

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOLOGIA
PARASITÁRIA

DANIELLY CORRÊA MOREIRA DE SEQUEIRA

HIALOHIFOMICOSE CAUSADA POR *PURPUREOCILLIUM*
LILACINUM: AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL E DA
RESPOSTA IMUNE SISTÊMICA E *IN SITU* EM MODELO MURINO
C57BL/6

RIO DE JANEIRO

2016

Hialohifomicose causada por *Purpureocillium lilacinum*: avaliação da infecção experimental e da resposta imune *in situ* e sistêmica em modelo murino C57BL/6

DANIELLY CORRÊA MOREIRA DE SEQUEIRA

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadoras: Prof^aDr^a Joseli de Oliveira Ferreira
Prof^a Dr^a Cintia de Moraes Borba

Rio de Janeiro
2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S479 Sequeira, Danielly Corrêa Moreira de

Hialohifomicose causada por *Purpureocillium lilacinum*: avaliação da infecção experimental e da resposta imune *in situ* e sistêmica em modelo murino C57BL/6 / Danielly Corrêa Moreira de Sequeira. – Rio de Janeiro, 2016.

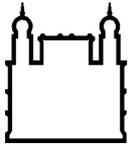
xx, 100 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 83-99

1. *Purpureocillium lilacinum*. 2. Hialohifomicose. 3. Modelo experimental. 4. Imunossupressão. 5. Resposta imune. I. Título.

CDD 579.5



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: DANIELLY CORRÊA MOREIRA DE SEQUEIRA

Hialohifomicose causada por *Purpureocillium lilacinum*: avaliação da infecção experimental e da resposta imune *in situ* e sistêmica em modelo murino

C57BL/6

ORIENTADORAS: Prof^a Dr^a Joseli de Oliveira Ferreira
Prof^a Dr^a Cintia de Moraes Borba

Aprovada em: 18/11/2016

EXAMINADORES:

Prof^a Dr^a Andrea Henrique Pohns - IOC / FIOCRUZ (presidente)
Prof. Dr. Manoel Marques Evangelista - INI / FIOCRUZ
Prof. Dr. Jefferson Carvalhaes - UFF
Prof^a Dr^a Fernanda Nazaré Morgado - IOC / FIOCRUZ
Prof^a Dr^a Andrea Engemann -UERJ

Dedico essa tese à minha filha Sarah, que é o verso que deu origem a todas as minhas poesias.

AGRADECIMENTOS

Estou fazendo uma força imensa para não ser repetitiva nos meus agradecimentos, mas o início do sonho de “ser doutor” merece destaque. Sempre que começo a contar para alguém sobre a minha opção pela vida acadêmica, eu digo que quando eu tinha 8 anos de idade, ao passar pela Fiocruz com a minha mãe, fiz a seguinte pergunta: “Mãe, o que tem ali naquele castelo?” Ela me respondeu: “Ali é o castelo onde trabalham os cientistas”. Então, em um minuto eu afirmei categoricamente: “Mãe, eu quero ser cientista para trabalhar nesse castelo.” Trinta e dois anos, lágrimas vertidas e noites em claro depois, eu encerro esse ciclo com meus mais sinceros agradecimentos a Deus por ter permitido que eu tornasse realidade um dos maiores sonhos da minha vida. Por ter me dado forças para seguir mesmo quando tudo dava errado, por ter me dado paciência para recomeçar, por diversas vezes. Pelos *insights* que eu tive ao longo desses quatro anos, mesmo quando nada parecia fazer sentido. Eu consegui aprender, ensinar, superar obstáculos e a mim mesma. E foi com Ele, e por Ele, que eu cheguei até aqui!

Mais do que agradecimento, essa tese é uma dedicatória à minha filha Sarah. Não foram poucos os momentos em que eu não pude fazer o jantar, mas ela comeu sanduíches comigo com muito prazer! Não foram poucos os dias que eu saí de casa e a deixei dormindo, e quando cheguei, ela também dormia. E mesmo que ela já não seja mais aquela criança que viveu essa mesma correria, à época do meu mestrado, o colo da mãe ainda faz falta. O que talvez ela não saiba, é que o colo dela me fez falta muitas vezes também, tamanho amor e companheirismo nós temos uma com a outra. Eu vou lembrar, por toda a minha vida, dos momentos em que ela me trouxe água, café e sorrisos pra aliviar a tensão de cada palavra descrita nessa tese.

Agradeço às minhas orientadoras por terem sido minhas “mães” durante todos esses anos. Por todos os ensinamentos técnico-científicos, pelas sugestões de artigos, por terem muitas vezes quase literalmente, segurado as minhas mãos para fazer tudo dar certo. Cada uma delas do seu modo, com suas

peculiaridades, fizeram de mim a profissional que eu sou: ética, comprometida, responsável. Dr^a Joseli para alguns, para mim, Lila, a quem devo meus conhecimentos sobre Imunologia. Lila, com seu temperamento forte, tão parecido com o meu em alguns aspectos, nunca, jamais deixou a peteca cair. Não foram poucas noites em que ela ficou no laboratório até tarde da noite enquanto eu fazia citometria. Não foram poucas as vezes em que eu precisei de ânimo e lá estava ela, para dizer “vambora, minha amiga”. A você, Lila, eu devo muito mais do que qualquer agradecimento pode expressar.

Dr^a Cintia, minha orientadora desde o mestrado e a responsável, com toda certeza, pelo crescimento exponencial do meu amor pela Micologia. Cintia, que em muitos momentos em que eu merecia levar um puxão de orelha, me tranquilizou. Em muitos momentos, especialmente nesse último ano, foi ela quem presenciou as minhas lágrimas e sempre, sempre, me dizia para enxugar o rosto e seguir em frente. Nos muitos momentos em que eu duvidei da minha capacidade e quis muito desistir, era ela quem dizia “se eu não confiasse em você eu não insistiria para você fazer”. Foi ela quem vibrou comigo mais do que qualquer pessoa pela conquista do prêmio concedido pela *Medical Mycological Society of the Americas*. Foi a ela quem eu mentalmente agradecia todas as vezes que eu dizia *Purpureocillium lilacinum* nos Estados Unidos, por ela ter acreditado que eu teria capacidade de concluir esse projeto. Sobre todas essas coisas e muitas outras que nenhuma palavra poderia expressar, meu profundo e eterno agradecimento. Só eu sei a falta que eu vou sentir de ouvir “eu vou matarrrrrrr essa gordinha!”

Agradeço imensamente à Dr^a Paula Mello De Luca, minha querida Paulinha, por ter mais uma vez estado ao meu lado nos difíceis momentos do meu desafio eterno, a citometria de fluxo. Você conseguiu, mais uma vez, me impedir de sair correndo durante a execução da técnica, da aquisição e das análises! Muito obrigada!

Dr. Rodrigo Caldas Menezes, por todo empenho com as análises histológicas. Definitivamente, um dia eu quero ter 10% da sua calma e placidez diante de tanta correria!

Dr^a Fernanda Nazaré Morgado, que chegou quase aos 45 do segundo tempo, talvez no momento mais difícil, que é a finalização de uma tese. Uma das pessoas mais tranquilas que eu tive o prazer de conhecer em todos os meus quase 10 anos de Fiocruz. Muito obrigada pela paciência e gentileza com as análises imunohistoquímicas, por sentar ao meu lado para realizar os experimentos e pela leitura de cada lâmina.

À coordenação do programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do IOC, especialmente à Rita, por sua incansável paciência em resolver os problemas sempre que possível.

À minha primeira aluna de iniciação científica, Arethusa, por todo comprometimento com esse projeto, por sua responsabilidade e por cada momento em que ela foi muito mais do que meu braço direito. Essa conquista também é sua, e ver você trilhar esses tortuosos caminhos da ciência é, talvez, uma das minhas maiores realizações até aqui.

À minha amiga e colega de trabalho, Virginia, por ser simplesmente a Vi. Mesmo que você nunca tivesse contribuído com nada em termos de trabalho (o que seria impensável porque a Virgínia quer fazer tudo para ajudar a todos), cada café e o (maldito) cigarrinho nos intervalos teria valido a pena. Por todas as horas em que eu estava à beira de um ataque de nervos e foi você, com essa calma e astral maravilhosos, quem deu conta do recado.

Ao Juan, meu amor colombiano, colega de trabalho, amigo como poucos e salvador da pátria em assuntos de citometria de fluxo, quem me ajudou muito mais do que eu merecia em diversos momentos. Foi ele quem sempre dizia “fica calma, vai dar tudo certo” e essas palavras tinham um poder curativo enorme. A você, meu querido amigo, muito obrigada!

Ao Rodrigo, que é a minha versão masculina, mesmo que eu seja um milhão de vezes mais organizada, meus agradecimentos por todas as risadas e, para

que ninguém ache que tudo é uma grande brincadeira, por ter me mostrado o caminho mais interessante das análises estatísticas. Muito obrigada!

Ao Dr. Josué Costa Lima que antes de pesquisador é um grande amigo a quem eu desejo tudo de bom. Por todo incentivo, por ter acreditado e dito várias vezes o quanto eu era boa naquilo que faço, pela confiança com os camundongos do projeto dele e, claro, por todos os papos regados a café e o famoso cigarrinho do intervalo, meu imenso obrigada.

Às minhas queridas Noemi e Juliana, e ao Dr. Marcelo Pinto por ter cedido gentilmente o criostato do seu laboratório para que eu pudesse realizar meus experimentos de imunohistoquímica quando todos os criostatos da Fiocruz estavam com problema. Vocês literalmente salvaram esse finalzinho da minha tese! MUITÍSSIMO obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia, especialmente a Alinne, por ter passado por toda essa minha correria com muitos sorrisos.

Aos colegas do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, que vai ser eternamente a minha casa, onde aprendi a amar e me dedicar à Micologia. Um agradecimento especial à Dr^a Gisela Lara da Costa pela eterna torcida. Gigi, você estará sempre nos meus agradecimentos!

Aos colegas do Biotério do Pavilhão 26, pelo cuidado com os animais e por toda atenção e carinho que dispensaram a mim. Valeu, gente!

A CAPES pelo apoio financeiro.

Para finalizar, meus sinceros agradecimentos a todos os amigos que acreditaram em mim e no meu trabalho e que, apesar de toda distância que esse trabalho impôs, compreenderam e hoje comemoram comigo. E às demais pessoas maravilhosas que esse trabalho me permitiu conhecer.

“É fácil entender a verdade quando ela é descoberta. O difícil é descobri-la...”

HIALOHIFOMICOSE CAUSADA POR *PURPUREOCILLIUM LILACINUM*: AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL E DA RESPOSTA IMUNE *IN SITU* E SISTÊMICA EM MODELO MURINO C57BL/6

RESUMO

Purpureocillium lilacinum é um fungo filamentosso, hialino, assexuado e um dos agentes causais da hialohifomicose, considerado um importante patógeno oportunista humano, capaz de infectar indivíduos imunossuprimidos e com crescente aumento de casos em imunocompetentes. Pouco se sabe sobre a imunopatogênese da hialohifomicose causada por *P. lilacinum* e, por essa razão, nosso trabalho objetivou analisar a infecção e as respostas imune, sistêmica e *in situ* de camundongos C57BL/6, imunocompetentes e imunossuprimidos, desafiados com conídios de *P. lilacinum*. Nossos resultados nos permitiram comprovar o potencial infeccioso do fungo, uma vez que hospedeiros imunocompetentes foram infectados, apesar de não apresentarem sinais visíveis da doença. Em contraste, os animais imunossuprimidos apresentaram sinais da doença compatíveis com relatos de caso de pacientes humanos, aumento do número de células fúngicas no baço e mortalidade celular. A análise histológica da maioria dos camundongos imunocompetentes inoculados por via intravenosa revelou células fúngicas no tecido apesar da ausência de alterações histopatológicas. Este mesmo grupo, quando inoculado por via subcutânea apresentou dermatite, paniculite e ulcerações na pele. Esse quadro foi mais grave nos animais imunossuprimidos, além de maior número de estruturas fúngicas no tecido. A análise do perfil imunológico revelou predomínio de linfócitos TCD8⁺ sobre TCD4⁺ nos imunossuprimidos. Observamos também os fenótipos de memória central e memória efetora/efetora, especialmente CD4⁺. Células T regulatórias apresentaram maiores percentuais nos imunossuprimidos. A quantificação de citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ revelou maiores percentuais no início da infecção, em ambos os grupos, supostamente devido ao maior número de células fúngicas neste ponto de observação. Vimos ainda menores percentuais de neutrófilos e macrófagos produzindo óxido nítrico e IL-1 nos animais imunossuprimidos demonstrando a interferência quantitativa e qualitativa da dexametasona sobre as células envolvidas na resposta imune *in situ* ao fungo. Em síntese, consideramos que nossos resultados reunidos, ampliam os conhecimentos não apenas sobre essa espécie fúngica, mas também sobre as bases da relação parasito-hospedeiro, de modo a contribuir para o entendimento de seus mecanismos de resistência e susceptibilidade.

Palavras chaves: *Purpureocillium lilacinum*, Hialohifomicose, Modelo Experimental, Imunossupressão, Resposta imune.

HYALOPHYPHOMYCOSIS CAUSED BY *PURPUREOCILLIUM LILACINUM*: EVALUATION OF EXPERIMENTAL INFECTION AND THE SYSTEMIC AND *IN SITU* IMMUNE RESPONSE IN MURINE MODEL C57BL/6

ABSTRACT

Purpureocillium lilacinum is a filamentous fungus, hyaline, asexual and an agent of hyalohyphomycosis, considered an important human opportunistic pathogen capable of infecting immunocompromised individuals, with increasing number of cases in immunocompetent. Little is known about the immunopathogenesis of hyalohyphomycosis caused by *P. lilacinum* and therefore, the aim of this study is to analyze the infection and systemic and *in situ* immune responses of immunocompetent and immunosuppressed C57BL/6 mice, challenged with *P. lilacinum* conidia. Our results allowed us to establish the infective potential of the fungus, since immunocompetent hosts were infected, although they did not visible signs of illness. In contrast, immunosuppressed animals showed signs of disease consistent with case reports of human patients as increase of the number of fungal cells in the spleen and cell mortality. Histological analysis of most immunocompetent mice inoculated intravenously revealed fungal cells in the tissue despite the absence of histopathological changes. The same group when subcutaneously inoculated showed dermatitis, panniculitis and ulcerations on the skin. This situation was more serious in immunosuppressed animals and greater number of fungal structures in the tissue. The analysis of the immunological profile revealed TCD8⁺ lymphocytes predominance of TCD4⁺ in immunosuppressed. We also note the central and effector memory/effector phenotype, especially CD4⁺. Regulatory T cells showed higher percentages in immunosuppressed. Quantification of IL-2, TNF- α and IFN- γ cytokines revealed greater percentage at the beginning of infection in both groups, probably due to the larger number of fungal cells in this viewpoint. Seen even smaller percentage of neutrophils and macrophages producing nitric oxide and IL-1 in immunosuppressed animals demonstrating the quantitative and qualitative interference of dexamethasone on cells involved in *in situ* immune response to fungus. In summary, we believe that our meeting results expand the knowledge not only about this fungal species, but also on the basis of the host-parasite relationship, so as to contribute to the understanding of their mechanisms of resistance and susceptibility.

Key words: *Purpureocillium lilacinum*, Hyalohyphomycosis, Experimental model, Immunosuppression, Immune response.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	4
3. Objetivos	27
4. Materiais e métodos	28
5. Resultados	39
6. Discussão	64
7. Conclusões	79
8. Perspectivas	82
9. Referências Bibliográficas	83
ANEXO	100

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Aspectos micro e macromorfológicos de <i>Purpureocillium lilacinum</i> .	5
Figura 2. Representação esquemática da ação coordenada das respostas inata e adaptativa, demonstrada pelas vias de reconhecimento de antígenos fúngicos por células dendríticas e a diferenciação da resposta celular em Th1, Th2, Th17 e Treg	14
Figura 3. Camundongos imunossuprimidos inoculados (i.v.) com <i>Purpureocillium lilacinum</i> (experimento 1).	40
Figura 4. Lesões na base da cauda (seta) de camundongos imunossuprimidos inoculados, por via subcutânea, com <i>Purpureocillium lilacinum</i> (experimento 2).	41
Figura 5. Percentual de sobrevivência dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos, após inoculação intravenosa de 10^5 conídios de <i>Purpureocillium lilacinum</i> e grupos controle inoculados com PBS durante o período de 35 dias após a infecção.	43
Figura 6. Número de células de <i>Purpureocillium lilacinum</i> recuperadas de fragmentos de baço de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos.	44
Figura 7. Corte histológico de tecido pulmonar de camundongos imunocompetentes inoculados com <i>Purpureocillium lilacinum</i> , 7 dias após a inoculação.	46

Figura 8. Corte histológico dos tecidos cutâneo e subcutâneo de camundongos imunocompetentes (coluna esquerda) e imunossuprimidos (coluna direita) inoculados por via subcutânea com <i>Purpureocillium lilacinum</i> , no dia 1 após a inoculação.	48
Figura 9. Análise imunohistoquímica de biópsia de pele de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos.	51
Figura 10. Quantificação de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ esplênicos de camundongos inoculados com <i>Purpureocillium lilacinum</i> e grupos controle inoculados com PBS nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação.	54
Figura 11. Gráficos representativos do perfil morfológico das células T de baço dos camundongos imunocompetentes inoculados com PBS (controle positivo) e estratégia de análise de subpopulações de memória central e efetora/efetoras.	55
Figura 12. Expressão de marcadores de memória em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ esplênicos de camundongos inoculados com <i>Purpureocillium lilacinum</i> e grupos controle inoculados com PBS nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação.	57
Figura 13. Expressão de marcadores de células T regulatórias de camundongos inoculados com <i>Purpureocillium lilacinum</i> e grupos controle inoculados com PBS nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação.	58
Figura 14. Gráficos representativos do perfil morfológico das células T de baço dos camundongos imunocompetentes inoculados com PBS (controle positivo) e estratégia de análise de subpopulações de células T regulatórias.	59
Figura 15. Quantificação de citocinas produzidas por linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ esplênicos, coletados de camundongos inoculados com	62

Purpureocillium lilacinum e grupos controle inoculados com PBS nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação

Figura 16. Gráficos representativos do perfil morfológico das células T de baço dos camundongos imunocompetentes inoculados com PBS (controle positivo) e estratégia de análise de populações produtoras de citocinas

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1: Anticorpos conjugados a fluorocromos utilizados na imunofenotipagem por citometria de fluxo.	38
Tabela 2: Variação de peso dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com <i>Purpureocillium lilacinum</i>	42
Tabela 3: Quantificação de macrófagos (CD68) e neutrófilos (NE) de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos	50
Tabela 4: Intensidade de produção de óxido nítrico (NOS) e IL-1 por células de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos	50

SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS

AIDS*	Síndrome de imunodeficiência adquirida
APC*	Aloficocianina
APC-Cy7*	Aloficocianina cianina7
BDA	Batata dextrose agar
BG*	<i>Background</i>
BSA*	Albumina do soro bovino
CC	Camundongos imunocompetentes inoculados com PBS (controle)
CD*	Grupamentos de diferenciação
CDG*	Doença granulomatosa crônica
CECAL	Central de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CI	Camundongos imunocompetentes inoculados com <i>Purpureocillium lilacinum</i>
CLR*	Receptores de lectina do tipo C
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTLA-4*	Antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos
DC*	Células dendríticas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC*	Isotiocianato de fluoresceína
FoxP3*	Fator de transcrição Forkhead Box P3
G-CSF*	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GIRT*	Receptor de TNF induzido por glucocorticóides
GM-CSF*	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
HE	Hematoxilina-Eosina
i.p.	Intraperitonal
i.v.	Intravenosa
IFN- γ *	Interferon (gama)
IL*	Interleucina
M-CSF*	Fator estimulante de colônias de macrófagos
NO*	Óxido nítrico
PAMP*	Padrões moleculares associados à patógenos

PAS*	Ácido periódico de Schiff
PBS*	Solução salina tamponada com fosfato
PCR*	Reação da polimerase em cadeia
PE*	Ficoeritrina
PE CF594	Ficoeritrina carboxifluoresceína 594
PECy7*	Ficoeritrina cianina7
PerCP-Cy 5.5*	Proteína clorofila peridina cianina 5.5
PRR*	Padrões de reconhecimento de patógenos
SFB	Soro fetal bovino
SPF*	Livre de germes patogênicos específicos
SC	Camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS (controle)
SI	Camundongos imunossuprimidos inoculados <i>Purpureocillium lilacinum</i>
T _{CM} *	Memória central de linfócitos T
T _{EM} *	Memória efetora de linfócitos T
T _{RM} *	Memória residente de linfócitos T
Th1*	Linfócito T Helper 1
Th2*	Linfócito T Helper 2
TLR*	Receptores do tipo Toll
TNF- α *	Fator de Necrose tumoral (alfa)
UFC	Unidade formadora de colônia
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
V500*	Violeta 500

* Abreviaturas em inglês

As unidades de medidas utilizadas no texto seguem a nomenclatura do Sistema Internacional de Unidades (SI).

