1 (composed mainly of β -1-3-glucan and chitin) and F2 fractions (composed mainly of α -1-3-glucan and melanin) induced differential cell migration. At 4 h, neutrophil migration was observed for both fractions and elevated TNF- α production was seen only in the group treated with the F1 fraction. After 72 h, the F1 fraction mainly induced macrophage migration, while the F2 fraction attracted lymphocytes as well. At the latter time point, TNF- α production was only found in the group inoculated with the heat-killed fungus, an

increase in IL-12 was seen in the F1-treated animals, and IL-10 was increased in animals inoculated with the heat-killed fungus or F2 fraction. Similar data were described for *C. albicans* [37], in which case neutrophil activation was observed after inoculation with a fraction composed of a mannoprotein/ β -glucan (CAWS); neutrophils migrated to the site where CAWS had been inoculated after 4 h and were accompanied by a reduction in lymphocyte numbers and an increase in IL-10 levels [37].

β -glucans are major cell wall structural components in fungi and was mainly presented in F1 fraction. As they are not found in animals, these carbohydrates are considered classic pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), and are recognized by the innate immune system. Recent studies have begun to shed some light on their cellular receptors, such as dectin-1, and their molecular mechanisms of action [38].

Among the β -glucans extracted from the cell wall of fungi, β -1,3-glucans have a key role in the induction and regulation of the immune response. Of all the galactose-containing molecules associated with its primary structure, LacCer seems to be bound by neutrophils in the soluble fraction of the cell wall of *C. albicans* and is chemotactic for these cells [38] through a mechanism that may also be correlated to β -1,3-glucan recognition by dectin-1 and the CR3 complement receptor (MAC1). β -1,3-glucans are also implicated in the initial phase of the innate immune response and can be detected in the serum of patients with systemic mycoses by *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* [39]. Furthermore, the presence of β -glucans in the cell wall of *H. capsulatum* leads to phagocyte recruitment to the inflammatory site by means of leukotriene production in response to the pathogen, which suggests that leukotrienes and cytokines produced by phagocytes play a synergistic role in their engagement in the course of fungal infection [40].

The α -1,3-glucan found in the F2 fraction of *Fonsecaea pedrosoi*, as described for other fungi, is a homopolymer of α -linked glucose residues that contributes to fungal virulence. In *H. capsulatum*, it is spatially distributed in the upper layers of the cell wall relative to β -1,3-glucan, thus masking the latter from recognition by dectin-1 and preventing activation of immunity by this receptor. It precludes the production of proinflammatory cytokines such TNF- α

by macrophages and may explain the pathogenicity of dimorphic fungi [41].

The F2 fraction of *F. pedrosoi* also contains melanin, a heterogeneous phenolic biopolymer with roles in fungal protection and virulence. It is found in many other fungi, such as the pathogens *C. albicans*, *C. neoformans*, *P. brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* and *A. fumigatus* [4, 5]. It can be biosynthesized in fungi from two precursors. The most common is 1,8-dihydroxynaphthalene, and its melanin-dihydroxynaphthalene derivative is accordingly the most frequent variety found in fungi (e.g., *A. nidulans*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Cladosporium carrionii*, *E. dermatitidis*, *Phialophora verrucosa*, *S. schenckii* and *F. pedrosoi*) [32]. The second route is L-dopa dependent, which results in eumelanin production via polyphenoloxidase and is found in *C. neoformans* [5, 20]. Although *F. pedrosoi* uses the most common route, it stands apart from the other fungi in that its production of this pigment is constitutive and dependent solely on acetyl-CoA, whereas pathogens such as *P. brasiliensis* need external precursors such as L-dopa. Therefore, *F. pedrosoi* is useful as a study model for melanin synthesis [4, 42].

Melanin binds metals such as iron and can sequester free radicals. Since iron is one of the main components of melanosomes [4] and is protective against oxidative mechanisms, its presence is one of the main reasons why most phagocyte killing mechanisms fail to destroy the fungus. It has been demonstrated [4] that melanosomes merge with the fungal cell membrane and release melanin, calcium, iron and phosphorus to protect the pathogen; molecules that typically occur in melanosomes have also been found in the cell wall of *F. pedrosoi*.

Our results show that the F2 fraction of *F. pedrosoi* can stimulate adherent cells in a fashion distinct from the F1 fraction. Differences include NO production 4 h after inoculation in the peritoneum of mice. The levels of this molecule, regardless of the type of stimulus, were low after 72 h. These data confirm previous findings from our group [6] that showed that macrophages activated in vitro in the presence of melanin from *F. pedrosoi* produced little NO. Our data suggest that the presence of melanin in the F2 fraction inhibited NO synthesis. Phagocytes obtained from normal animals and incubated with this fraction presented a lower phagocytic index,

which may also be attributed to melanin. NO production was only observed in phagocytes retrieved after 4 h of activation with thioglycolate. At 72 h after inoculation with thioglycolate, the F2 fraction was also capable of changing the cytokine pattern; IL-12 was decreased and IL-10 increased.

Taken together, the data presented in this work and the complexity of interactions between phagocytes and fungal cell wall components lead us to propose that both melanin and α -glucan present in the F2 fraction disrupt important microbicidal mechanisms, including internalization, NO production and production of cytokines that would trigger an effective immune response. We suggest that these mechanisms favor the persistence of the fungus in tissue, and the release of these components alone is able to negatively modulate the host immune response.

Acknowledgments We would like to thank Professors Alice Melo Ribeiro and Bruno Cobucci Salles for critical discussion and review of the manuscript. This work was supported by a grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

References

- Rajeev S, Clifton G, Watson DM. *Fonsecaea pedrosoi* skin infection in a dog. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20:379–81.
- McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeoophycomycosis. New concepts, diagnosis and mycology. *J Am Acad Dermatol.* 1983;8:1–6.
- Salgado CG, Silva JP, Diniz JAP, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46:33–6.
- Franzen AJ, Cunha MML, Miranda K, et al. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *J Struct Biol.* 2008;162:75–84.
- Santos ALS, Palmeira VF, Rozental S, et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS.* 2007;31:570–91.
- Silva CL, Fazioli RA. A *Paracoccidioides brasiliensis* having granuloma-inducing, toxic and macrophage stimulating activity. *J Gen Microbiol.* 1985;131:1497–501.
- Bocca AL, Brito PPMS, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia.* 2006;161:195–203.
- Uribe F, Zuluaga AI, Leon W, Restrepo A. Histopathology of chromoblastomycosis. *Mycopathologia.* 1989;105:1–6.
- Farbiarz SR, de Carvalho TV, Alviano C, de Souza W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *J Med Vet Mycol.* 1992;30:265–73.
- Rozental S, Alviano CS, de Souza W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia.* 1994;126:85–91.
- Rozental S, Alviano CS, de Souza W. Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. *J Med Vet Mycol.* 1996;34:323–30.
- Gimenes VMF, Souza MG, Ferreira KS, et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect.* 2005;7:708–13.
- D'Ávila 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.* 2002;156:51–60.
- Gimenes VMF, Criado PR, Martins JEC, Almeida SR. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. *Mycopathologia.* 2006;162:97–101.
- Silva CL, Fazioli RA. Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *J Med Microbiol.* 1985;20:299–305.
- Silva CL, Fazioli RA. A *Paracoccidioides brasiliensis* having granuloma-inducing, toxic and macrophage stimulating activity. *J Gen Microbiol.* 1985;131:1497–501.
- San-Blas G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationship. *Mycopathologia.* 1982;79:159–84.
- Szanişzlo PJ, Cooper BH, Voges HS. Granulomatous compositions of the hyphal walls of three chromomycosis agents. *Sabouraudia.* 1972;10:94–102.
- Zacharias D, Ueda A, Moscardi-Bacchi M, et al. A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J Med Vet Mycol.* 1986;24:445–54.
- Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun.* 1995;63:3131–6.
- Taborda CP, Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia.* 2008;162:331–9.
- Jacobson ER. Pathogenic roles for fungal Melanins. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:708–17.
- Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. Biochemical studies on thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 1972;110:208–18.
- Alviano CS, Farbiarz SR, Souza W, et al. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J Gen Microbiol.* 1991; 137:837–44.
- Green LC, Wagner DA, Ruiz de Luzureaga K, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78: 7764–80.
- Allendoerfer R, Deepe GS Jr. Intrapulmonary response to *Histoplasma capsulatum* in gamma interferon knockout mice. *Infect Immun.* 1997;65:2564–70.
- Wozniak KL, Ravi S, Macias S, et al. Insights into the mechanisms of protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection using a mouse model of pulmonary cryptococcosis. *PLoS One.* 2009;4(9):e6854.

28. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*. 2005;32:20–9.
29. Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. The role of interleukin 10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. *Clin Immunol*. 2005;14:86–94.
30. Naundorf S, Schröder M, Höflich C, et al. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. *Eur J Immunol*. 2009;39:1435–46.
31. Stevens DA. Th1/Th2 in aspergillosis. *Med Mycol*. 2006;1:229–35.
32. Altamura M, Casale D, Pepe M, Tafaro A. Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2001;1:189–97.
33. Teixeira de Sousa MG, Ghosn EEB, Almeida SR. Absence of CD4⁺ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scand J Immunol*. 2006;64:595–600.
34. Wuthrich M, Filutowicz HI, Warner T, et al. Vaccine immunity to pathogenic fungi overcomes the requirements for CD4 help in exogenous antigen presentation to CD8⁺ T cells: implications for vaccine development in immunodeficient hosts. *J Exp Med*. 2003;197:1405–16.
35. Pitarch A, Nombela C, Gil C. Collection of proteins secreted from yeast protoplast in active cell wall regeneration. *Methods Mol Biol*. 2008;425:241–63.
36. Kanetsuna F, Carbonell LM. Cell wall glucan of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 1970;101:675–80.
37. Ishida-Okawara A, Nagi-Miura N, Oharaseki T, et al. Neutrophil activation and arteritis induced by *C. Albicans* water-soluble mannoprotein- β -glucan complex (CAWS). *Exp Mol Pathol*. 2007;82:220–6.
38. Sato T, Iwabuchi K, Nagaoka I, et al. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1, 6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan. *J Leukoc Biol*. 2006;80:204–11.
39. Obayashi T, Yoshida M, Mari T, et al. Plasma (1-3) β -glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet*. 1995;345:17–20.
40. Medeiros AI, Malheiros A, Jose PJ, et al. Differential release of MIP-1 alpha and eotaxin during infection of mice by *Histoplasma capsulatum* or inoculation of beta-glucan. *Inflamm Res*. 2004;53:351–4.
41. Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* α -(1-3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;4:1366–70.
42. Gómez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16:91–6.

8.2.2. Resumos em Congressos

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 28, Suplemento No. 1, Agosto, 2008
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