1. INTRODUÇÃO

Hialohifomicoses são infecções fúngicas que se caracterizam pela presença de um micélio hialino, septado, ramificado ou não no tecido do hospedeiro. Essas infecções podem ser causadas por diferentes fungos hialinos, como *Acremonium* spp., *Fusarium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Paecilomyces* spp., *Purpureocillium lilacinum*, entre outros.

Purpureocillium lilacinum (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson, comb. nov 2011(1), é um fungo filamentoso, hialino, assexuado e um dos agentes causais da hialohifomicose. Essa espécie é considerada um importante patógeno oportunista humano e a despeito de sua moderada virulência, é capaz de infectar crianças (2) e adultos imunossuprimidos. Vale ressaltar o aumento de casos da doença em indivíduos imunocompetentes nos últimos 10 anos (3-5).

As manifestações clínicas da doença em indivíduos imunocompetentes variam de lesões nodulares cutâneas a subcutâneas, caracterizadas por erupções papulares, eritematosas, vesiculares ou necróticas (6-8). Nos pacientes que apresentam comprometimento no sistema imunológico ou pacientes debilitados, essas lesões podem ser mais severas, disseminadas e, em alguns casos, levando o paciente a óbito (7, 9, 10).

As micoses têm emergido como a doença humana mais comum em pacientes imunossuprimidos (11). Os pacientes transplantados, com AIDS e doenças crônicas, como o diabetes, são mais suscetíveis, especialmente aqueles que fazem uso prolongado de corticosteróides, uma vez que essas drogas afetam o sistema imune alterando o trânsito, número e funções de leucócitos (12).

De maneira geral, o reconhecimento do fungo pelo sistema imune inato é o primeiro passo para a ativação de uma resposta imunológica rápida. Isso ocorre por meio da interação entre os receptores de fagócitos (PRR – “Pattern recognition receptor”) e os padrões moleculares associados à patógenos (PAMP – “pathogen associated molecular patterns”), culminando na cascata de sinalização que inicia uma resposta imune protetora durante a infecção (13).

Na resposta imune adaptativa, a imunidade celular parece ter um papel importante nas infecções por fungos, visto que nos pacientes que apresentam alterações na função de linfócitos T são frequentes as infecções fúngicas oportunistas. As infecções cutâneas constituem a maior parte dos casos de hialohifomicose por *P. lilacinum*. Portanto, células como macrófagos (M ϕ), neutrófilos e células dendríticas (DC) têm um papel importante na fagocitose e apresentação de antígenos e, conseqüentemente, na eficiência da resposta inata e adquirida (14).

Pouco se sabe sobre a imunopatogênese da hialohifomicose causada por *P. lilacinum*. Os registros na literatura são relatos de casos clínicos, sem aprofundamento do entendimento da interação parasito-hospedeiro. Trabalhos anteriores do nosso grupo, utilizando isolados de origem humana, permitiram demonstrar a interação *in vitro* do fungo com macrófagos e células dendríticas humanas (15) e macrófagos murinos (16).

Nos modelos murinos BALB/c (17) e C57BL/6 (18), mostramos que a infecção por *P. lilacinum* por administração intravenosa (i.v.) de conídios pode ser estabelecida em animais imunocompetentes. Entretanto, para o desenvolvimento da doença, é necessária a imunossupressão dos animais com droga imunossupressora (dexametasona). Mostramos também que durante a

infecção, anticorpos específicos para conídios de *P. lilacinum* foram induzidos tanto nos animais imunocompetentes quanto imunossuprimidos (19).

Estes dados sugerem que o modelo murino é adequado para estudar a infecção por *P. lilacinum*. Desta forma, no presente estudo utilizamos este modelo para explorar vários aspectos da doença e da resposta imune do hospedeiro frente à infecção por *P. lilacinum*. Objetivamos compreender melhor os principais mecanismos de defesa que o hospedeiro dispõe para controlar a infecção, comparando o curso da infecção nos animais imunocompetentes e imunossuprimidos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Purpureocillium lilacinum*

O gênero *Purpureocillium* foi proposto por Luangsa-ard e colaboradores(1) para reclassificar a espécie *Paecilomyces lilacinus*, baseado no sequenciamento das regiões 18S do RNA ribossomal (rDNA), ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e TEF (*Translation Elongation Factor 1- α*). O fungo é descrito como uma espécie produtora de conídios violáceos, não produtora de clamidosporos e não-termofílica, diferentemente do gênero *Paecilomyces stricto sensu*, representado por *Paecilomyces variotti*, uma espécie produtora de conídios marrom-oliva e clamidosporos, extremamente termófila e de rápido crescimento em agar (1).

Purpureocillium lilacinum (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson, comb. nov 2011(1) é um fungo filamentoso, hialino (a saber, aqueles formados por hifas não pigmentadas), constituído por hifas septadas, ramificadas ou não, anamórfico e cosmopolita, que vive em saprofitismo no solo, ar e material em decomposição. Em temperatura ambiente, de acordo com Luangsa-ard et al. (1), suas colônias são de aspecto flocoso, com micélio aéreo, inicialmente branco adquirindo coloração rosada a violácea após a esporulação (em torno de 10 dias) (Figura 1B). O reverso das colônias apresenta tons púrpura ou amarelado. Seu diâmetro varia de 25 a 33 mm em 7 dias. Ao microscópio são observadas hifas vegetativas hialinas, das quais se originam os conidióforos sustentando fiálides de base dilatada e delicado pescoço em forma de garrafa, característica da espécie. Os conídios hialinos ou na cor púrpura quando em massa, podem variar de elípticos a fusiformes e possuem paredes lisas a levemente rugosas (Figura 1A) (1).

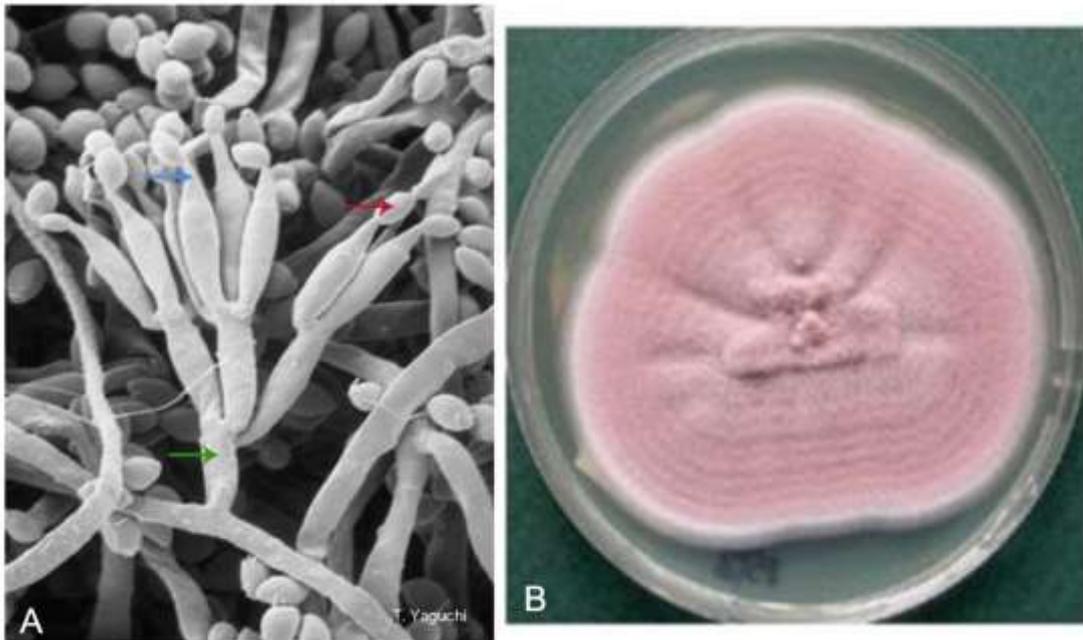


Figura 1. Aspectos micro e macromorfológicos de *Purpureocillium lilacinum*. A) Fotomicrografia eletrônica do fungo, evidenciando o conidióforo (seta verde), conídios (seta vermelha) e fiálide (seta azul). B) Colônia flocosa, de superfície rosada e bordas brancas. **Fonte:** Adaptado de Hoog, G.S. 2000.

2.1.1 – Fatores de virulência

Pouco se conhece sobre os fatores de virulência de *P. lilacinum*. Sabe-se que o fungo possui diversos mecanismos, incluindo a secreção de enzimas hidrolíticas como quitinases (20), serino-proteases (21) e fosfolipases (22) as quais estão envolvidos na patogênese de vários estágios do ciclo de vida de nematódeos parasitas de plantas. Além disso, também é capaz de produzir micotoxinas como pecilotoxinas e leucinostatinas A e B, compostos com atividades antibacteriana, antifúngica, imunossupressora e indutora de resposta inflamatória exacerbada em modelos experimentais (23-25). A produção de melanina, considerada como um clássico fator de virulência (26), também foi observada em cultura de *P. lilacinum* isolado do solo de Chernobyl (27). Este pigmento é essencial para a sobrevivência do fungo em condições inóspitas, como exposição à radiação, altas temperaturas e extrema falta de umidade.

2.2 Hialohifomicose causada por *Purpureocillium lilacinum*

O termo hialohifomicose foi introduzido em 1982 por Ajello (28), para designar infecções que se caracterizam pela presença de um micélio hialino no hospedeiro. É causada por diversos agentes, como por exemplo, *Paecilomyces* spp., *Acremonium* spp., *Beauveria* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Penicillium* spp e *Purpureocillium lilacinum*. Algumas espécies, incluindo *P. lilacinum*, além do micélio hialino possuem a habilidade de produzir formas adventícias no tecido, que são estruturas morfológicamente semelhantes à fiálides e a microconídios, que se disseminam por via sanguínea ocasionando oclusão, infarto e necrose vascular (29, 30).

A despeito de viver em saprofitismo na natureza, *P. lilacinum* é descrito como parasita de insetos e nematódeos, sendo, por essa razão, utilizado como agente de controle biológico (31, 32). Além disso, é capaz de causar infecções em animais como tatus (33), tartarugas (34), mais raramente em cães (35) e gatos(36) e em humanos.

P. lilacinum é considerado um patógeno humano emergente e oportunista, e a despeito de sua moderada virulência, é capaz de infectar crianças (2) e adultos imunossuprimidos (37-39). Entretanto, observamos na última década um aumento significativo nos casos de hialohifomicose humana causada por esse fungo em indivíduos imunocompetentes (3-5).

Os casos descritos na literatura, revisados por Borba e Brito (40), mostraram que entre 1964 e 2004 ocorreram 122 casos de hialohifomicose por *P. lilacinum*, com três surtos de infecções oculares: dois nos Estados Unidos e um no Brasil. Em 1996 ocorreu um surto na Suíça cuja manifestação clínica da doença foi cutânea. Pacientes submetidos a transplantes, principalmente

renais, tratados com corticosteróides, neutropênicos, diabéticos e portadores de leucemia, são alvos de infecção por este fungo (37). Na última década foram relatados mais quarenta e cinco casos da doença, comprovadamente provocada por *P. lilacinum*, dentre eles dezessete casos em pacientes imunocompetentes (41-43). Em 2015, Turner e Conrad (44) em um estudo multicêntrico retrospectivo, relataram 135 casos de hialohifomicose por *P. lilacinum*, dos quais 21 foram de infecção ocular e 76% destes casos ocorreram em pacientes imunocompetentes.

Nos indivíduos imunocompetentes, as manifestações clínicas da doença variam de lesões nodulares cutâneas a subcutâneas e constituem 1/3 dos casos de hialohifomicose por *P. lilacinum* (10). Essas lesões são caracterizadas por erupções papulares, eritematosas, vesiculares ou necróticas (6-8). Em pacientes imunossuprimidos, os relatos de casos, na maioria deles, são de infecções disseminadas (7, 9, 10).

As importantes vias de penetração desse fungo no hospedeiro são a pele, o trato respiratório e os implantes de dispositivos cirúrgicos (10, 45, 46). *P. lilacinum*, por ser um fungo potencialmente resistente a algumas técnicas de esterilização, pode contaminar loções e cremes utilizados na prática médica, penetrando através da pele, principalmente em pacientes hospitalizados (47, 48). Implantes de lentes intra-oculares, cirurgias oftalmológicas e traumas não cirúrgicos são fatores predisponentes para o desenvolvimento de infecções oculares como ceratites e endoftalmites, que são as formas mais recorrentes da doença (38, 43, 44, 49). Alguns autores relatam ainda casos de doenças oftalmológicas provocadas pelo uso de lentes de contato (5, 50).

No Brasil, os dados epidemiológicos e relatos de casos de hialohifomicose por *P. lilacinum* são escassos (51, 52). Atribuímos essa escassez de dados devido ao desconhecimento da comunidade médico-científica com relação ao fungo, ocasionando dificuldades no seu isolamento e, por conseguinte, na sua classificação como agente causal. Em 2005, Hofling-Lima e colaboradores (51) fizeram uma análise da frequência e da etiologia das doenças oculares micóticas diagnosticadas no Laboratório de Doenças Externas Oculares da UNIFESP e mostraram o predomínio de infecções por fungos filamentosos sobre as leveduras, entre eles, *P. lilacinum*.

2.2.1 - Diagnóstico laboratorial e tratamento

A identificação morfológica tradicional, por meio da análise macro e micromorfológica das culturas é o padrão ouro para o diagnóstico da hialohifomicose. Entretanto, como dito previamente, a dificuldade no isolamento e o desconhecimento do agente etiológico constituem as principais dificuldades para a identificação de *P. lilacinum*. Alguns autores obtiveram sucesso na identificação do fungo utilizando a técnica de *PCR-real time* (53), em virtude de sua especificidade. Porém, a identificação molecular não é utilizada na rotina laboratorial.

O tratamento padrão para a hialohifomicose ainda não está definido, visto que *P. lilacinum* é resistente a diferentes antifúngicos. A anfotericina B, bem como a maior parte dos derivados azólicos (fluconazol, miconazol, entre outros), classicamente eficazes contra fungos filamentosos, segundo alguns autores (10), apresentam atividade considerada pobre contra *P. lilacinum*. Entretanto, de modo geral, triazólicos de nova geração como efinaconazol e

tavaborol (41), posaconazol (49) e voriconazol (4), têm apresentado bons resultados, especialmente, em pacientes imunossuprimidos (8, 54).

Nas formas oculares, o tratamento vai desde a aplicação de drogas tópicas, subconjuntivas ou intra-oculares, combinadas à administração de drogas sistêmicas e nos casos mais graves enucleação do globo ocular (50). No tratamento das infecções cutâneas e subcutâneas, o sucesso do tratamento foi alcançado com a administração sequencial e/ou associada de várias drogas (itraconazol, miconazol, fluconazol, cetoconazol, voriconazol, caspofungina e terbinafina), muitas vezes associada a procedimentos cirúrgicos (55, 56). Em alguns casos, o tratamento com itraconazol é bem sucedido, especialmente quando utilizado por pacientes imunocompetentes (57).

2.2.2 - Modelo experimental

P. lilacinum é considerado por alguns autores um fungo de virulência relativamente baixa, necessitando de alto inóculo e severa imunossupressão (10, 58, 59), para provocar uma infecção experimental em modelo animal. Entretanto, trabalhos publicados por nosso grupo demonstraram que *P. lilacinum* é capaz de infectar e causar doença nos modelos murinos BALB/c e C57BL/6, tanto em animais imunocompetentes quanto em animais imunossuprimidos, utilizando-se inóculos considerados baixos (17, 19). De acordo com Antas et al. (7), esses dados apontam para a necessidade de padronizar um inóculo eficiente no estabelecimento da infecção no modelo experimental, visando a melhor compreensão da virulência das espécies.

Alguns animais, além do camundongo, têm sido utilizados como modelos experimentais para a hialohifomicose provocada por *P. lilacinum*. Em

1979, Agrawal e colaboradores (60) observaram maior gravidade da infecção na córnea de coelhos tratados com acetato de hidrocortisona, em comparação aos não-tratados. Entretanto, Sponset et al., em 2006, (61) verificaram a eficácia de voriconazol em coelhos com ceratite provocada por *P. lilacinum*. Com base nesses dados, de acordo com Pujol et al. (59), o uso do modelo experimental é importante nos estudos de patogênese e interações entre o fungo e o hospedeiro, uma vez que, de modo geral, os fungos podem se comportar de formas totalmente diversas *in vivo* e *in vitro*, alterando suas características morfofisiológicas e até a resposta aos antifúngicos.

2.3 - Resposta Imune nas infecções fúngicas

2.3.1 – Introdução

Com o aumento no número de indivíduos imunossuprimidos, as doenças fúngicas têm emergido como a maior causa de doenças humanas (7, 11). Pacientes que desenvolvem deficiências imunológicas apresentam frequentemente micoses recorrentes e em alguns casos, desenvolvem formas graves, o que enfatiza a importância dos componentes do sistema imune no controle da infecção.

Embora haja uma escassez sobre a avaliação das respostas imunológicas contra *P. lilacinum*, acredita-se que, de uma forma geral, o principal mecanismo de defesa contra fungos é desenvolvido pelos fagócitos, que os destroem por meio da produção de NO e de outros componentes secretados por essas células (13).

2.3.2 – Vias de reconhecimento pelas células hospedeiras

O reconhecimento do fungo pelo sistema imune inato ocorre de maneira rápida, por meio de mecanismos constitutivos presentes nos sítios de interação contínua com fungos, e incluem a barreira de pele e mucosas, defensinas, colectinas e sistema complemento (13). O primeiro passo nesse processo envolve o reconhecimento dos PAMPs [β -1,3/1,6 glucanas, glucuronoxilomanana (GXM), fosfolipomananas e galactomananas] presentes na célula fúngica e são responsáveis por disparar a resposta inflamatória, pelos PRRs presentes na célula hospedeira(62).