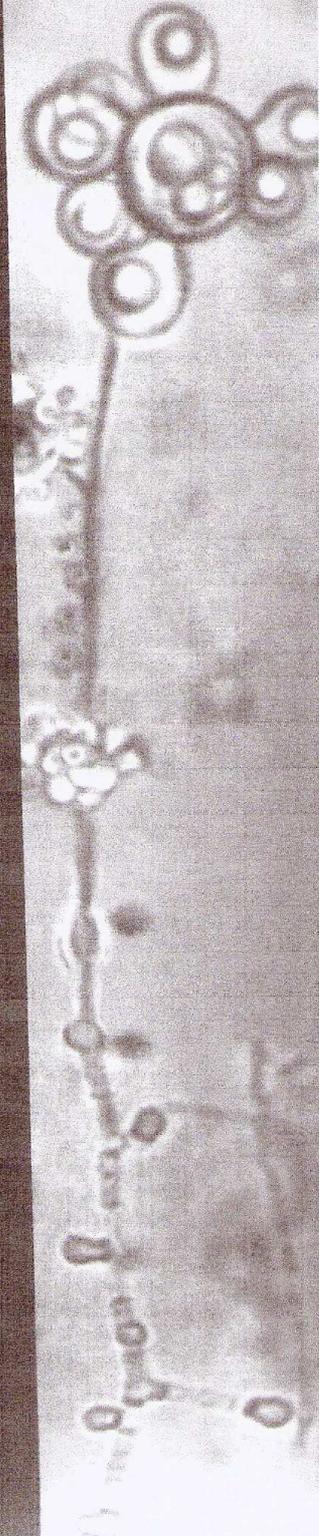
Proceedings of the X International Congress on Paracoccidioidomycosis

A Centennial Celebration



August 7-10, 2008

Intercontinental Hotel
Medellín, Colombia



5-29

Modulation of experimental paracoccidioidomycosis by monoclonal antibodies against the major diagnostic antigen, GP43

F. A. Pinto¹, R. Puccia,² C. J. da Silva¹, J. E. Muñoz¹, L. R. Travassos², C. P. Taborda¹

¹Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil. e-mail: fel-ipe@hotmail.com

Background: Antifungal chemotherapy is required for paracoccidioidomycosis (PCM) treatment, though even after prolonged administration there is no assurance of complete destruction of the fungus. The period of treatment depends on the drug used and the severity of disease. The role of antibody-mediated immunity in host resistance to *P. brasiliensis* is less recognized. In several other systems, however, there is considerable evidence that administration of monoclonal antibodies (mAbs) can modify the course of disease in mice infected with fungi such as *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis* spp, *Fonsecaea pedrosoi* and *Aspergillus* spp. In the present study a panel of monoclonal antibodies against gp43 was utilized for evaluating the effect of passive immunization in mice intravenously infected with a virulent strain of *P. brasiliensis*.

Methods: BALB/c mice were immunized with 1 mg of the monoclonal antibody (mAb) 3E, 32H or an irrelevant one by intraperitoneal route, 24 h before the intravenous infection with 3×10^8 yeast cells of *P. brasiliensis* (Pb18). A maintenance dose was given every week for a month. A week after the last immunization, mice were sacrificed and lung, spleen and liver were removed for measuring the fungal burden, cytokine levels (IL12, IL4, IL10 and IFN- γ) and histology.

Results: Animals immunized with mAb 3E showed significant reduction of colony forming units (CFU) in lung and spleen compared to the groups that received mAb 32H or irrelevant mAb. Histological analysis confirmed the results obtained in the CFU assay although a significant difference in the cytokine levels between the groups was not observed.

Conclusion: The anti-gp43 mAb 3E but not mAb32H or the irrelevant mAb significantly reduced the fungal burden in BALB/c mice intravenously infected with *P. brasiliensis*. The present work also raises the possibility of a potential therapeutic use of mAb3E.

Supported by Fapesp and CNPq.

5-30

The influence of *Fonsecaea pedrosoi* cell wall in peritoneal macrophage activation

Y.K.M. Nóbrega¹, Lozano V.F.¹, Figueiredo, F.³, Bocca A.L.^{1,2}

¹Área de Patologia - Faculdade de Medicina, Brasília, Brazil, ²Instituto de Ciências Biológicas - Dept. de Biologia Celular, Brasília, Brazil, ³University Católica of Brasília - UCB - Brazil.

e-mail: albocca@unb.br

Chromoblastomycosis is a chronic suppurative granulomatous mycosis that exists all around the world. The *Fonsecaea pedrosoi* is the most frequent etiologic agent in the world. The infection begins with the trauma and the implantation of conidia or hyphae fragments in the subcutaneous tissue producing the initial lesion. Inside the host, a fungus structure differentiates into sclerotic forms allowing the establishment of the disease.

Considering the importance of an efficient immune cellular response, through the interaction between the cells of immunologic system with the components of the fungus wall, the objective of the work was to analyze the influence of the fractions from the *F. pedrosoi* cellular wall in the activation of murine peritoneal phagocytes. Our results demonstrated that after 4 hours after the inoculation of the solutions the migration was constituted predominantly by neutrophils and after 72 hours predominantly by macrophages.

The F2 fraction and the inactivate fungus stimulates predominantly B lymphocytes migration. The F1 and F2 fraction induced the high production of IL-12 and IL-10 in macrophages respectively. The macrophages stimulated with F2 fraction showed a decreased phagocytosis index and an increased production in IL-10 production. Our results suggest that, in chromoblastomycosis, the cell wall components presents in F1 or F2 fraction contribute to induce a Th1 response or Th2 response.

Financial Support: CNPq.



IMUNO09

B A H I A - B R A S I L

XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia
X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica

Ano da França no Brasil

September 23-26 Pestana Bahia Hotel

Certificate

We certify that

NOBREGA YKM; SIQUEIRA IM; GONCALVES LMB; SILVA SS; FELIPE MSS; BOCCA AL

attended the XXXIV Congress of the Brazilian Society for Immunology
and X International Symposium on Allergy and Clinical Immunology

as author(s) of the following abstract - poster:

**IN VITRO INFLUENCE OF THE FONSECA PEDROSOI F1 FRACTION ON THE
J774 MACROPHAGES AND ITS EFFECT ON THE EXPRESSION OF GENES
INVOLVED IN THE INFLAMMATORY RESPONSE**

Salvador - Bahia - Brazil - September 26th, 2009

Aldina Barral

Aldina Barral
President SBI

SBI
Sociedade Brasileira de Imunologia

Maria Ilma Araújo

Maria Ilma Araújo
President ASBAIC

ASBAIC
Associação Brasileira de Alergia e Imunologia Clínica



Apresentação

Comissão Organizadora

Programa Científico

Resumos

Informações Gerais

Agradecimentos

Apresentação

Em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, damos as boas vindas a todos os participantes do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia. A programação está composta de tal forma que abrange as mais diferentes áreas da Microbiologia, teremos 42 conferências e 38 mesas redondas, 23 Cursos totalizando mais de 177 atividades e 3 Simpósios. Além dos 2481 trabalhos que serão apresentados nas seções de posters. Os 2500 congressistas terão, portanto, oportunidades de escolher entre centenas de seções, aquelas que mais irão ao encontro de seus objetivos.

A programação que aí está foi fruto de trabalho incansável dos representantes das diferentes áreas da SBM e da Comissão Organizadora do CBM 2009. Ela está se concretizando hoje graças aos nossos patrocinadores: CNPq, Ministério da Saúde, CAPES, Fundações de Apoio à Pesquisa Estaduais, à FAPERJ (Rio de Janeiro), à FACEPE (Pernambuco) e à FAPESP (São Paulo). Às Empresas 3M, APLIED BIOSYSTEM, BIOMERIEUX DO BRASIL, BIOMETRIX DIAGNÓSTICA, BIOSCAN, BIOSYSTEMS, CISABRASILE, COLGATE-PALMOLIVE, CONTROL LAB, EBE FARMA, FAIRPORT, FILTRACON, INTERLAB, LABORCLIN, LIVRARIA MÉDICA PAULISTA, LOBOV, MADASA, NOVA ANALÍTICA, NOVARTIS, OXOID BRASIL, PLASTLABOR, PROBAC, REVISTA LAES&HAES, REVISTA NEWSLAB, SCHIMADZU, SIEMENS, WYETH que enriquecem nossas atividades e torna mais prazeroso o nosso evento científico. A todos agradecemos pela confiança e apoio.