Durante o curso da infecção fúngica, diversos PRRs são estimulados pelos PAMPs, em diferentes combinações que dependem tanto da espécie fúngica quanto da célula hospedeira. Por exemplo, a dectina1, que é um receptor de lectina do tipo C (CLR), é o principal PRR envolvido no reconhecimento de β -glucanas e após a ligação, induz a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (13). Células dendríticas (DC) e macrófagos (M ϕ) alveolares expressam DC-SIGN, um receptor que promove a ligação e internalização de conídios de *A. fumigatus* e células leveduriformes de *C. albicans* pela via das galactomananas (62).

TLR2, TLR4 e TLR9 são os principais receptores do tipo Toll (TLRs), envolvidos no reconhecimento de componentes fúngicos, como fosfolipomananas e DNA. Em geral, a ligação a esses receptores dependem da espécie fúngica, morfologia e rota de infecção. De forma semelhante aos CLRs, como receptores de manose e DC-SIGN, os receptores Toll facilitam a apresentação do antígeno pelas células dendríticas e modulam a resposta das células T (13).

No contraponto da relação parasito-hospedeiro, os fungos possuem mecanismos de escape da resposta imune inata, como por exemplo, bloqueio do reconhecimento de β -glucanas e inibição da opsonização (63, 64). Conídios de fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp. estimulam os receptores TLR2 e TLR4 a induzir uma resposta Th1, enquanto as hifas levam à redução do reconhecimento por TLR4, permanecendo intacta a sinalização dos TLR2, o que estimula a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (65, 66). Essas espécies podem ainda manter os conídios viáveis por mais tempo quando internalizados pelas células epiteliais, e quando internalizados por fagócitos “profissionais” como os macrófagos (M ϕ) são capazes de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, gerando uma resposta exacerbada que vai culminar em dano ao hospedeiro (13).

A eficácia da resposta imune depende da ação coordenada das imunidades inata e adaptativa. DCs são excepcionalmente hábeis em decodificar a informação associada ao fungo e a capacidade desses subtipos celulares em ativar diversas vias de sinalização, conferem a essas células a propriedade de modelar a resposta das células T. Por exemplo, DCs inflamatórias iniciam as respostas do tipo Th₂ e Th₁₇, por meio da via de sinalização envolvendo TLRs, enquanto DCs tolerogênicas ativam as respostas Th₁ e de células T regulatórias (T_{reg}) (13).

Uma resposta predominantemente Th₁, caracterizada pela produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α , está relacionada com a imunidade protetora contra as infecções fúngicas. Em contraste, a resposta do tipo Th₂, caracterizada pela produção de IL-4, IL-6 e IL-13, pode promover efeitos deletérios, como respostas alérgicas ou infecção crônica (62). A ativação da resposta Th₁ é

determinada pela resposta das DCs à combinação dos TLRs e CLRs e dos PAMPs presentes no fungo. Por meio da produção de IFN- γ e indução da produção de anticorpos opsonizantes, as células Th₁ coordenam a ativação de fagócitos nos sítios da infecção (13).

Considerando a resposta Th1 como a mais adequada contra as infecções fúngicas, faz-se necessário compreender o papel das citocinas pró-inflamatórias no *design* da resposta imunológica. IFN- γ , por exemplo, é uma citocina que aumenta as defesas do hospedeiro promovendo atividade de células mononucleares e fagócitos polimorfonucleares que são críticos na defesa contra fungos filamentosos (67). Bellochio e colaboradores (68) demonstraram que pacientes infectados com *Aspergillus* spp. que desenvolveram uma resposta Th2, com aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10, apresentaram uma supressão da atividade efetora de macrófagos devido à diminuição da produção de IFN- γ , bem como a atividade linfoproliferativa de linfócitos pela supressão de IL-2, culminando em quadros de alergia e infecção progressiva. Esses dados corroboram os resultados de Calish e Kashino (69), que em modelo murino experimental para o estudo de paracoccidiodomicose, demonstraram que a secreção de IFN- γ e TNF- α , seguidas da secreção de IL-2, desempenham um papel fundamental nos mecanismos de resistência contra *Paracoccidioides brasiliensis*. Em contraste, a secreção mais tardia dessas citocinas pró-inflamatórias associada à secreção de IL-5, IL-10 e TGF- β caracterizaram a doença progressiva nos animais.

A importância do TNF- α no controle das infecções fúngicas pode ser demonstrado em pacientes que desenvolvem artrite reumatóide e fazem uso de

antagonistas dessa citocina no tratamento (70, 71). Sabe-se que esses pacientes ficam suscetíveis às infecções por *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., uma vez que TNF- α é liberado em resposta contra fungos e estimula a expressão de citocinas e moléculas de adesão de linfócitos que leva ao recrutamento de neutrófilo e fagócitos envolvidos no *clearance* da infecção (71).

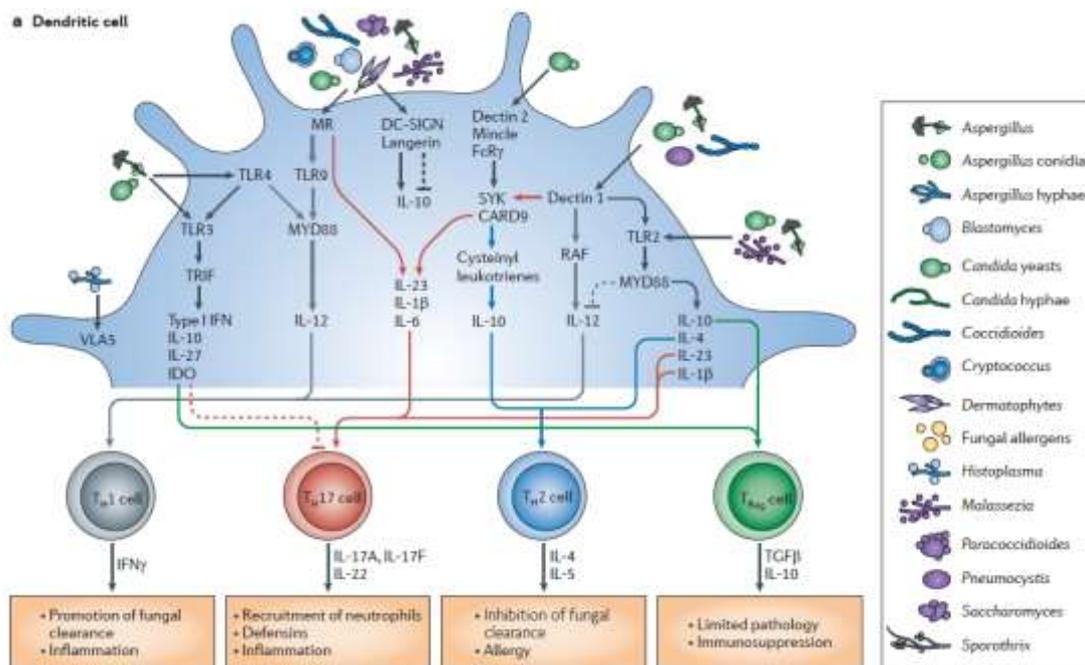


Figura 2. Diferenciação de células TCD4 em resposta à infecção fúngica. A figura descreve os fatores de transcrição envolvidos, citocinas produzidas e possíveis funções efetora e regulatória induzidas pela interação dos linfócitos com as células dendríticas (DCs). A habilidade das DCs em responder aos fungos a partir de diversas vias de sinalização intracelular que refletem a ligação entre PRRs e PAMPS, confere plasticidade ao sistema e contribui para a modelagem da resposta de células T (Adaptado de Romani, 2011).

2.3.3 – Composição do infiltrado inflamatório

Os infiltrados inflamatórios nas infecções cutâneas provocadas por fungos, de maneira geral, são constituídos por linfócitos, neutrófilos e

macrófagos. São observadas reações granulomatosas, muitas vezes supurativas, dependentes do “status” imunológico do paciente (72).

Miranda et al. (73) avaliando gatos naturalmente infectados com *Sporothrix* spp., demonstraram também experimentalmente em camundongos imunossuprimidos que a esporotricose estimula o desenvolvimento de granulomas com fagócitos que são incapazes de destruir as células fúngicas. Os mesmos autores observaram, ainda, que a inibição das funções dos macrófagos aumentou a susceptibilidade do hospedeiro, corroborando os dados de Antachopoulos e Roilides (14), que citam a participação de G-CSF, M-CSF e GM-CSF, glicoproteínas importantes para a produção e ativação de fagócitos que são cruciais na defesa contra fungos. Anteriormente, em 2007, Sá e colaboradores demonstraram também a presença de células de Langerhans no tecido cutâneo de pacientes portadores de cromoblastomicose, apontando que a persistência do fungo no tecido está relacionada à ativação de linfócitos e produção de óxido nítrico (74).

Com relação às formas cutâneas da hialohifomicose provocada por *P. lilacinum*, diversos autores descrevem a presença de infiltrados inflamatórios mistos nas lesões dos pacientes, compostos por macrófagos, neutrófilos e DCs (8, 75, 76). Uma vez que as infecções cutâneas constituem a maior parte dos casos de hialohifomicose provocada por fungos, é necessário ressaltar a importância dessas células na fagocitose e apresentação de antígenos e, conseqüentemente, na eficiência da resposta adaptativa (14).

2.3.4 – Imunossupressão: a ação da dexametasona e o impacto na infecção por *P. lilacinum*

A dexametasona é um glicocorticóide (GC) sintético com mecanismos de ação idênticos ao do cortisol (ou hidrocortisona), o qual é o mais importante corticosteróide natural produzido pelo córtex da glândula supra-renal. Comparado ao hormônio, a droga apresenta maiores potência antiinflamatória e efeitos miopáticos e tempo de ação prolongados (77).

Um dos mecanismos de ação dos glicocorticóides é a transrepressão, por meio do qual monômeros e receptores de GC interagem com fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator nuclear kB (NF-kB), por interação proteína-proteína e promovem efeito inibitório de suas funções. Por essa via, por exemplo, a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-6, TNF- α e prostaglandinas é reduzida (77).

De acordo com Lionakis e Kontoyiannis (78), glicocorticóides afetam o número de leucócitos mononucleares, provocando linfopenia e monocitopenia reversíveis. A droga afeta principalmente a imunidade celular, qualitativa e funcionalmente, depletando linfócitos TCD4⁺ circulantes, e em menor escala, TCD8⁺, além de monócitos, macrófagos e polimorfonucleares. Os autores afirmam ainda, que a ativação, proliferação e migração de linfócitos é prejudicada, bem como favorece uma resposta predominantemente Th2, por meio do aumento na síntese de IL-4, IL-5 e IL-10 e diminuição das citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-12.

A corticoterapia provoca importantes impactos na imunomodulação da resposta imune a fungos, uma vez que prejudica consideravelmente a efetividade da resposta Th1 nessas infecções (12). Em 2012, de Sequeira (18)

demonstrou no modelo murino que drogas imunossupressoras como a dexametasona interferem nas respostas linfoproliferativas provavelmente pela redução na síntese de IL-2, essencial para a expansão clonal dos linfócitos ativadas, especialmente TCD4⁺. Desta forma, é possível que na infecção por *P. lilacinum* uma menor disponibilidade de IL-2 favoreça a redução de IL-1 pelos macrófagos regulando negativamente os mediadores pró-inflamatórios, como IFN- γ (18).

De acordo com estudos realizados por nosso grupo (17,18), a hialohifomicose provocada por *P. lilacinum*, com apresentação de quadros clínicos, na maioria dos animais inoculados requer a imunossupressão dos camundongos. Ao contrário dos imunocompetentes, os animais imunossuprimidos apresentaram mortalidade mais acentuada, perda de peso, alterações de comportamento e maior suscetibilidade à infecção, comprovada pela presença de alterações histológicas e lesões aparentes, além de aumento significativo da carga fúngica no baço dos camundongos desse grupo.

2.3.5 – Subpopulações de linfócitos importantes na hialohifomicose provocada por *P. lilacinum*

- Linfócitos T

Linfócitos T representam um importante componente da resposta imune do hospedeiro às infecções fúngicas, uma vez que pacientes com AIDS ou demais quadros de imunossupressão são altamente suscetíveis a fungos patogênicos ou oportunistas, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis jiroveci* e *Purpureocillium lilacinum* (79).

TCD4⁺ - Como exposto anteriormente, o papel dos linfócitos TCD4⁺ no controle inicial das infecções contra fungos é bem definido. A diferenciação de células T CD4⁺ virgens em células T “helper” específicas depende da apresentação de antígenos pelas APCs, do acoplamento de moléculas co-estimulatórias e é influenciado por citocinas produzidas na resposta inicial ao antígeno (80).

As duas maiores subpopulações de linfócitos TCD4, Th1 e Th2, são caracterizados por diferentes padrões de produção de citocinas e têm diferentes papéis na resposta imune. Cada subpopulação induz funções que podem ser efetivas contra certos patógenos e ineficazes ou patológicas contra outros (81).

Com base em evidências clínicas e dados experimentais, podemos inferir que o estabelecimento de um modelo Th1/Th2 está diretamente ligado a quadros de resistência ou suscetibilidade. Células Th1 secretam IFN- γ , TNF- α e IL-2 e essas citocinas intervêm em respostas celulares, como hipersensibilidade tardia e ativação de macrófagos, desempenhando um papel central na resistência a patógenos intracelulares, como fungos. No entanto, células Th2 estão envolvidas em respostas humorais e alérgicas, por meio da secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, citocinas que estimulam a produção de anticorpos importantes no combate à patógenos extracelulares. Além disso, a resposta Th2 inibe o desenvolvimento das atividades biológicas de Th1 (82, 83).

TCD8⁺ - Apesar do papel central de linfócitos TCD4⁺ na imunidade contra as infecções fúngicas há evidências de que linfócitos TCD8⁺ também

possam mediar uma resposta protetora contra fungos, especialmente em casos de falhas na função efetora de TCD4⁺, como por exemplo, em quadros de imunossupressão (18,82). Particularmente, tem sido demonstrado que células TCD8⁺, de forma semelhante às TCD4⁺, apresentam plasticidade na sua capacidade de regular a imunidade antifúngica, agindo diretamente nos sítios da inflamação, por meio de mecanismos citotóxicos dependentes da liberação de perforinas e granzimas. Podemos citar como exemplo as infecções por *Aspergillus fumigatus*, nas quais é sugerido que sua ação citotóxica confira imunidade nos casos de aspergilose invasiva (82).

T_{regs} - Ainda com relação ao papel de linfócitos TCD4⁺, no *clearance* da infecção fúngica, devemos considerar que o sistema imune não se mantém inerte à presença de fungos comensais ou parasitas, e, portanto, é necessário um equilíbrio no fino balanço entre os processos Th1/Th2 (13). Nesse contexto, as células T regulatórias (T_{regs}), uma subpopulação de linfócitos T especializados, são responsáveis por manter a homeostase pela supressão, ativação, proliferação e função efetora, bem como a produção de citocinas, de diversas células. A habilidade de controlar a resposta imune torna essa subpopulação importante no controle de doenças autoimunes, alergias, bem como a manutenção da tolerância à enxertos e ao feto durante a gravidez (84).

Essa população celular se caracteriza pelo fenótipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e é amplamente categorizada em dois grupos: T_{regs} naturais e T_{regs} induzidas. As T_{regs} naturais são originadas no timo durante os estágios fetal e neonatal iniciais de desenvolvimento das células e são potencialmente capazes de reconhecer auto-antígenos. Uma vez geradas, essas células são exportadas

para os tecidos periféricos, onde previnem a ativação de outras células T autorreativas que têm potencial de se desenvolver em células efetoras(85).

Células T regulatórias naturais expressam ainda a molécula co-estimulatória CTLA-4 (“cytotoxic T-lymphocyte antigen-4”) e fator de necrose tumoral (TNF) da superfamília GIRT (“glucocorticoid-induced TNF receptor”). Diferentemente das células T convencionais, que regulam positivamente a expressão de CD25 após a ativação, essa subpopulação mantém a expressão de CD25, provavelmente devido à ligação contínuo dos seus TCRs à auto-antígenos na periferia sob condições normais não inflamatórias (85).

De modo similar, células T_{regs} induzidas se originam no timo, porém, derivam de populações clássicas de linfócitos T ou das T_{regs} naturais. A expressão de CD25 nessas células é variável, dependendo da forma de apresentação da doença e do sítio de atividade regulatória. Além disso, a função das T_{regs} induzidas é dependente de citocinas imunossupressoras, especialmente IL-10 (85, 86).

Apesar de ambos os subtipo se originarem no timo, as T_{regs} induzidas necessitam de exposição ao antígeno num contexto imunológico distinto para se diferenciarem. Por exemplo, a exposição antigênica por via intranasal ou oral, parece induzir seletivamente o surgimento desse fenótipo celular. Além disso, diferentemente das T_{regs} naturais, que apresentam funcionalidade como consequência de uma ligação forte dos TCRs, o desenvolvimento de células regulatórias na periferia pode ser desencadeado por antígenos de baixa afinidade ou alterações no sinal de transdução dos TCRs (85, 87, 88).

As T_{regs} podem suprimir uma diversidade de células do sistema imune, incluindo TCD4⁺, TCD8⁺, Natural killers (NK), linfócitos B e APCs. Essas

células são capazes de suprimir as funções de linfócitos T virgens convencionais, bem como células T efetoras e de memória. Além disso, as T_{regs} suprimem sua proliferação diretamente, sem a presença de um antígeno apresentado pelas APCs (87).

Um dos mecanismos utilizados por essas células para perfazer a imunossupressão é a morte direta de células efetoras, uma vez que, após a ativação, células T regulatórias naturais expressam serino protease granzima A (humano) e B (camundongo) e depletam células T convencionais perforina-dependentes suprimindo a interação CD95-CD95L. Entretanto, o principal mecanismo de supressão das Tregs consiste na ativação das APCs, por meio da expressão de CTLA-4, que competitivamente inibe a ligação de CD28 com seus ligantes CD80 e CD86, que são regulados negativamente, impedindo, desta forma, o sinal co-estimulatório das células efetoras (84,87).

T_{regs} não apenas reduzem a função apresentadora de antígenos das APCs, mas também criam um ambiente imunossupressor por meio da redução de IL-6 e aumento da produção de IL-10 pelas DCs. Além disso, T_{regs} podem produzir grandes quantidades de TGF- β , que funciona como um inibidor da via TCR/CD3 e induzindo células T convencionais a apresentarem um fenótipo imunossupressor com a expressão de FoxP3. Outra via de silenciamento da atividade efetora das células do sistema imune mediada por citocinas é a adsorção da IL-2 no ambiente por meio da superexpressão de CD25 (84).

No que se refere à função regulatória dessas células nas infecções fúngicas, foi demonstrado em 2014 por Baker e colaboradores (89) o papel fundamental dessas células em infecção humana, de indivíduos saudáveis, por *Aspergillus fumigatus*. Nessa população, a expansão de T_{regs} funciona como

um mecanismo efetivo de prevenção da ativação de uma resposta imune inapropriada, enquanto em indivíduos alérgicos, células Th2 específicas são fortemente expandidas apesar da presença de T_{reg}. Também em 2014, Schulze e colaboradores (90), utilizando modelo experimental BALB/c depletado de T_{regs}, demonstraram que na infecção por *Cryptococcus neoformans*, estes camundongos desenvolveram uma resposta Th2, com produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-13, o que promoveu um quadro de extensa pneumonia, ao contrário dos camundongos selvagens, cuja efetividade das células T regulatórias levou ao controle da infecção.

- Linfócitos B

Linfócitos B são importantes componentes da resposta imune adaptativa, que desempenham suas funções protetoras por meio da secreção de milhares de anticorpos diferentes, especializados no reconhecimento de diferentes antígenos (82).