Quero fazer um agradecimento especial às pessoas que incansavelmente trabalharam para que esse Congresso se realizasse, Wellington, Jair, Tiffanni, Riccardo e Silvia, além do staff do Hotel na pessoa do Sr Almir. Em destaque, agradeço aos meus alunos, que mesmo frente as minhas ausências souberam conduzir tão bem o laboratório.

Espero que todos tenham satisfação em participar de nosso congresso, aproveitando ao máximo a rica programação científica e a oportunidade de encontrar amigos e de fazer novas amizades. Espero que nestes dias consigamos absorver toda a energia deste lugar, que a luz entre em nossa alma e nos faça mais tolerantes que consigamos perceber que atrás de cada atividade há o trabalho de pessoas que com certeza fizeram o melhor delas.

Marina Baquerizo Martinez
Presidente

Promoção:



Organização:



ANAI DO 25º CBM
ISSN 2176-414X

Área: Imunologia (Divisão E)

&NBSP;&NBSP; ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES&NBSP;DURANTE UMA CINÉTICA DE INTERAÇÃO COM O PARACOCCICIOIDES BRASILIENSIS E FRAÇÕES DO FUNGO.

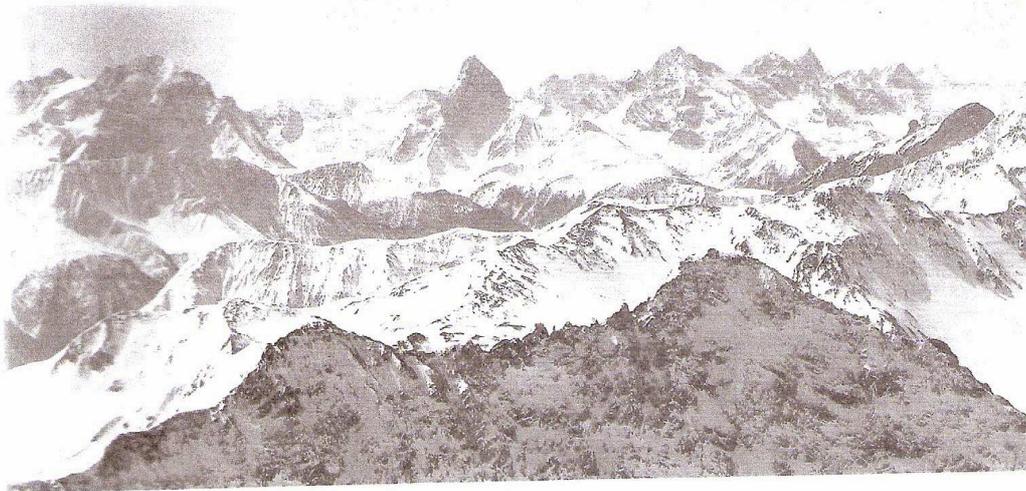
Laura Maria Barbosa Gonçalves (UNB); Simoneide Souza Silva (UNB); Yanna Karla de Medeiros Nóbrega (UNB); Anamélia Lorenzetti Bocca (UNB); Maria Sueli Soares Felipe (UNB)