Independentemente do claro papel da imunidade celular na defesa do hospedeiro contra a maioria, senão todos os fungos (91), e do pouco conhecimento acerca dos mecanismos por meio dos quais a resposta imune humoral atua no combate a essas infecções, diversos autores propõem que os anticorpos possam desempenhar funções importantes na ativação do sistema imune. Essa atuação seria por meio da opsonização e auxílio à fagocitose, através da limitação do crescimento das hifas presentes no interior dos fagócitos e agindo como neutralizadores de proteases ou toxinas produzidas pelos fungos e ativando o sistema complemento (91-93).

No trabalho publicado por nosso grupo em 2013 (19), foi demonstrada a produção de anticorpos específicos contra *P. lilacinum*, em modelo murino. É interessante notar que mesmo em títulos mais baixos, comparados aos camundongos imunocompetentes, os animais imunossuprimidos foram capazes de produzir anticorpos específicos, sugerindo que a ação da dexametasona não foi capaz de inibir por completo a imunidade humoral. Quanto ao papel dos anticorpos na infecção fúngica, os camundongos imunocompetentes, embora tenham permanecido células fúngicas viáveis no organismo até 45 dias após a infecção, em sua maioria não desenvolveram a hialohifomicose com sinais clínicos aparentes. Sendo assim, apesar de o conceito de que a imunidade celular seja o principal mecanismo de defesa contra patógenos intracelulares, se aceita, atualmente, a idéia de que certos tipos de anticorpos possam ser protetores (13,94).

2.3.6 – Memória celular

Outro mecanismo importante da resposta imune celular é a formação de células de memória. A definição clássica de memória imunológica destaca as propriedades de algumas populações celulares em reconhecer um estímulo antigênico prévio e responder mais rápida e vigorosamente a uma segunda exposição, conferindo proteção imediata (94, 95).

Linfócitos T virgens podem ser caracterizados pela expressão recíproca de CD45RA ou CD45RO. Geralmente, as células virgens CD45RA+/CD45RO- representam a população mais heterogênea de linfócitos e migram através dos órgãos linfóides secundários, nos quais ocorre a apresentação dos peptídeos antigênicos pelas DCs. Após o reconhecimento, proliferam e dão origem a uma

progênie de células efetoras (CD45RO⁺), dependentes de condições estimulatórias e das citocinas do ambiente (94). Durante esse processo de diferenciação, as funções efetoras e potencial de migração dessas células são regularmente coordenados e após a erradicação do patógeno, a maioria de células T efetoras morrem, deixando um “pool” heterogêneo de células de memória, dividido em subgrupos com base em sua função efetora, capacidade proliferativa e potencial de migração (94). Esses subtipos são definidos pela expressão dos “*homing receptors*” CCR7 e CD62L de acordo com suas propriedades e categorizados em memória central (T_{CM}), memória efetora (T_{EM}) e memória residente (T_{RM}) (96).

Células de memória central expressam CD62L e CCR7 e podem produzir IL-2 e proliferar intensamente. Comparadas aos linfócitos virgens (CD45RA), as células de memória central possuem maior sensibilidade ao estímulo antigênico, dependem menos de co-estímulo e regulam positivamente CD40L, promovendo maior *feedback* às DC e linfócitos B. Depois do estímulo primário, essas células produzem principalmente IL-2, mas após a proliferação se diferenciam em células efetoras Th1 ou Th2 (97).

Em contrapartida, células de memória efetora (T_{EM}) perdem ou reduzem a expressão de CCR7 e CD62L, o que indica a migração desses linfócitos para o tecido inflamado. Comparadas às T_{CM}, as T_{EM} se caracterizam por sua rápida função efetora e por serem menos proliferativas (84,96). CD8 T_{EM} ou T_{EMRA} (expressam CD45RA) carregam grandes quantidades de perforina e ambos, CD4 e CD8, produzem altos níveis de IFN- γ e IL-4, IL-4 e IL-5 poucas horas após o estímulo antigênico.

Recentemente, o fenótipo CD62L⁻/CCR7⁻ tem sido descrito com o das células de memória residente. Essas populações são encontradas nos epitélios, mucosas intestinal e vaginal, glândulas salivares, vias aéreas, cérebro e gânglios (CD8), bem como no parênquima pulmonar (CD4) (98).

Para compreendermos a heterogeneidade fenotípica dessas células, é importante destacar as moléculas implicadas nos processos de formação da memória celular. *Chemokine receptor 7* (CCR7) é um receptor de quimiocinas que contém domínios transmembrana e medeia seus sinais por meio da proteína heterotrimétrica G, expresso em DCs maduras e semi-maduras, tímócitos durante estágios específicos do seu desenvolvimento, linfócitos T e B virgens, Tregs e células de memória. O receptor também é expresso em diferentes células não imunes, especialmente em diversos tipos de tumores malignos (99, 100). CCR7 controla, ainda, a migração de células para órgãos linfóides secundários, tecidos inflamados e subsequentemente, seu posicionamento de acordo com o compartimento funcional definido (99).

O segundo receptor, CD62L, é uma L-selectina que atua na entrada de leucócitos tanto nos tecidos linfóides secundários através das vênulas endoteliais altas (HEV) como em tecidos não linfóides inflamados (101). A expressão de CD62L em células T virgens é necessária para sua recirculação no sangue e linfonodos. Através da adesão por rolamento, essa molécula desacelera o tráfego dos linfócitos pelo acoplamento dos ligantes expressos nas vênulas endoteliais altas. Em consequência disso, uma cascata de sinalização desencadeada pela ativação de linfócitos CCR7⁺ leva à ligação e transmigração dos linfócitos ao linfonodo (102).

Por analogia a estudos humanos, cujas células de memória central são CD45RO⁺ e expressam, constitutivamente, CCR7 e CD62L, nos modelos murinos as células de memória podem ser subdivididas segundo o fenótipo apresentado: T_{CM}, que são CCR7^{high}CD62L^{high}CD44^{high} e T_{EM} CCR7^{/low}CD62L^{/low}CD44^{high} (101). CD44 é uma glicoproteína polimórfica expressa na superfície de muitos tecidos e linhagens celulares, implicada em diversas funções incluindo o retorno dos linfócitos aos tecidos linfóides, ativação de leucócitos, linfopoiese e metástase tumoral. Essa molécula intervém na ligação entre células e a matriz extra celular via ácido hialurônico e após ativação dos linfócitos T virgens, a alta expressão de CD44 permanece nas células de memória (103, 104). Baaten e colaboradores (104) reportam que a expressão de CD44 é essencial para a geração de células Th1 de memória por promover a sobrevivência das células efectoras, porém, essa dependência não é encontrada em perfis Th2, Th17 ou em células TCD8⁺, apesar da expressão similar desse marcador.

Nas infecções fúngicas, a despeito da importância das células TCD4⁺ de memória, trabalhos demonstram que, na ausência dessas células, linfócitos TCD8⁺ efetores podem mediar a resistência aos fungos. Essas células podem se diferenciar em células de memória de longo termo e manter-se na circulação, mesmo na ausência do “*help*” de TCD4⁺, bem como retêm a capacidade de produzir citocinas (105, 106).

3. OBJETIVOS

3.1– Objetivo geral

Analisar a infecção e avaliar a importância da manutenção da resposta imune celular, sistêmica e *in situ*, de camundongos C57BL/6, imunocompetente e imunossuprimidos, desafiados com conídios de *Purpureocillium lilacinum*.

3.2– Objetivos específicos

a) Estudar a evolução da infecção fúngica nos modelos competentes e suprimidos.

b) Descrever as lesões cutâneas e sistêmicas envolvidas durante o curso da infecção.

c) Caracterizar fenotípica e funcionalmente a resposta imune, sistêmica e *in situ*, dos animais infectados correlacionando à infecção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Isolado de *Purpureocillium lilacinum*

O isolado utilizado nesse trabalho, denominado PL.P, proveniente de biopsia de pele de paciente humano, foi gentilmente cedido por Dra. Annete Fothergill do *Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center de San Antonio*, Estados Unidos. Está depositado na Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos do Instituto Oswaldo Cruz sob o código IOC-4665.

4.2 - Condições de cultivo e preparo da suspensão de conídios

O fungo foi cultivado em meio líquido BD (batata dextrose), à temperatura ambiente e sob agitação (100rpm) por dez dias, para esporulação. Os conídios produzidos foram separados do micélio por filtração e centrifugados por 15 min a 380 x g. Para as lavagens foi utilizada solução salina tamponada com fosfato (PBS 50 mM, pH 7,2) (107) e ressuspensão do “pellet”, posteriormente quantificado em câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi avaliada por unidade formadora de colônia (UFC) (108).

4.3 - Animais e inoculação

Duzentos e noventa e seis camundongos C57BL/6, SPF, machos, de seis a oito semanas de idade, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) e pesando aproximadamente 21 g foram utilizados nesse estudo.

Os camundongos, em número de cinco por caixa, conforme preconizado pela CEUA (FIOCRUZ) foram mantidos em micro-isoladores de polipropileno autoclaváveis, contendo camas de maravalha de Pinus e receberam ração e água filtrada autoclavadas *ad libitum*. Os micro-isoladores foram dispostos nos *racks* ventilados ALESCO, com medidas de troca de ar de 350 m³/h, com umidade e temperatura ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) controladas.

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após licenciamento do projeto pelas Comissões de Ética para o Uso de Animais da Fiocruz e do Instituto Oswaldo Cruz, sob os números LW-20/13 e L-031/2015, respectivamente.

Os animais foram divididos da seguinte forma por experimento: 100 para avaliação da infecção e resposta imune sistêmicas, e 48 para avaliação da infecção subcutânea resposta imune *in situ* e a partir daí, subdivididos nos seguintes grupos:

Experimento 1 – Avaliação da infecção e resposta imune (por citometria de fluxo) sistêmicas

Grupo CI₁ – 30 camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum*, 18 utilizados para os experimentos imunológicos e 12 para a curva de sobrevivência;

Grupo CC₁ - 15 camundongos imunocompetentes inoculados com PBS, 9 utilizados para os experimentos imunológicos e 6 para a curva de sobrevivência;

Grupo SI₁ - 30 camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinum*, 18 utilizados para os experimentos imunológicos e 12 para a curva de sobrevivência;

Grupo SC₁ - 15 camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS, 9 utilizados para os experimentos imunológicos e 6 para a curva de sobrevivência.

Grupo CI/SI₁ - 6 camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum*, observados por 21 dias e posteriormente imunossuprimidos.

Grupo CC/SC₁ - 4 camundongos imunocompetentes inoculados com PBS, observados por 21 dias e posteriormente imunossuprimidos.

Experimento 2 – Avaliação da infecção subcutânea e resposta imune (por imunohistoquímica) *in situ*

Grupo CI₂ - 16 camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum*;

Grupo CC₂ - 8 camundongos imunocompetentes inoculados com PBS;

Grupo SI₂ - 16 camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinum*;

Grupo SC₂ - 8 camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS;

A imunossupressão dos camundongos (grupos SI₁, SC₁, SI₂ e SC₂) foi realizada por via oral, pela administração na água, de solução estéril contendo fosfato dissódico de dexametasona na concentração de 1mg/kg e tetraciclina a 1000 mg/L (cada camundongo ingere aproximadamente 5mL de água). O tratamento foi iniciado três dias antes da inoculação experimental com o isolado fúngico e até o final do experimento (17). Para os grupos CI/SI₁ e CC/SC₁, os animais foram imunossuprimidos utilizando a mesma solução

descrita acima, porém, a imunossupressão foi iniciada no 21º dia após a inoculação até o 35º dia, final do experimento.

No experimento 1 (infecção e resposta imune sistêmicas), a inoculação foi realizada por via intravenosa, no plexo retro-orbital do olho direito. Após a utilização de 01 gota de colírio anestésico à base de cloridrato de proximetacaína 0,5%, os grupos CI1, SI1 e CI/SI1 foram inoculados com 0,02 mL da suspensão de células (109), contendo 1×10^5 conídios de *P. lilacinum*. Os grupos controle (CC1, SC1 e CC/SC1) foram inoculados com PBS. Em cada ponto de observação (dias 7, 14 e 21), seis animais dos grupos CI₁ e SI₁ e três dos grupos CC₁ e SC₁ foram submetidos à eutanásia. Os camundongos utilizados para a curva de sobrevivência e os pertencentes aos grupos CI/SI₁ e CC/SC₁ foram todos submetidos à eutanásia no 35º após a inoculação.

No experimento 2 (infecção subcutânea e resposta imune *in situ*) os animais foram inoculados por via subcutânea na base da cauda. Os camundongos, em posição dorso-ventral, foram inseridos em contensor de acrílico e, após tricotomia da região da base da cauda, os grupos CI₂ e SI₂ foram inoculados com 0,02 mL da suspensão de células, contendo 1×10^5 conídios de *P. lilacinum*. Os grupos controle (CC₂ e SC₂) foram, similarmente, inoculados com PBS. Em cada ponto de observação (dias 1,3,5 e 7), quatro animais dos grupos CI₂ e SI₂ e dois dos grupos CC₂ e SC₂ foram submetidos à eutanásia.

Ambos experimentos foram repetidos uma vez para confirmação de sua reprodutibilidade.

4.4 - Sinais clínicos

A análise dos sinais clínicos consistiu na observação das alterações de peso, comportamento (mobilidade, isolamento e vocalização), lesões cutâneas e/ou oculares dos grupos CI₁ e SI₁ durante os 21 dias seguintes à inoculação, e comparada aos seus respectivos grupos controle (CC₁ e SC₁). Os grupos CI/SI₁ e seu controle CC/SC₁ foram avaliados 35 dias após a inoculação. Com exceção do peso, todos esses parâmetros foram também observados nos grupos CI₂ e SI₂ (experimento 2) até o 7^o dia após a infecção.

4.5 - Sobrevivência

Os animais dos grupos CI₁ e SI₁ destinados à avaliação do tempo de sobrevivência foram observados pelos 35 dias subsequentes à inoculação. A mortalidade de cada um dos grupos anotada diariamente.

4.6 - Unidades formadoras de colônia (UFC)

No mesmo momento da necropsia, o baço dos camundongos do experimento 1 (infecção e resposta imune sistêmicas) inoculados com *P. lilacinum* (grupos CI₁, SI₁ e CI/SI₁) foi retirado assepticamente, pesado, macerado e homogeneizado em meio RPMI estéril. A suspensão foi ajustada para 2 mg de tecido/mL e amostras de 150 µl de cada homogeneizado foram semeadas em placas de Petri contendo meio Agar Mycosel. Isto foi feito para determinar o número de células fúngicas viáveis (unidades formadoras de colônias - UFC) no órgão. As placas foram incubadas por 60 dias, à temperatura ambiente.

O baço dos camundongos utilizados como controle (grupos CC₁, SC₁ e CC/SC₁) foram processados da mesma forma.

4.7 - Obtenção do sangue e necropsia

Seis camundongos dos grupos CI₁ e SI₁ e três camundongos dos grupos CC₁ e SC₁ (controles) foram pesados e anestesiados. Foi utilizado cloridrato de quetamina a 10% associado ao cloridrato de xilazina a 2% para a obtenção de amostras de sangue por meio de punção cardíaca nos 7^o, 14^o e 21^o dias pós-inoculação. Em seguida, os camundongos foram submetidos à eutanásia por exposição ao CO₂. Os animais foram imobilizados em decúbito dorsal em suporte de dissecação e após exame do pêlo, pele e mucosas para verificar a presença de lesões dermatológicas e focos inflamatórios, foi realizada assepsia com solução alcoólica de iodo a 10% (v/v), e abertas as cavidades torácica e abdominal. Neste momento, foram investigadas alterações macroscópicas como cor, consistência, tamanho e possíveis lesões nos diferentes órgãos e foram retirados assepticamente o fígado, o baço e os pulmões. Nos animais que apresentaram lesões aparentes na pele foram retirados fragmentos de aproximadamente 3mm de diâmetro que foram semeados em meio Agar Mycosel para confirmação da presença do fungo pela cultura.

4.8 - Análise histológica e imunohistoquímica

O fígado, os pulmões e os tecidos coletados dos animais do experimento 1 (infecção e resposta imune sistêmicas) foram fixados em solução de formalina tamponada com fosfato a 10%; desidratados em solução alcoólica

crescente de 70 a 90%, 60 min cada, e submetidos à inclusão em parafina para o exame histológico. Os cortes dos tecidos foram montados em lâminas e corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (H&E), pelo método de Grocott (impregnação pela prata) e pela coloração ácido periódico-Schiff (PAS) para a realização das análises.

Os camundongos utilizados no experimento 2 (infecção subcutânea e resposta imune *in situ*) foram submetidos à eutanásia por exposição ao CO₂ e após assepsia da região, foram retirados cirurgicamente fragmentos de pele de aproximadamente 3 mm de diâmetro ao redor do ponto de inoculação. A amostra foi dividida em duas partes, para análise histológica e imunohistoquímica. A porção destinada às análises histológicas foi processada como descrito para o experimento 1, enquanto a porção destinada a imunohistoquímica foi embebida em resina OCT e armazenada em freezer -80°C. Em seguida, os cortes foram montados em lâminas silanizadas (três cortes em cada lâmina), fixados em acetona e mantidas em freezer -80°C até o momento da marcação com anticorpos específicos. Primeiramente, as lâminas foram hidratadas em PBS seguida da inibição da peroxidase endógena com solução contendo peróxido de hidrogênio (Dako – California, USA) durante 10 min à temperatura ambiente. Os cortes foram submetidos a duas lavagens em PBS durante 5 min cada e para a inibição de ligações inespecíficas foram incubados em solução contendo BSA 0,4% por 20 min à temperatura ambiente. Após, foram adicionados os anticorpos específicos anti-iNos, anti-IL-1 β , anti-elastase neutrofílica e anti-CD68 por 18h a 4°C. O controle da reação foi realizado pela supressão do anticorpo primário em um dos cortes em cada lâmina. Ao término da incubação, foram realizadas 2 lavagens em solução

PBS, 5 min cada, seguidas de incubação com anticorpo biotinilado anti-coelho (Dako – California, USA) por 25 min, e mais 2 lavagens com PBS. Os cortes foram incubados com estreptavidina-peroxidase por 25 min e após 2 lavagens com PBS, a reação foi revelada utilizando o kit AEC (Invitrogen – California, USA). Após a visualização da marcação em microscópio óptico (Nikon eclipse E400), a reação foi interrompida com água tipo II e feita a contra coloração com hematoxilina de Meyer (Sigma – Missouri, USA) seguida da montagem em Faramount medium (Dako – California, USA). Os cortes foram avaliados em microscópio óptico, e os resultados expressos em percentual de células positivas ou percentual de campos marcados dependendo da molécula avaliada, como discriminado nas legendas das figuras. Foram avaliados 500 células ou 20 campos em aumento 400X por meio do *software* ImageJ.