Resumo

Paracoccidoides brasiliensis é um importante patógeno humano que causa a paracoccidiodomicose (PCM), uma micose sistêmica com ampla distribuição na América Latina. A adesão e invasão de células são eventos essenciais envolvidos na infecção e disseminação do patógeno. A interação entre *P. brasiliensis* e macrófago é bastante complexa e representa um determinante primário no desenvolvimento da infecção, podendo resultar na proliferação do fungo em hospedeiros susceptíveis. A ativação adequada dos macrófagos alveolares e a expressão de genes que ativam os mecanismos microbicidas dos macrófagos são elementos-chaves na erradicação desta doença. Dados previamente descritos na literatura demonstram que a fração F1 isolada do fungo, cujo principal componente é a b-1,3-glucana, é um importante imunomodulador, promovendo o recrutamento de células inflamatórias e estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo o Tnf- α . Outro componente importante na interação entre o hospedeiro e o fungo é a fração F2, constituída pela a-1,3-glucana que está comumente relacionada à virulência. A mudança na composição da parede celular durante a infecção, como ocorre em *P. brasiliensis*, pode ser considerada como um mecanismo de escape da resposta imune inata. Dessa forma, a a-1,3-glucana localizada mais externamente na parede celular, deve atuar como um protetor de b-1,3-glucana contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, uma vez que a b-1,3-glucana é capaz de induzir um aumento da liberação do Tnf- α , com consequente morte do fungo. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de genes-chaves no processo inflamatório utilizando macrófagos alveolares MHS. Metodologia: Os macrófagos foram incubados por diferentes períodos (6, 24 e 48h) com leveduras e frações F1 e F2 do fungo da cepa 01 do *P. brasiliensis*. A partir do RNA total extraído pelo método do reagente Trizol, do macrófago infectado e não-infectado com *P. brasiliensis*, F1 e F2. O cDNA foi sintetizado e utilizado na PCR em tempo real para avaliar a expressão dos genes: *Itga5*, *Toll4*, *Tnf-a*, *Clec2*, *Nfkb*, *Nfkr*. Os resultados preliminares indicam que a F1 nos tempos de 6 e 48h de interação induziu nos macrófagos alveolares MHS a expressão de todos os genes analisados e no tempo de 24h modulou positivamente somente o *Clec2*. A F2 no tempo de 6h modulou positivamente os genes *Toll4*, *Tnf-a*, *Clec2*, *Nfkb* e *Nfkr*. Em 24 e 48h induziu os genes *Itga5*, *Toll4*, *Clec2* e *Nfkb*. A interação de 6h do PB01 com os macrófagos alveolares MHS induziu os genes *Toll4*, *Tnf-a*, *Clec2*, *Nfkb* e *Nfkr*. No tempo de 24h modulou positivamente os genes *Itga5*, *Clec2* e *Nfkr*. Em 48h de interação do PB01 com os macrófagos alveolares MHS todos os genes foram modulados negativamente. Portanto, a modulação positiva desses genes nos tempos iniciais de interação (6 e 24h) indicam uma possível ativação dos macrófagos.

Palavras-chaves: Paracoccidiodomicose, resposta inata, macrófagos, genes.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose, resposta inata, macrófagos, genes



Final Programme and Abstracts

WORLD IMMUNE REGULATION MEETING-IV

29 March – 01 April 2010
Davos, Switzerland



POSTER SESSION 5

Immune response to parasites

Chairs: Rick Maizels, Maria Yazdanbakhsh

48 Helminth products bypass the need for TSLP in Th2 immune responses by directly modulating dendritic cell function

Massacand Joanna¹, Mosconi Ilaria², Stettler Rebecca¹, Meier Reto¹, Humphreys Neil³, Grecis Richard³, Marsland Benjamin⁴, Harris Nicola¹.

¹Environmental Biomedicine, Institute of Integrative Biology, Swiss Federal Institute of Technology of Zurich, Schlieren, Switzerland.

²Laboratory of Intestinal Immunology, Global Health Institute, Swiss Federal Institute of Technology of Lausanne, Lausanne, Switzerland.

³Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, United Kingdom.

⁴Molecular Biomedicine, Institute of Integrative Biology, Swiss Federal Institute of Technology of Zurich, Schlieren, Switzerland.

49 Specific T cell regulation of distinct T helper responses in different disease stages of human filariasis

Wammes Linda J¹, Wibowo Heri², Hamid Firdaus³, Wiria Aprilianto E², Sartono Erliyani¹, Maizels Rick M⁴, Smits Hermelijn H¹, Supali Taniawati², Yazdanbakhsh Maria¹

¹Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands

²Department of Parasitology, University of Indonesia, Jakarta, Indonesia

³Department of Microbiology, Hassanuddin University, Makassar, Indonesia

⁴Institute of Immunology and Infection Research, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

50 The specific feature of T- lymphocytes at patients with toxocarosis and lung diseases

Ghinda Sergei¹, Procopishin Larisa², Plachinta Gheorgii³, Smesnoi Valentina⁴

Institution of ftiziopulmonology, Kishinev, Moldova

51 In vitro influence of the *fonsecaea pedrosoi* f1 fraction on the j774 macrophages and its effect on the expression of genes involved in the inflammatory response

Nóbrega YKM¹, Siqueira IM¹, Silva SS², Felipe MSS², Bocca AL^{1,2}.

¹ Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil;

² Biology Institute, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

52 Symptoms after ingestion of *Trichuris suis* ova

Peter Bager¹, PhD; Christian Kapel², PhD; Allan Roepstorff³, PhD; Stig Milan Thamsborg³, PhD; John Arned⁴, MD; Steen Rønborg⁴, PhD; Bjarne Kristensen⁵, MSc; Lars K. Poulsen⁶, PhD; Jan Wohlfahrt¹, DMSc; Mads Melbye¹, DMSc

¹: Statens Serum Institut, Department of Epidemiology Research, Artillerivej 5, DK-2300 Copenhagen S, Denmark

²: University of Copenhagen, Faculty of Life Sciences, Department of Agriculture and Ecology, Thorvaldsensvej 40, DK-1871 Frederiksberg C, Denmark.

³: University of Copenhagen, Faculty of Life Sciences, Department of Veterinary Disease Biology, Dyrølægevej 100, DK-1870 Frederiksberg C, Denmark

⁴: Pulmonology and Allergy Clinic of Copenhagen, Frederiksborggade 15, 7th floor, DK-1360 Copenhagen, Denmark

⁵: Phadia ApS, Gydevang 33, DK-3450 Allerød

⁶: Allergy Clinic, 7551, National University Hospital, Blegdamsvej 9, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark

53 Role of derivatives of arachidonic acid in *Trypanosoma cruzi* infection

Néstor A. Guerrero¹ Henar Cuervo² Núria Girònes¹ Manuel Fresno¹

¹ Centre of Molecular Biology Severo Ochoa (CBMSO). Autonomous University of Madrid (UAM). Madrid. Spain

² Vesalius Research Center (VRC) Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB)

Leuven. Belgium

54 Lymphotoxin alpha gene polymorphism influences the cardiomyopathy development in Chagas disease patients

Pisetti Cristina Wide¹; Oliveira, Rafael¹; Correia, Dalmo¹, Rodrigues, Virmond¹

¹. Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil



Certificamos que Isaque Medeiros Siqueira participou do VI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, realizado no período de 29/11/2010 a 02/12/2010, em Brasília - DF - Brasil, na qualidade de EXPOSITOR DE PAINÉIS, para o trabalho:

Treatment of experimental chromoblastomycosis using DNA vaccine (DNA-*isp65*). Siqueira IM, Nóbrega YKM, Simon KS, Souza ACO, Jerônimo MS, Silva CL, Neto FFC, Bocca AL. Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA), Universidade de Brasília - UnB, Brasília, DF. isaquems@gmail.com. [Treatment of experimental chromoblastomycosis using DNA vaccine (DNA-*isp65*)]

Brasília, 02 de dezembro de 2010

José Carmine Dianese

José Carmine Dianese

Presidente do VI Congresso Brasileiro de Micologia
Sociedade Brasileira de Micologia