4.9 - Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A suspensão de células do baço, descrita no item 4.6, foi utilizada também para a obtenção de células mononucleares. As hemácias foram lisadas pela adição de 3 μ l de tampão de lise (0,1M NH_4Cl , pH 7.15) por baço e a concentração celular foi ajustada para 1×10^7 células por mL. Foram transferidos 100 μ l das amostras nos poços de placas de 96 poços. Após 2 lavagens consecutivas com tampão de coloração gelado FACS (PBS, 0,1% de BSA, 0,01% de azida sódica) e centrifugação por 10 min em 670 x g, a 4°C, foram adicionados às amostras 20 μ l de tampão de bloqueio (PBS, BSA 0,1%, azida sódica 0,01% e Molico 5%) contendo o anticorpo 2.4G2, para bloqueio de receptores Fc- γ , por 5 min a 4°C. Posteriormente, foram adicionados os anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos, de acordo com a análise

proposta, descritos na tabela 1. A seguir é apresentada a metodologia de cada marcação:

a) Marcação extracelular de linfócitos T de memória

Foram adicionados anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, anti-CD62L, anti-CD197 (CCR7) em tampão de bloqueio distribuídos em 20µl/amostra, incubados por 30 min a 4°C. Após lavagens com tampão FACS, as amostras foram fixadas com tampão cytofix-cytoperm (BD – New Jersey, USA) por 20 min a 4°C e novamente lavadas e ressuspensas em 150µl/amostra de tampão FACS.

b) Expressão de FoxP3

Para verificar a expressão do fator de transcrição FoxP3, inicialmente, foi feita a marcação extracelular com anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 em tampão de bloqueio distribuídos em 20µl/amostra, incubados por 30 min a 4°C. Após lavagens com tampão FACS, as células foram permeabilizadas com 100µl/amostra de tampão fix-perm FoxP3 por 45 min a 4°C. Foram realizadas lavagens com tampão perm-wash FoxP3 e as amostras ressuspensas em 100µl de perm wash contendo o anticorpo anti-FoxP3 por 30 min a 4°C. Posteriormente, foram realizadas lavagens com tampão de permeabilização e as amostras ressuspensas em tampão de permeabilização/bloqueio por 60 min a 4°C. Seguida a essa etapa, também foi realizada a marcação intracelular para verificar a produção de IL-10. Para isso, foi adicionado o anticorpo anti-IL-10 em 20µl/amostra de tampão de bloqueio, incubado por 30min a 4°C e após

foram realizadas lavagens e ressuspensão em 150µl/amostra de tampão FACS.

c) Marcação intracelular de citocinas

Para análise das populações produtoras de citocinas, após a marcação de superfície, as amostras foram lavadas com tampão de permeabilização (PBS, BSA 0,1%, azida sódica 0,01%, saponina 1%) e marcadas com os anticorpos anti-IFN- γ , anti-TNF- α e anti-IL-2 em tampão de permeabilização/bloqueio (PBS, BSA 0,1%, azida sódica 0,01%, Molico 5%, saponina 1% - 100µl/amostra), por 30min a 4°C. Seguida a esta etapa, foram realizadas lavagens com os tampões de permeabilização e FACS. As células foram ressuspensas em 150µl/amostra de tampão FACS.

Seguido às etapas de marcação extra e intracelular de todas as análises, as amostras foram transferidas para mini-tubos de 1,2 mL (Beckman Coulter - California, USA) e estocadas a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo Gallios (Beckman Coulter, California, USA). A análise dos dados obtidos foi realizada com o “software” FlowJo (*Flow Cytometry Analyses Software*, Tree Star - Oregon, USA). A população de linfócitos T foi definida a partir da criação de uma região em gráfico de pontos baseado no tamanho no eixo “x” (FSC: “forward scatter”) versus granulosidade das células (SSC: “side scatter”) no eixo “y” e também da marcação de CD3.

Tabela 1: Anticorpos conjugados a fluorocromos utilizados na imunofenotipagem por citometria de fluxo.

ANÁLISE	TIPO DE MARCAÇÃO	MOLÉCULA	FLUOROCROMO
Células T de memória	Extracelular	CD3 CD4 CD8 CD 44 CD62L CD 197 (CCR7)	Alexa 647 APCCy7 PE CF594 V500 Alexa 700 PerCP 5.5
Células T regulatórias	Extracelular / intracelular	CD4 CD25 FoxP3 IL-10	FITC PeCy7 APC PE
Produção de citocinas	Extracelular / intracelular	CD3 CD4 CD8 INF- γ TNF- α IL-2	Alexa 647 FITC PE CF594 APC PECy7 PE

4.10 - Análise estatística

O teste *t-Student* foi utilizado para a comparação da variação de peso entre os grupos inoculados com o fungo do experimento 1 (Cl₁ e Sl₁) e seus respectivos grupos controle (CC₁ e SC₁). Nas análises imunológicas foi aplicado o teste Mann-Whitney. Dados de sobrevivência foram analisados pelo teste Kaplan-Meier seguido por “log rank tests”. O *P-valor* 0.05 ou menor foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1 - Sinais clínicos da doença nos camundongos inoculados

No experimento 1 (Infecção e resposta imune sistêmicas) não foram observados sinais clínicos da hialohifomicose em camundongos imunocompetentes, tanto infectados (Grupo CI₁) quanto controles (Grupo CC₁). Estes animais se mantiveram com atividade normal durante todo o período de observação, sem apresentar lesões externas visíveis nem qualquer alteração nos órgãos internos após eutanásia. Quanto aos camundongos imunossuprimidos, ambos os grupos infectado (Grupo SI₁) e controle (Grupo SC₁), apresentaram queda de pêlo, apatia e perda de peso. Os camundongos infectados com o fungo apresentaram também lesões na pele (dermatites) e na base da cauda e em alguns casos, ceratite, caracterizada pela opacificação da córnea, em ambos os olhos a partir do 14^o dia após a inoculação, compatíveis com a descrição das manifestações clínicas da doença em humanos (Figura 3). A cultura realizada a partir da biópsia desses tecidos foi positiva para *P. lilacinum* (dados não mostrados).



Figura 3. Camundongos imunossuprimidos inoculados (i.v.) com *Purpureocillium lilacinum* (experimento 1). **A** - Lesões fúngicas nos órgãos internos (seta preta); **B** - Lesões dermatológicas no dorso (seta vermelha) e **C** - Ceratite no olho direito (seta branca).

No experimento 2 (infecção subcutânea e resposta imune *in situ*), os camundongos foram observados por 7 dias após a inoculação. Similarmente ao observado nos grupos do experimento 1, os camundongos imunocompetentes (Grupos C₂ e seu controle CC₂) não apresentaram quaisquer sinais clínicos da hialohifomicose. Nos grupos imunossuprimidos (Grupo S₂ e seu controle SC₂), os animais apresentaram também apatia e queda de pêlo, e o grupo infectado (S₂) apresentou lesões ulceradas e purulentas no ponto de inoculação (Figura 4). Três camundongos deste grupo apresentaram ceratite, um deles em ambos os olhos no 5^o dia após a inoculação e dois no olho esquerdo aos 7 dias após a inoculação (dados não mostrados). A cultura dos tecidos das lesões foi positiva para *P. lilacinum* e não foram observadas alterações morfológicas nas colônias (dados não mostrados).

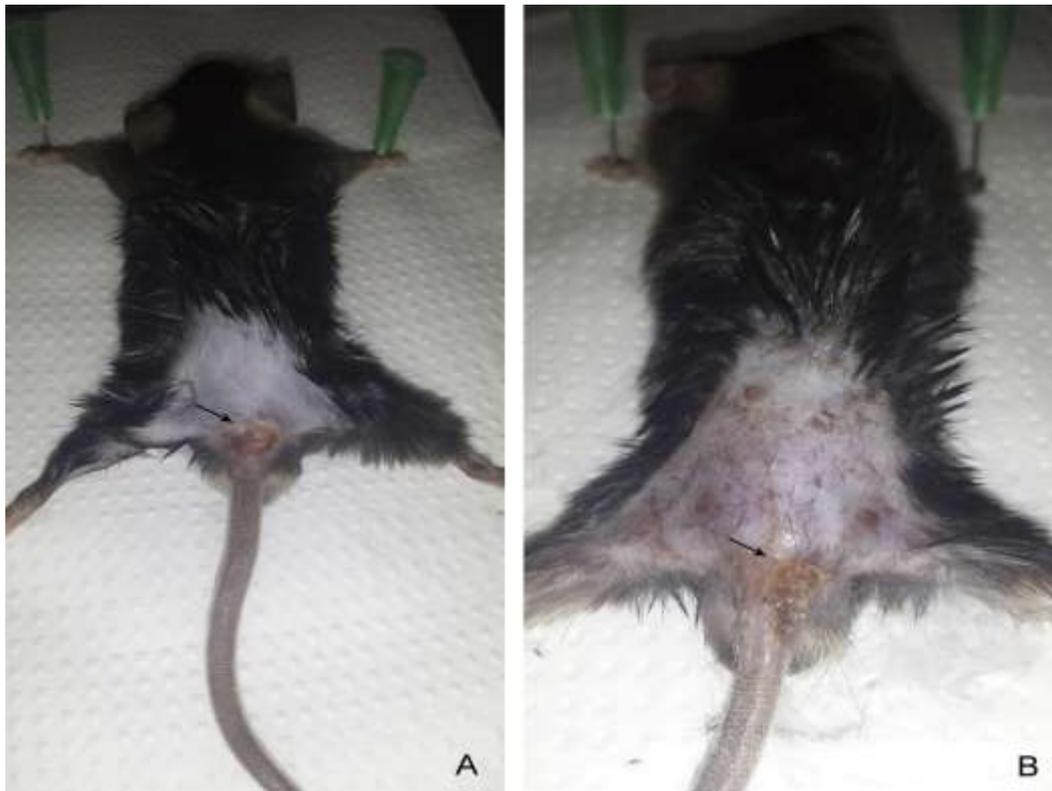


Figura 4. Lesões na base da cauda (seta) de camundongos imunossuprimidos inoculados por via subcutânea com *Purpureocillium lilacinum* (experimento 2). **A** - Dia 3 após a inoculação; **B** - Dia 7 após a inoculação.

5.2 - Variação de peso dos camundongos

Com relação à variação de peso entre os grupos, foi possível observar ganho de peso nos camundongos imunocompetentes, tanto inoculados com o fungo quanto os controles (Grupos CI₁ e CC₁), sem diferença entre os grupos. Em contraste, os camundongos imunossuprimidos perderam peso, porém, o grupo infectado com o fungo (Grupo SI₁) perdeu significativamente (p -valor $<0,05$) mais peso comparado ao seu controle inoculado com PBS (Grupo SC₁), em todos os pontos de observação (Tabela 2).

Tabela 2: Variação de peso dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com *Purpureocillium lilacinum*

Grupo	Dias após inoculação			
	0	7	14	21
CI ₁	21g	↑ 23,49 ± 1,43	↑ 24,42 ± 1,93	↑ 27,11 ± 1,86
CC ₁	21g	↑ 24,7 ± 1,27	↑ 24,96 ± 3,25	↑ 25,14 ± 1,47
SI ₁	21g	↓ 17,27 ± 1,78*	↓ 17,57 ± 0,93*	↓ 16,83 ± 2,83*
SC ₁	21g	↓ 19,09 ± 1,91	↓ 18,19 ± 1,02	↓ 18,90 ± 1,48

CI₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum*

CC₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com PBS

SI₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinum*

SC₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS

↓ perda de peso em relação ao dia 0

↑ ganho de peso em relação ao dia 0

*p-valor <0,05 quando comparado o grupo infectado com o seu controle

5.3 - Sobrevivência dos camundongos

A figura 5 mostra o percentual de sobrevivência dos quatro grupos observados no experimento 1. Como esperado, os grupos controle, tanto imunocompetentes (Grupo CC₁) quanto imunossuprimidos (Grupo SC₁) apresentaram 100% de sobrevivência até o final do experimento. Já os grupos de animais infectados imunocompetentes (Grupo CI₁) apresentaram 75% de sobrevivência, enquanto o percentual apresentado pelos imunossuprimidos (Grupo SI₁) foi de 50%. Cabe ressaltar que o último grupo apresentou, além de menor percentual de sobrevivência, uma mortalidade mais precoce comparada aos imunocompetentes e sinais clínicos da hialohifomicose.

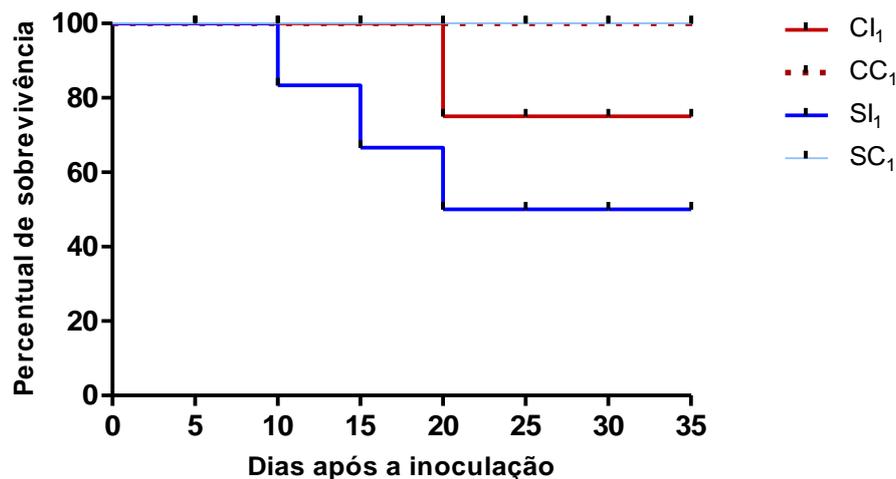


Figura 5. Curva de sobrevivência dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. Sobrevivida após a inoculação intravenosa de 1×10^5 conídios de *Purpureocillium lilacinum* e grupos controle inoculados com PBS durante o período de 35 dias após a infecção. CI₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum*; CC₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com PBS; SI₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinum* e SC₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS.

5.4 - Reisolamento de células fúngicas

Para a avaliação da infecção utilizamos como parâmetro a quantificação de unidades formadoras de colônia. As UFC foram reisoladas a partir do cultivo de tecido esplênico dos camundongos inoculados por via intravenosa (experimento 1), nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação. Podemos observar uma similaridade na curva de recuperação de células fúngicas em ambos os grupos (CI₁ e SI₁), com um pico de obtenção de células no 7º dia após a infecção, decaindo ao longo do experimento. Entretanto, a quantificação dessas células foi significativamente maior no grupo imunossuprimido (SI₁) comparado ao imunocompetente (CI₁), no 7º dia após a inoculação (Figura 6).

Para esse experimento, assim como para a quantificação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, acrescentamos o grupo de camundongos imunocompetentes

que sofreram imunossupressão a partir do 21º dia (Grupo CI₁/SI₁). Neste grupo foi observado que aos 35 dias após a inoculação, o número de células fúngicas recuperadas do baço foi maior que no ponto anterior naqueles camundongos que não foram imunossuprimidos (Grupo CI₁).

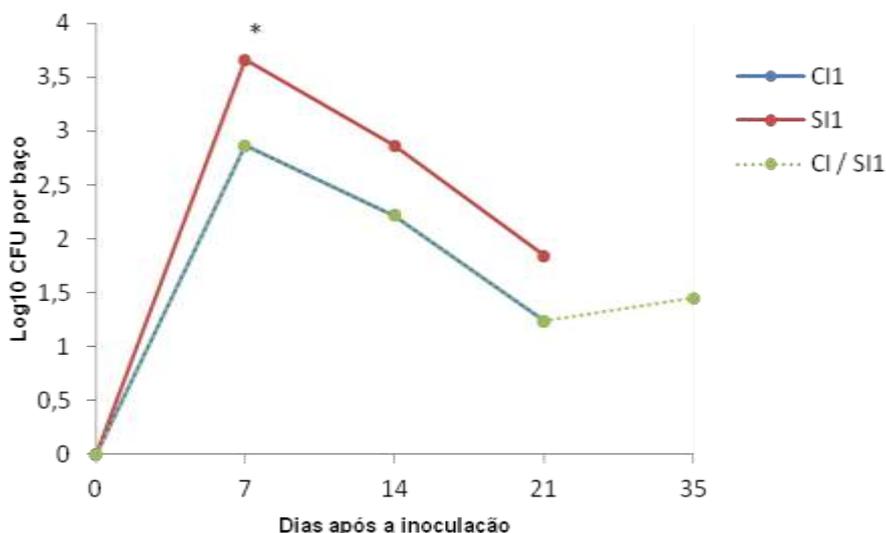


Figura 6. Número de células de *Purpureocillium lilacinum* recuperadas de fragmentos de baço de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. As linhas azul e vermelha representam os grupos experimentais, CI₁ e SI₁, respectivamente, e cada ponto a média de UFC recuperada de fragmentos de baço de seis camundongos eutanasiados com 7, 14 e 21 dias após a inoculação. A linha verde pontilhada representa o grupo CI₁/SI₁, imunossuprimido a partir do 21º dia após a inoculação e submetido a eutanásia no 35º dia para a quantificação de células fúngicas do baço. * $P < 0,05$.

5.5 – Exame histológico

5.5.1- Análise histopatológica

No experimento 1 (infecção e resposta imune sistêmicas) foram avaliadas alterações histológicas no pulmão de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. Nos grupos controle (Grupos CC₁ e SC₁) não foram observadas quaisquer alterações no tecido pulmonar desses

animais nos tempos avaliados. Apenas um camundongo imunocompetente infectado apresentou no dia 14 pós-inoculação, pneumonite piogranulomatosa multifocal moderada, não relacionada à infecção.

No período inicial da infecção (até o dia 7), não foram observadas alterações nos cortes histológicos pulmonares de camundongos imunossuprimidos (grupo SI₁). Entretanto, dois camundongos imunocompetentes do grupo CI₁ apresentaram pneumonia granulomatosa multifocal moderada. Foram observadas estruturas fúngicas semelhantes a conídios no tecido (Figura 7A), evidenciadas pela coloração de Grocott (Figura 7B).

Não foram detectadas alterações histológicas nos grupos no período intermediário de observação (do dia 7 até 14). Ao final do experimento, portanto, 21 dias após a inoculação, não se observaram alterações nos cortes histológicos provenientes de camundongos imunossuprimidos inoculados com o fungo. Apesar da presença de células inflamatórias, não foram evidenciadas estruturas fúngicas pela coloração de Grocott. O mesmo resultado foi observado nos grupo dos camundongos imunocompetentes, no qual apenas um camundongo apresentou pneumonite granulomatosa difusa e moderada aparentemente sem relação com a infecção, devido à ausência de estruturas fúngicas no tecido (dados não mostrados).

No grupo dos camundongos imunocompetentes que sofreram imunossupressão (Grupo CI₁/ SI₁), não foram detectadas alterações no tecido pulmonar, porém, apesar da ausência de alterações histológicas, foram observados conídios na parede dos alvéolos (dados não mostrados).

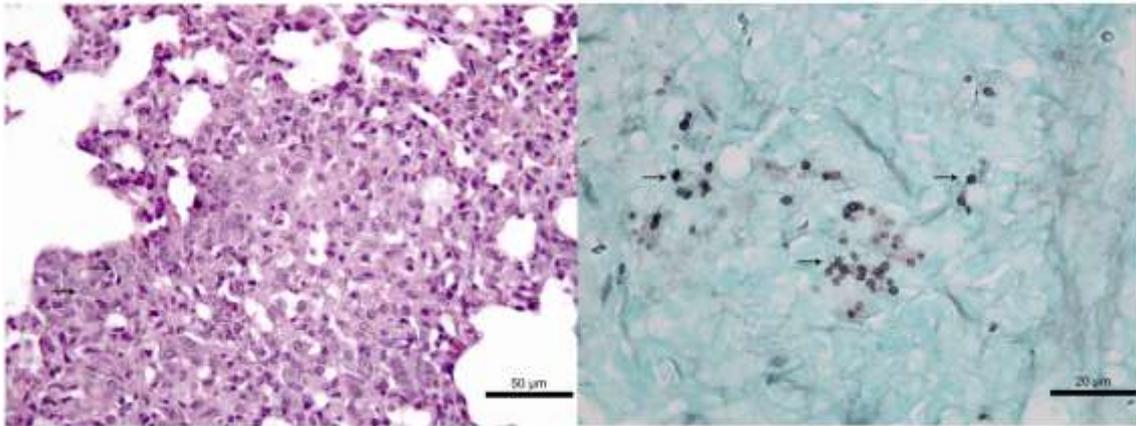


Figura 7. Corte histológico de tecido pulmonar de camundongos imunocompetentes inoculados com *Purpureocillium lilacinum*, 7 dias após a inoculação. **A** – Estrutura fúngica semelhante a conídio no citoplasma de fagócito (seta preta). Coloração por H&E; **B** – Estrutura fúngica no parênquima pulmonar (seta preta). Coloração por Grocott.

A análise histológica do tecido coletado de camundongos inoculados na base da cauda (experimento 2 – infecção subcutânea e resposta imune *in situ*) está demonstrada na figura 8. Não foram observadas alterações nos camundongos controle (Grupos CC₂ e SC₂) em nenhum dos tempos observados. No entanto, os camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum* (Grupo CI₂), em todos os dias após o inóculo (dias 1, 3, 5 e 7) observou-se dermatite, paniculite e ulcerações na pele com infiltrado inflamatório difuso atingindo as dermes superficial e profunda, constituído por diversas células inflamatórias. As colorações de PAS e Grocott evidenciaram a presença de poucos conídios no tecido subcutâneo, localizados no interior de macrófagos no primeiro dia após a infecção. No terceiro dia após a inoculação foi detectada a presença de hifas, além de abundantes conídios intra e extracelulares e no dia 5 foi observado também a necrose das fibras na musculatura estriada esquelética e focos de fibrose na derme e tecido subcutâneo. Numerosos conídios no interior de macrófagos e neutrófilos foram observados no tecido subcutâneo e também na derme superficial em meio ao

infiltrado inflamatório. No final do período de observação, portanto, 7 dias após a inoculação, a pele dos camundongos apresentou acantose e foram observados conídios no interior de macrófagos.

De maneira geral, os camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinum* (Grupo S₁₂) apresentaram lesões mais severas e maior número de estruturas fúngicas que os imunocompetentes (Grupo C₁₂) a partir do primeiro dia após inoculação. Em todos os pontos de observação, a análise histológica do tecido coletado desses animais revelou a formação de infiltrado inflamatório difuso e/ou multifocal, que foi se intensificando até o final do experimento. Também foram observadas extensas áreas de úlcera recoberta por crostas, dermatite e paniculite supurativa. No dia 1, foi revelada a presença de numerosos conídios no interior de macrófagos e hifas no tecido. No terceiro dia após a inoculação, o infiltrado variou de moderado a acentuado. A extensão do infiltrado atingiu as dermes superficial e profunda e musculatura esquelética adjacente (miosite supurativa), sendo mais intenso no tecido subcutâneo. Abundantes conídios foram observados no interior de fagócitos. No dia 5 pós-inóculo, além da presença de conídio no interior dos fagócitos e no tecido, também foram observadas hifas nas crostas que recobriam as ulcerações dos camundongos imunossuprimidos. Ao final do experimento, foi observada a formação de infiltrados inflamatórios multifocais, abundantes conídios e hifas nas crostas, derme e principalmente tecido subcutâneo.

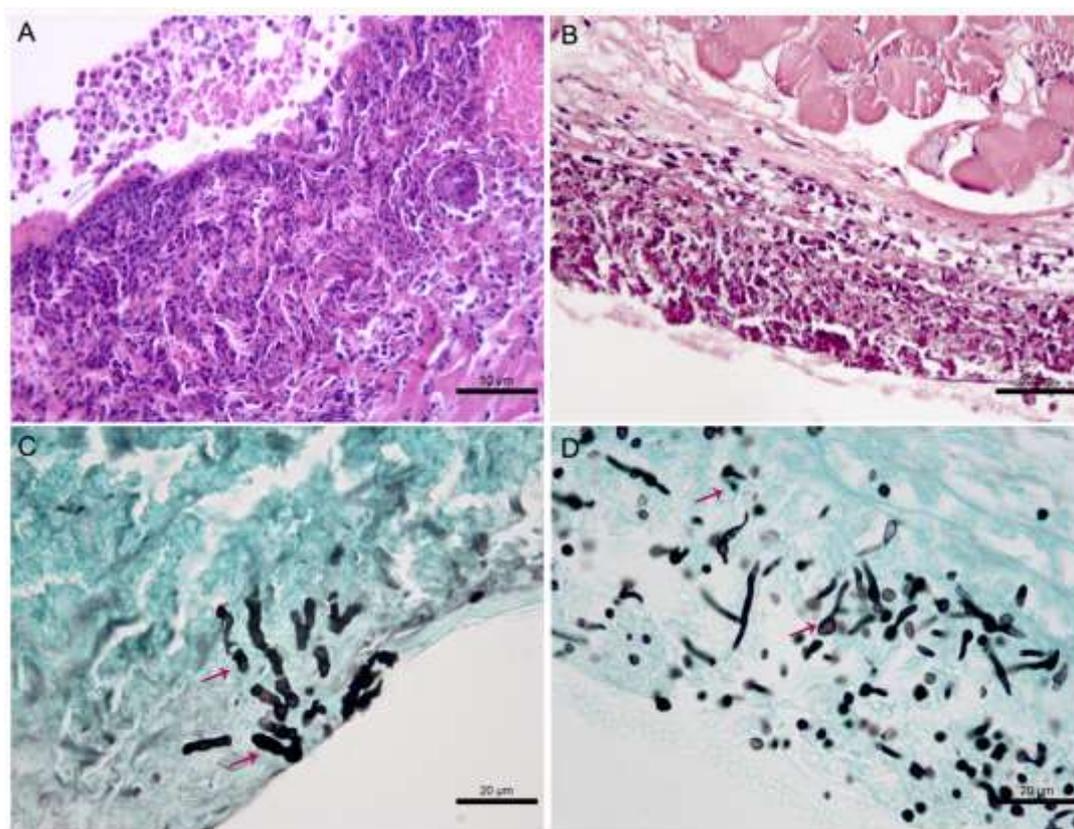


Figura 8. Corte histológico dos tecidos cutâneo e subcutâneo de camundongos imunocompetentes (coluna esquerda) e imunossuprimidos (coluna direita) inoculados por via subcutânea com *Purpureocillium lilacinum*, no dia 1 após a inoculação. **A e B** – Infiltrado inflamatório difuso atingindo as dermes superficial e profunda. Coloração por H&E. **C** - Estruturas fúngicas semelhante a hifas no tecido (seta vermelha). **D** – Estruturas fúngicas semelhante a conídios, dilatados e lançando tubo germinativo (seta vermelha). Coloração por Grocott.

5.5.2 – Análise imunohistoquímica

As tabelas 3 e 4 resumizam os dados obtidos da análise imunohistoquímica do experimento 2 (infecção subcutânea e resposta imune *in situ*). O percentual de macrófagos (CD68) e neutrófilos (NE) foi quantificado dentro de um total de 500 células, além de classificada a intensidade da produção de óxido nítrico e IL-1, variando de discreta (+) a muito intensa (++++).

Observamos nos camundongos imunocompetentes (Grupo CI₂) maior número de neutrófilos que macrófagos, especialmente, no primeiro dia após a inoculação (Tabela 3). No entanto, com relação à quantificação dos macrófagos, foi possível notar que o número absoluto dessas células tendeu a aumentar nos tempos finais da observação, bem como a produção de óxido nítrico (Tabela 4).

A produção de IL-1 por macrófagos foi alta no primeiro dia após a infecção, decaindo drasticamente nos dias 3 e 5 e tendo uma elevação significativa ao final do experimento. O grupo controle (Grupo CC₂) apresentou números proporcionalmente muito menores que o grupo infectado (Grupo CI₂) (Tabela 4).

Não foi possível alcançar o total de 500 células nos camundongos imunossuprimidos, tanto infectados quanto controles (Grupos SI₂ e SC₂). Quantificamos nesses animais aproximadamente 280 células totais e a exemplo do observado nos camundongos imunocompetentes, quantificamos mais neutrófilos do que macrófagos, especialmente no período inicial (dia 1) e final (dia 7) do experimento (Tabela 3). Essa mesma variação ocorreu com a produção de óxido nítrico, porém, com relação à produção de IL-1, os dias 1 e 3 parecem ter sido o pico de maior atividade (Tabela 4).

A figura 9 ilustra a análise das células com marcação positiva de moléculas de superfície e intracelulares presentes nos grupos imunocompetente e imunossuprimido. Foi possível, também, observar a presença de estruturas fúngicas nos tecidos corados por hematoxilina (dados não mostrados) corroborando os dados do exame histopatológico (item 5.5.1).

Tabela 3: Quantificação de macrófagos (CD68) e neutrófilos (NE) de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos

		D1	D3	D5	D7
		(%) de células positivas			
Macrófagos	Cl ₂	18.6	15.9	25.6	44.9
	CC ₂	6.8	6.6	7.6	8.8
	Sl ₂	7.1	8.2	2.5	8.7
	SC ₂	4.0	1.8	0.5	0.5
Neutrófilos	Cl ₂	62.6	25.6	44.8	29.8
	CC ₂	3.5	3.2	4.3	2.2
	Sl ₂	22.1	17.1	11.8	18.5
	SC ₂	4.6	0.7	0.7	0

Tabela 4: Intensidade de produção de óxido nítrico (NOS) e IL-1 por células de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos

		D1	D3	D5	D7
IL-1	Cl ₂	++	+	+	+++
	CC ₂	+	+	+	+
	Sl ₂	+	+	+	+
	SC ₂	+	+	+	+
NOS	Cl ₂	++	++	+++	+++
	CC ₂	+	+	+	+
	Sl ₂	+	+	+	+
	SC ₂	+	+	+	+

Cl₂ = camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum*

CC₂ = camundongos imunocompetentes inoculados com PBS

Sl₂ = camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinum*

SC₂ = camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS

D1, D3, D5 e D7 – Dias após a inoculação

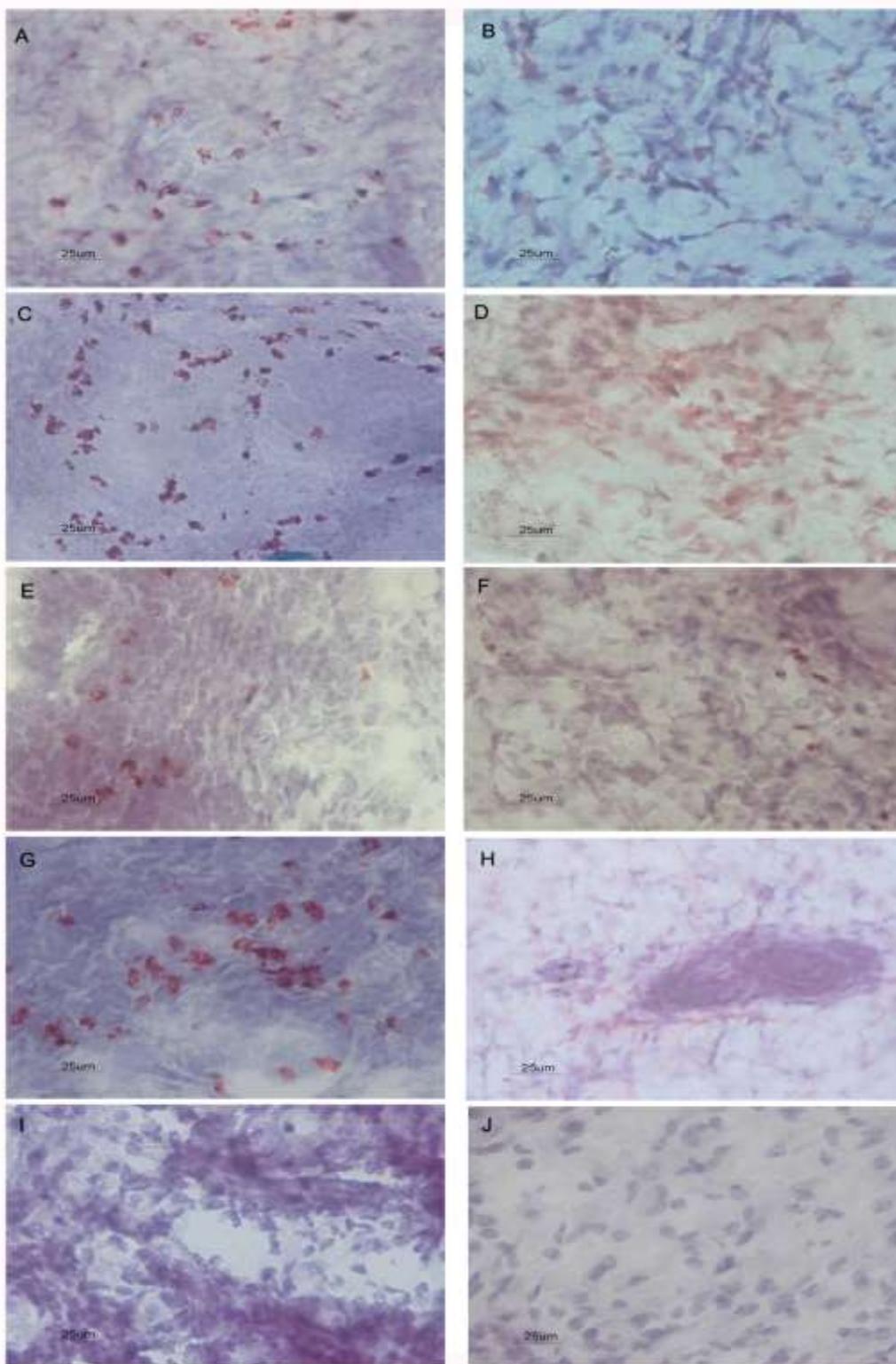


Figura 9. Análise imunohistoquímica de biópsia de pele de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. A coluna da esquerda demonstra a marcação positiva de células e moléculas intracelulares presentes nos grupos imunocompetentes e a coluna da direita, nos imunossuprimidos. **A e B** - Quantificação de macrófagos (Cl₂, SI₂); **C e D** - Quantificação de neutrófilos (Cl₂, SI₂); **E e F** - Produção de IL-1 (Cl₂, SI₂); **G e H** - Produção de óxido nítrico (Cl₂, SI₂); **I e J** - Controle negativo da reação.

5.6 - Resposta imune sistêmica

A seguir, serão descritos os resultados da imunofenotipagem de células T coletadas do baço de camundongos imunocompetentes (CI₁) e imunossuprimidos (SI₁), com seus respectivos controles (CC₁ e SC₁) do experimento 1 (infecção e resposta imune sistêmicas).

5.6.1- Quantificação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no baço de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos

Com relação à quantificação de células CD4⁺ e CD8⁺ esplênicas de camundongos imunocompetentes (Grupos CI₁ e SI₁), observamos um predomínio de linfócitos CD4⁺ sobre CD8⁺, por todo o período experimental (Figura 10A). Apesar dessa diferença, o percentual tanto de linfócitos CD4⁺ quanto CD8⁺ foi maior nos camundongos infectados (Grupo CI₁) que nos grupos controle (CC₁). Observamos ainda, que o predomínio dessas células foi maior nos dias 7 e 14 após a inoculação, decaindo ao final do período experimental (Figura 10A). Vale destacar que o grupo CI₁ apresentou maior percentual de CD4 no dia 7 e de CD8 no dia 21 quando comparado ao grupo controle CC₁.

Diferentemente do observado nos camundongos imunocompetentes, os grupos imunossuprimidos (SI₁ e SC₁) apresentaram claramente maior predomínio de linfócitos CD8⁺, comprovando a ação imunossupressora da dexametasona. Cabe ressaltar, que em contraste com o observado nos grupos imunocompetentes, o percentual de linfócitos CD4⁺ foi ainda menor no grupo inoculado com o fungo (SI₁) e teve pequena variação ao longo do experimento. Ao contrário do observado nos linfócitos CD4⁺, linfócitos CD8⁺ apresentaram

maiores percentuais no grupo infectado (SI_1), comparado ao seu controle (Grupo SC_1), especialmente nos tempos iniciais da infecção, decaindo ligeiramente ao fim do experimento (Figura 10B).

No grupo dos camundongos inicialmente imunocompetentes que sofreram imunossupressão após 21 dias (CI_1/SI_1), foi observado que o percentual de linfócitos $CD4^+$ (23%) foi significativamente menor que de $CD8^+$ (54%) nos animais infectados e controle (28% e 56%, respectivamente), similarmente ao demonstrado na cinética dos animais imunossuprimidos, demonstrando mais uma vez a ação da dexametasona sobre essas células (dados não mostrados).

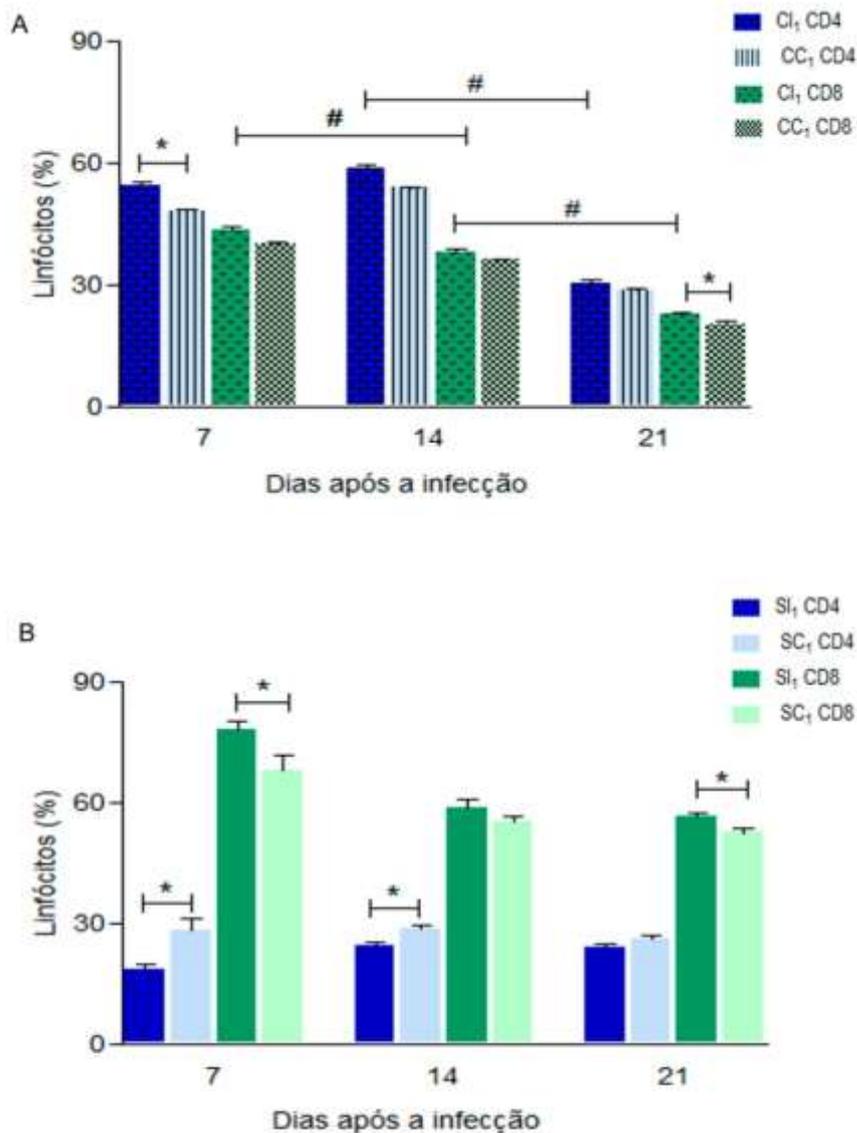


Figura 10. Quantificação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ esplênicos de camundongos inoculados com *Purpureocillium lilacinum* e grupos controle inoculados com PBS nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação. **A** - Camundongos imunocompetentes; **B** - Camundongos imunossuprimidos. CI₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum*; CC₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com PBS; SI₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinum* e SC₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS. (*) diferença estatística entre o grupo infectado e controle no mesmo período de observação. (#) Diferença estatística entre os grupos infectados durante o período experimental. $P < 0,05$.

Na figura 11 estão demonstrados os gráficos representativos do perfil morfológico de linfócitos TCD4+ e TCD8+ esplênicos dos camundongos, com base em tamanho e granulosidade, bem como a estratégia de análise das subpopulações de memória central e efetora/efetoras.

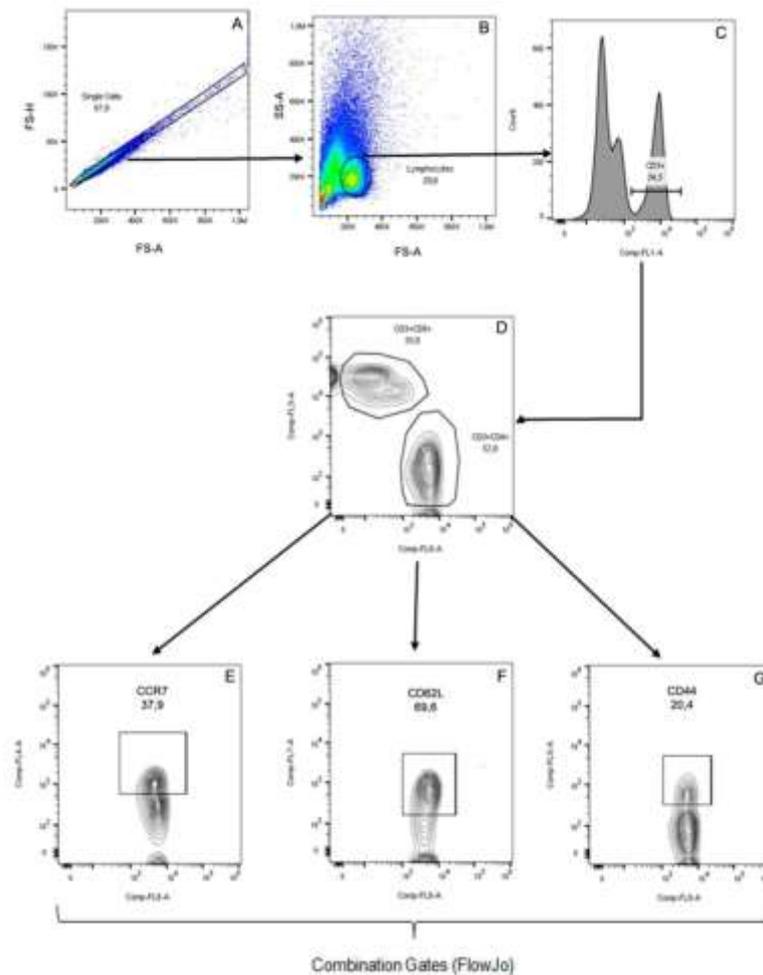


Figura 11. Gráficos representativos do perfil morfológico das células T de baço dos camundongos imunocompetentes inoculados com PBS (controle positivo) e estratégia de análise de subpopulações de memória central e efetora/efetoras. A) Discriminação de “doublets” (grupos) por meio dos parâmetros de tamanho e sinal emitidos pelas células; B) Tamanho (FS) e granulosidade (SS) dos linfócitos. Um total de 30.000 eventos foi adquirido dentro do “gate”; C) Quantificação de linfócitos T (CD3⁺); D) Discriminação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ dentro do “gate” de CD3⁺; E, F e G) Determinação da expressão de moléculas CCR7, CD62L e CD44 (marcadores de memória central e efetora) em células CD4⁺ ou CD8⁺. Para a determinação dos fenótipos de memória células a marcação de células tripla, duplas e simples positivas para cada marcador foi determinada utilizando-se a ferramenta de Gates combinatórios do programa FlowJo X.

5.6.2. Memória celular

A cinética da expressão de marcadores de memória em linfócitos CD4⁺ provenientes do baço de camundongos imunocompetentes (Grupos CI₁ e CC₁) e imunossuprimidos (Grupos SI₁ e SC₁) está demonstrada na Figura 12. Com relação ao percentual de células CD4⁺ de memória central, observamos que no 7^o dia após a inoculação, os camundongos imunocompetentes apresentaram maior percentual destas células, comparado aos imunossuprimidos. Este grupo voltou a apresentar diferença estatística ao final do experimento (21 dias), diferentemente do observado no período intermediário da infecção (14 dias), no qual os percentuais de células CD4⁺ de memória central foram equivalentes em ambos os grupos (Figura 12A).

Ao quantificar linfócitos CD4⁺ de memória efetora/efetores (Figura 12C), nossos resultados demonstraram que, de modo semelhante ao observado com as células de memória central, os camundongos imunocompetentes (Grupos CI₁ e CC₁) foram capazes de apresentar maiores percentuais deste fenótipo celular que os camundongos imunossuprimidos (Grupos SI₁ e SC₁), no 7^o dia após o inoculo. Entretanto, passado o período inicial, este perfil se inverteu, e as células coletadas de camundongos imunossuprimidos apresentaram maior expressão dos marcadores de memória efetora/efetora.

Nos linfócitos CD8⁺, observamos que os camundongos imunocompetentes (Grupos CI₁ e CC₁) apresentaram maiores percentuais de células de memória central do que os imunossuprimidos (Grupos SI₁ e SC₁), no início da infecção (dia 7) decaindo para níveis similares aos imunossuprimidos nos dias 14 e 21 (Figura 12B). A cinética da expressão de marcadores de

memória efetora/efetoras, demonstrada na figura 12D, mostra que os camundongos imunocompetentes apresentaram mais células de memória efetora/efetoras no início da infecção, porém, este perfil se inverteu no período intermediário (14 dias após inóculo), tornando-se equivalente ao final do período experimental.

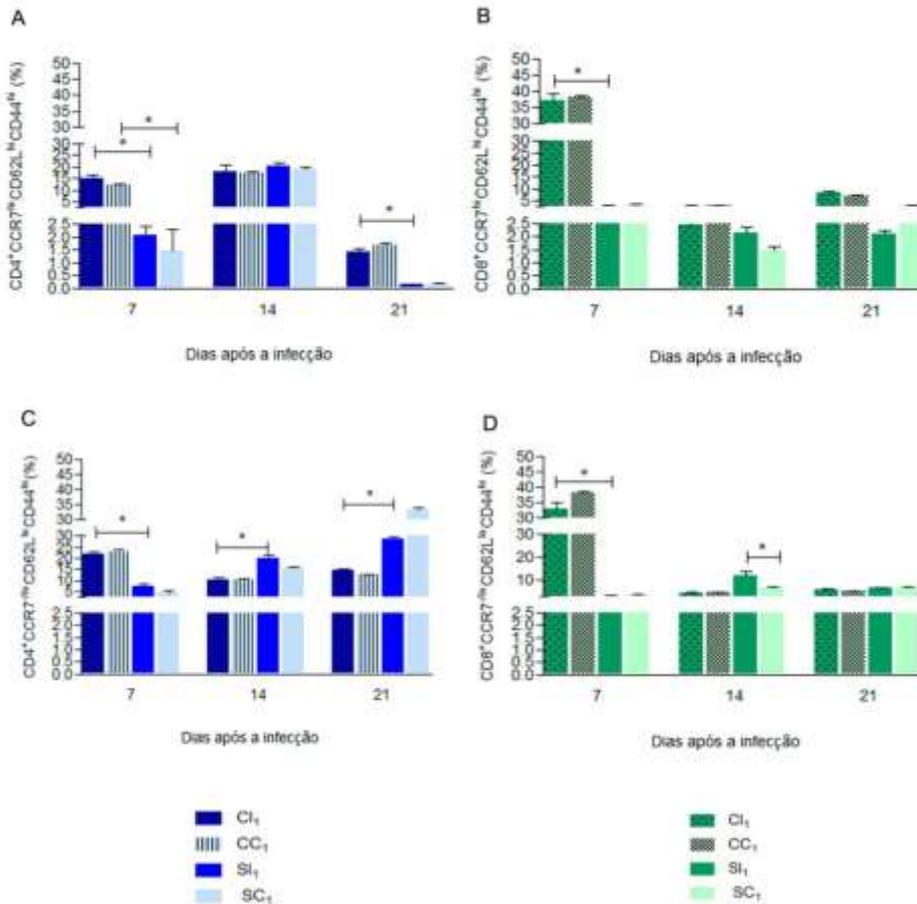


Figura 12. Expressão de marcadores de memória em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ esplênicos de camundongos inoculados com *Purpureocillium lilacinum* e grupos controle nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação. **A** - CD4⁺ de memória central em; **B** - CD8⁺ de memória central; **C** - CD4⁺ de memória efetora/efetores; **D** - CD8⁺ de memória efetora/efetores. CI₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum*; CC₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com PBS; SI₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinum* e SC₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS. (*) diferença estatística entre os grupos competente e suprimido no mesmo período de observação. (#) Diferença estatística entre os grupos infectados durante o período experimental. $P < 0,05$.

5.6.3. Células T regulatórias

A figura 13 demonstra os percentuais de marcação de células T regulatórias de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. Os grupos imunocompetentes, inoculado e controle (CI₁ e CC₁, respectivamente) não apresentaram diferenças entre si ao longo do período observado. Entretanto, foi possível observar no grupo imunossuprimido infectado, diferenças com relação ao seu controle. No 7^o dia após o inóculo, o grupo infectado (SI₁) apresentou menores percentuais desse fenótipo celular que o grupo controle (SC₁), contudo, do período intermediário (até o dia 14) até o fim do experimento (dia 21), o que observamos foi uma inversão nesse perfil, com aumento nos percentuais de células T regulatórias no grupo imunossuprimido infectado com relação ao controle. A figura 14 demonstra a caminho da análise citofluorimétrica dessas populações.

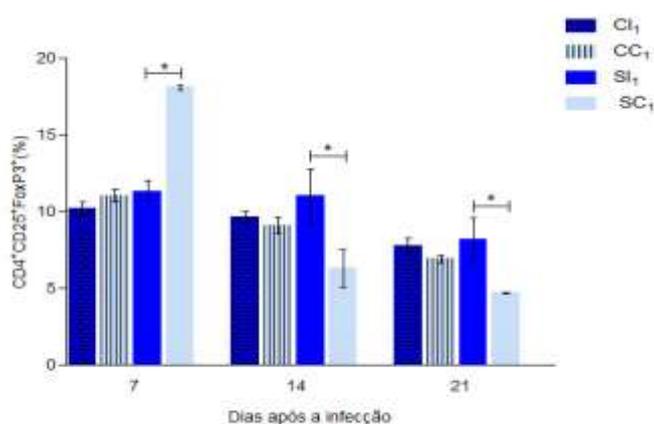


Figura 13. Expressão de marcadores de células T regulatórias de camundongos inoculados com *Purpureocillium lilacinum* e grupos controle inoculados com PBS nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação. CI₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum*; CC₁= camundongos imunocompetentes inoculados com PBS; SI₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinum* e SC₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS. (*) diferença estatística entre os grupos imunocompetente e imunossuprimido no mesmo período de observação. $P > 0,05$.

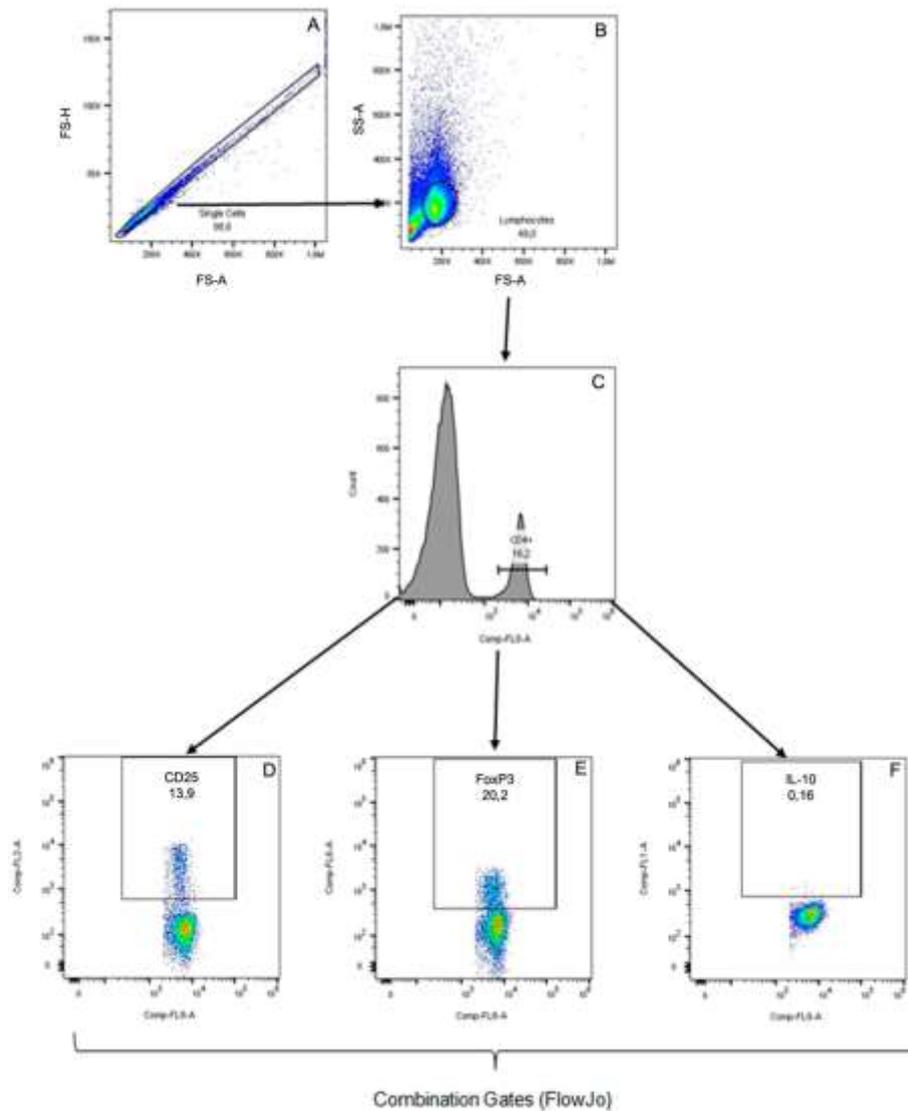


Figura 14. Gráficos representativos do perfil morfológico das células T de baço dos camundongos imunocompetentes inoculados com PBS (controle positivo) e estratégia de análise de subpopulações de células T regulatórias. A) Discriminação de “doublets” (grupos) por meio dos parâmetros de tamanho e sinal emitidos pelas células; B) Tamanho (FS) e granulosidade (SS) dos linfócitos. Um total de 30.000 eventos foi adquirido dentro do “gate”; C) Seleção da população CD4⁺; D, E e F) Moléculas CD25, FoxP3 e IL-10 (marcadores de células Treg) expressos por CD4⁺. Para a determinação de células regulatórias produtoras de IL-10 foi aplicada a ferramenta de Gates combinatórios do programa FlowJo X.

5.6.4. Produção de citocinas

Nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação com *Purpureocillium lilacinum* e PBS, os linfócitos do baço de camundongos imunocompetentes (Grupos CI₁ e CC₁) e imunossuprimidos (Grupos SI₁ e SC₁) foram avaliados quanto à sua capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-2. Observamos que os linfócitos de camundongos imunossuprimidos tiveram mais altos percentuais de produção de citocinas em CD4⁺. Com relação aos linfócitos CD8⁺, observamos essa diferença especialmente no período inicial (7 dias) comparados ao grupo imunocompetente (Figura 15) .

A cinética da expressão de produção de IFN- γ produzidos pelas células de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos está representada na Figura 15 A e B. Linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos imunossuprimidos (SI₁ e SC₁) foram capazes de produzir maiores percentuais de IFN- γ que as células dos imunocompetentes (CI₁ e CC₁). Nos linfócitos CD8⁺ esse percentual foi vinte vezes maior no início da infecção.

Das citocinas analisadas TNF- α foi a que apresentou o maior percentual de expressão nas células de camundongos imunocompetentes (CI₁ e CC₁) nos tempos 7 e 14 pós-inoculação. Porém ao se comparar os grupos de camundongos competentes e suprimidos observamos que os maiores valores percentuais para essa citocina foram vistos geralmente nos animais imunossuprimidos (SI₁ e SC₁). Linfócitos CD4⁺ apresentaram maiores percentuais no período inicial da infecção (dia 7), decaindo gradativamente até o final do experimento. Em contraste, CD8⁺ apresentou maiores percentuais no 7º dia após a infecção, com uma queda no período intermediário e aumento ao final do período experimental. Foi possível observar diferenças dentro dos

grupos ao longo do experimento, tanto entre imunocompetentes quanto imunossuprimidos (Figura 15C e 15D).

Por fim, a expressão de IL-2 produzida por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ está representada pela figura 15E e 15F. Observamos que linfócitos CD4⁺ de camundongos imunossuprimidos expressaram maiores percentuais dessa citocina que CD8⁺, decaindo gradativamente até o fim do experimento. As células dos camundongos imunocompetentes, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺, mantiveram baixos percentuais de produção dessa citocina, nos períodos iniciais e intermediário do experimento, sofrendo um ligeiro aumento ao final do período de observação. A figura 16 esquematiza a estratégia de análise das populações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas.

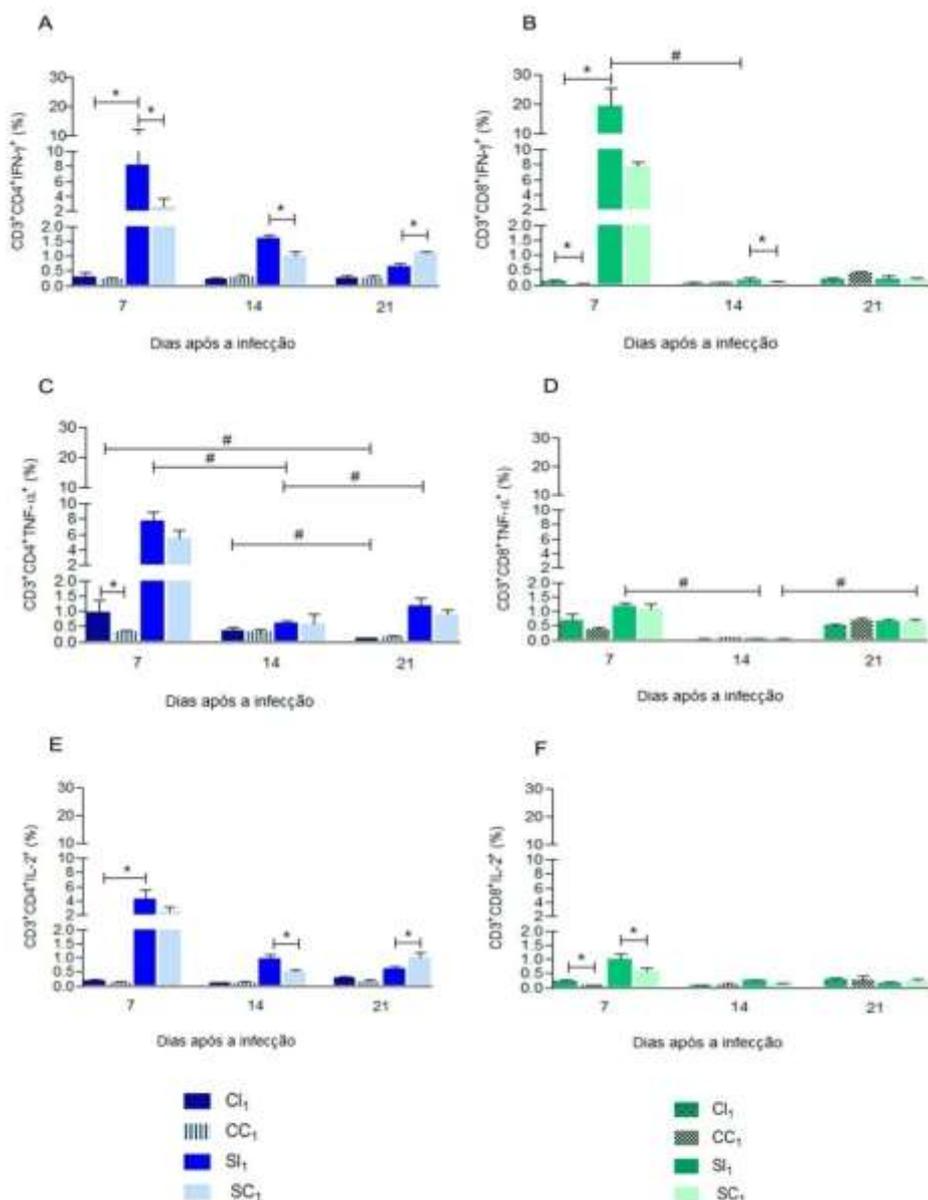


Figura 15. Quantificação de citocinas produzidas por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ esplênicos, coletados de camundongos inoculados com *Purpureocillium lilacinum* e grupos controle inoculados com PBS nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação. **A e B** - Produção de IFN-γ por CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente; **C e D** - Produção de TNF-α por CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente; **E e F** - Produção de IL-2 por CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente. CI₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinum*; CC₁ = camundongos imunocompetentes inoculados com PBS; SI₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinum* e SC₁ = camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS. (*) diferença estatística entre o grupo infectado e controle no mesmo período de observação. (#) Diferença estatística entre os grupos infectados durante o período experimental. *P* < 0,05.

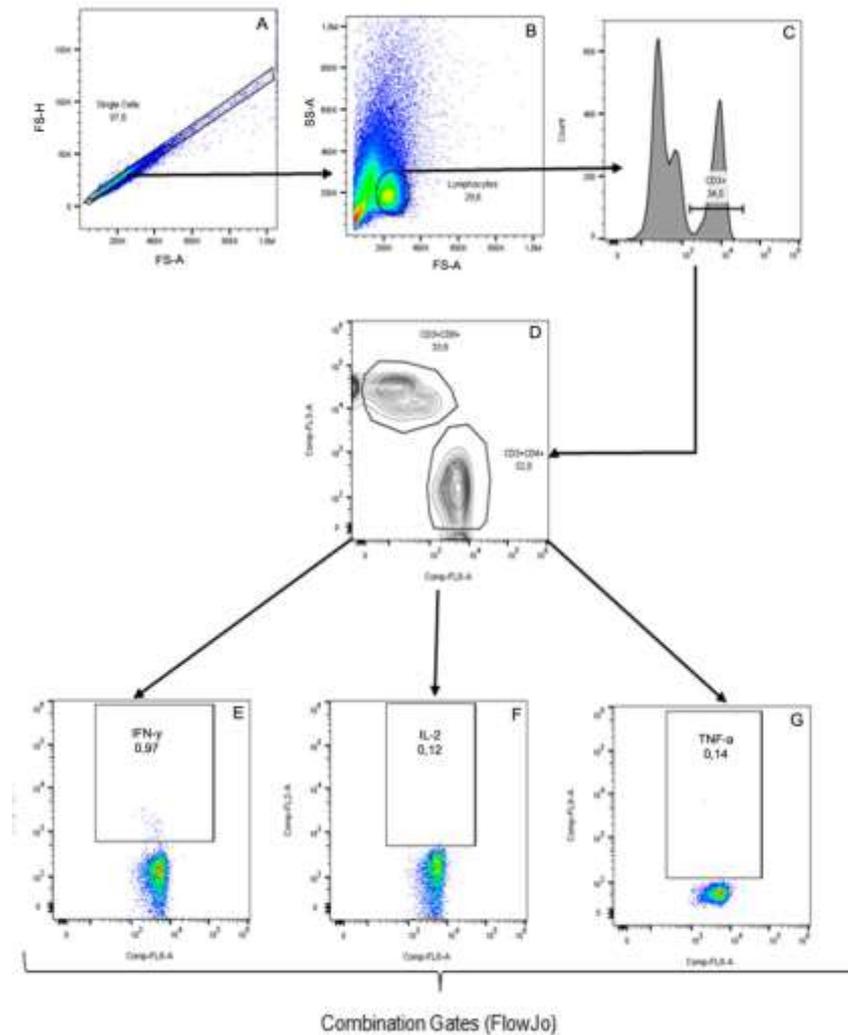


Figura 16. Gráficos representativos do perfil morfológico das células T de baço dos camundongos imunocompetentes inoculados com PBS (controle positivo) e estratégia de análise de populações produtoras de citocinas. A) Discriminação de “doublets” (grupos) por meio dos parâmetros de tamanho e sinal emitidos pelas células; B) Tamanho (FS) e granulosidade (SS) dos linfócitos. Um total de 30.000 eventos foi adquirido dentro do “gate”; C) Quantificação de linfócitos T (CD3⁺); D) Discriminação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ dentro de CD3⁺; E, F e G) Citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) produzidas por células CD4⁺ ou CD8⁺. Para a determinação de células tripla, duplas e simples produtoras de cada citocina foi aplicada a ferramenta de Gates combinatórios do programa FlowJo X.

6. DISCUSSÃO

As infecções fúngicas invasivas constituem atualmente a maior ameaça para os hospedeiros imunossuprimidos (14), e dentre elas está a causada pelo fungo *Purpureocillium lilacinum* (7).

Os mecanismos da resposta celular e imunológica contra *P. lilacinum* são escassos, por isso este trabalho buscou elucidar parte das bases celulares e imunológicas da interação parasito-hospedeiro. A escolha do modelo experimental C57BL/6 deveu-se a trabalhos anteriores do nosso grupo, que utilizaram macrófagos peritoneais de camundongos desta linhagem para experimentos *in vitro* (16) demonstrando o potencial desse fungo em aderir, invadir e destruir as células do hospedeiro. Desta forma, partimos para estudos *in vivo* na tentativa de melhorar a compreensão desses mecanismos.

Em 2012, nosso grupo comparou a virulência de dois isolados de *P. lilacinum* de origem humana, denominados PLT e PLP, e os resultados obtidos sugeriram que o segundo isolado foi o mais virulento (18) sendo, portanto, o isolado escolhido para o presente estudo.

A habilidade do fungo em escapar da resposta imune do hospedeiro foi por nós demonstrada na observação dos sinais clínicos da doença nos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. Apesar do fungo *P. lilacinum* possuir virulência baixa, segundo alguns autores, e necessitar de um hospedeiro imunossuprimido para invadir e produzir a doença (10, 58, 59), os modelos por nós testados nos mostram que o hospedeiro imunossuprimido é mais suscetível, sem dúvida, porém a capacidade do fungo em permanecer viável e circulando no hospedeiro competente é um fato. Observamos no

experimento 1 (avaliação da infecção e resposta imune sistêmicas) que os animais imunocompetentes mantiveram-se hígidos durante o período experimental, não apresentando quaisquer alterações comportamentais ou manifestações clínicas, como, perda de peso, lesões nos órgãos internos ou externos. Entretanto, a infecção foi estabelecida, visto os resultados de recuperação de células do baço até o fim do período de observação. Em contraste, os animais imunossuprimidos apresentaram, perda de peso, queda de pêlo, apatia, dermatites, lesões nos órgãos internos e ceratites em ambos os olhos, compatíveis com os casos descritos de infecção humana e semelhantes ao modelo BALB/c utilizado por Brito et al. (17).

Essas diferenças também foram observadas nos camundongos inoculados por via subcutânea (experimento 2 – avaliação da infecção subcutânea e resposta imune *in situ*). O grupo imunocompetente infectado com *P. lilacinum* e seu controle inoculado com PBS (CI₂ e CC₂) não apresentaram sinais clínicos, ao contrário dos imunossuprimidos, que quando infectados (SI₂), além de apatia e queda de pêlo, apresentaram ainda lesões no local de inoculação (base da cauda), crostas na pele e em alguns casos, ceratite. Os dados da avaliação clínica dos animais, nesse estudo, indicam que a ação imunossupressora da dexametasona foi importante na manifestação clínica da doença, observado também em trabalhos anteriores de nosso grupo (17, 18).

A avaliação da sobrevivência dos camundongos nos permitiu observar que a mortalidade dos grupos se deveu à ação do fungo, uma vez que os controles imunocompetentes e imunossuprimidos apresentaram 100% de sobrevivência. Além disso, os camundongos imunossuprimidos foram mais suscetíveis à infecção, pois somente 50% desses chegaram ao final do período

de observação, enquanto que os camundongos imunocompetentes apresentaram 75% de sobrevivência ao fim do experimento. Cabe ressaltar que o grupo de animais imunossuprimidos teve morte precoce quando comparado ao grupo competente. Em experimento anterior (18) os camundongos C57BL/6 imunossuprimidos, infectados com *P. lilacinum*, apresentaram 0% de sobrevivência ao final do experimento (45 dias). Esse resultado foi atribuído, além da presença do fungo, mas principalmente, à dose da dexametasona (5mg/kg) produzindo uma severa imunossupressão e conseqüentemente maior suscetibilidade e morte dos animais. Este resultado nos fez reduzir a dose do imunossupressor para o presente trabalho, permitindo avaliar melhor os animais infectados chegando ao resultado apresentado.

Um dos critérios que utilizamos para avaliar se os animais haviam se infectado foi a recuperação de células fúngicas do baço dos camundongos. O que demonstrou, claramente, a capacidade desse fungo em permanecer viável e circulando no hospedeiro competente quanto nos imunossuprimidos. Foi interessante observar que embora os animais imunocompetentes inoculados por via endovenosa não tenham apresentado qualquer sinal clínico da hialohifomicose, a curva de recuperação das células fúngicas no baço foi bastante similar em ambos os grupos, com o pico de recuperação no dia 7 após a infecção, decaindo gradativamente até o final do experimento. Esses resultados corroboram os dados obtidos por Brito et al. (17) e de Sequeira (18) e demonstram a tentativa do hospedeiro em debelar a infecção. Entretanto, ao imunossuprimir os animais no 21º dia após a infecção, no grupo imunocompetente (CI/SI₁) foi observado um discreto aumento no número de células recuperadas (35º dia), comparado ao grupo imunocompetente que não

foi posteriormente imunossuprimido. Esse resultado sugere que embora a tendência demonstrada pela curva seja de que os camundongos imunocompetentes possuam habilidade para promover o “clearance” da infecção ao longo do tempo, a imunossupressão favoreceu o aumento de células fúngicas no hospedeiro.

Com relação às lesões observadas durante a necropsia dos animais do experimento 1, atribuímos o aumento de tamanho do baço do grupo imunocompetente infectado (CI₁), no primeiro ponto de observação (dia 7 pós inóculo) à intensa resposta linfoproliferativa provocada pela presença do fungo, ao contrário do observado no seu grupo controle (CC₁). A ação da dexametasona sobre a resposta proliferativa dos linfócitos também foi comprovada com base nesses resultados, uma vez que os camundongos dos grupos imunossuprimidos, infectado e controle, apresentaram atrofia do baço e alterações na cor e consistência do órgão (123). Além disso, foram observadas lesões nodulares e amareladas, às quais podemos inferir terem sido provocadas pelo fungo, tendo em vista a cultura positiva do tecido. Esses dados corroboram os resultados de Brito et al. (17) e de Sequeira (18), porém, divergem do observado por Hubálek e Hornich (60), que em trabalho experimental utilizando um isolado de *P. lilacinum* proveniente de plumagem de *Passer domesticus* (pardal) para infecção de camundongos imunocompetentes, observou a presença de lesões no fígado, peritônio e baço desses animais. Contudo, devemos considerar que, além dos autores terem utilizado um inóculo cerca de 500 vezes maior que o utilizado neste estudo, as lesões descritas foram observadas após 55 dias de infecção.

Legrand e colaboradores (110), ao utilizar modelo murino para avaliar hialohifomicose provocada por *Fusarium solani*, demonstraram a presença de infiltrados inflamatórios moderados, formados por células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos. Nossos resultados corroboram os dados da literatura, uma vez que a análise histológica dos órgãos provenientes do experimento 1 demonstrou que os animais imunocompetentes infectados (CI₁ e SI₁) apresentaram alterações no tecido pulmonar e infiltrados inflamatórios do mesmo perfil. Foi possível observar a formação desses infiltrados ao redor de estruturas fúngicas semelhantes a conídios e hifas, evidenciadas pela coloração de Grocott. Com relação a não terem sido encontradas alterações nos cortes histológicos provenientes de camundongos imunossuprimidos, uma possível explicação seria a região do corte histológico investigada, tendo em vista resultados de estudos anteriores de nosso grupo divergirem destes dados exigindo, portanto, análises complementares (18). Além disso, observamos a presença de estruturas fúngicas nos cortes dos animais inicialmente imunocompetentes, que sofreram imunossupressão no 21^o após a inoculação (CI/SI₁) e sendo assim, especulamos que a imunossupressão tardia tenha favorecido a recolonização do tecido pelo fungo, comprovado pela recuperação de células ao final do experimento (35^o dia).

De acordo com diversos autores (4, 6, 111) a análise histopatológica das biópsias de pele dos pacientes infectados com *P. lilacinum* revela a formação de reações granulomatosas, cujos infiltrados inflamatórios são constituídos principalmente por polimorfonucleares e macrófagos, corroborando os resultados obtidos neste trabalho. Nos camundongos utilizados no experimento 2 (avaliação da infecção subcutânea e resposta imune *in situ*), foram

observadas lesões ulceradas no ponto de inoculação, além da formação de infiltrados inflamatórios multifocais e/ou mistos, constituídos por diversas células inflamatórias e diferindo entre os grupos (CI₂ e SI₂) com relação à gravidade, que foi mais acentuada no grupo SI₂. Interessante observar que no trabalho publicado por Permi e colaboradores (6), relatando a infecção provocada por este fungo em paciente imunocompetente, foi observada a formação de fibrose, conforme observamos no presente estudo nos camundongos imunocompetentes. Sabe-se que a fibrose é a formação de tecido constituído por fibras colágenas em um órgão, em resposta à injúria ou dano tecidual, sendo assim, especulamos que a condição imunológica normal do hospedeiro utiliza esse mecanismo para responder à invasão e proliferação do fungo no tecido do hospedeiro.

A análise imunohistoquímica dos fragmentos de tecido coletados dos camundongos inoculados na base da cauda (experimento 2), imunocompetentes (CI₂ e CC₂) e imunossuprimidos (SI₂ e SC₂) nos permitiu identificar e quantificar as células, citocinas e enzimas envolvidas na resposta imune *in situ*. De maneira geral, percentuais de neutrófilos nos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos foram maiores que o de macrófagos, à exceção do 7^o dia após a inoculação, no primeiro grupo. Sabemos que *P. lilacinum* é capaz de destruir, *in vitro*, os macrófagos que fagocitam os conídios, bem como formar tubos germinativos e hifas nas primeiras 24h após a infecção (16). Sendo assim, a acentuada diferença nos percentuais dessas células pode ser atribuída ao fato de que, apesar de os macrófagos serem a primeira linha de defesa contra os conídios, os neutrófilos são a população celular selecionada para eliminar as hifas (112, 113). Hipótese plausível de se

supor uma vez que *P. lilacinum*, assim como outros agentes da hialohifomicose, é um produtor de hifas e estruturas adventícias no tecido (29). Esses resultados são corroborados pelos achados de Demirezen e colaboradores (114), que verificaram o predomínio de neutrófilos sobre macrófagos no esfregaço cervicovaginal de pacientes infectadas com espécies de *Candida*, as quais possuem habilidades de formar hifas e/ ou pseudohifas. Entretanto, em trabalho publicado por Morgado e colaboradores (115), foram verificados maiores percentuais de macrófagos comparados aos neutrófilos nas formas fixas e linfocutâneas da esporotricose. Podemos supor que esses resultados se devem ao fato de *Sporothrix* spp., quando no hospedeiro, adquirir a forma de levedura, contra as quais a resposta imunológica mediada por macrófagos pode ser eficaz. Cabe ressaltar ainda a diferença percentual do número de macrófagos, encontrada nesse trabalho, entre os grupos imunocompetente e imunossuprimido, demonstrando mais uma vez a ação da dexametasona. Sabemos que a droga, ao interferir na síntese de IL-2, pode suprimir a produção de marcadores de inflamação, como IL-1 (14, 116, 117), levando a uma deficiência na função dos macrófagos. Nossos resultados corroboram esses dados, uma vez que a produção de óxido nítrico e IL-1 pelos camundongos imunocompetentes variou de moderada a intensa, especialmente nos períodos finais de observação, enquanto nos camundongos imunossuprimidos se manteve discreta em todos os pontos.

Considerando que os mecanismos de defesa do hospedeiro dependem das ações coordenadas das respostas imune inata e adaptativa, buscamos analisar os mecanismos por meio dos quais camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos reagem frente à infecção sistêmica por *P. lilacinum*.

Primeiramente, quantificamos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em ambos os grupos, e nossos resultados foram compatíveis com os observados por de Sequeira (18) e Machado et al. (118), sugerindo que a dexametasona pode depletar seletivamente linfócitos CD4⁺.

Em 1999, Parimi e colaboradores (119), estudando os efeitos da dexametasona sobre os linfócitos de crianças portadoras de displasia broncopulmonar, observaram que a droga induziu alterações significativas em linfócitos CD4⁺ e na razão CD4⁺/CD8⁺, entretanto, pareceu não ter efeito sobre células CD8⁺. Os autores reforçam ainda, que devido ao fato dos linfócitos CD4⁺ serem a maior fonte de produção de citocinas pró-inflamatórias, o decréscimo no número dessas células poderia explicar as deficiências dos mediadores de inflamação da resposta imune inata, conforme observamos em nosso experimento 2.

Alguns autores consideram a dexametasona capaz de interferir na expansão clonal e diferenciação de células T, de modo geral, uma vez que a droga inibe a expressão de IL-2, citocina essencial para a expansão clonal de linfócitos T (120, 121). No entanto, em 2011, Zhang e Bevan (122) afirmaram que, apesar da IL-2 ser um fator de crescimento de células T, sua expressão em CD8⁺ é relativamente baixa, ao contrário do observado em CD4⁺. Sendo assim, a citocina envolvida na diferenciação das células CD8⁺ seria a IL-12 e por essa razão, essas células seriam relativamente refratárias aos efeitos da dexametasona, continuando a proliferar enquanto outros linfócitos entrariam em apoptose (123). Essa afirmação corrobora os resultados obtidos em nosso estudo, que demonstrou claramente a acentuada mortalidade de linfócitos CD4⁺ dos camundongos imunossuprimidos (SI₁ e SC₁), especialmente

naqueles infectados com o fungo, concordando com os resultados de Brandão (124), que associou a infecção experimental por *Candida albicans* em camundongos ao uso de dexametasona e observou que, somando os efeitos da droga e da infecção, os animais apresentaram intensa depleção linfocitária, comparados àqueles imunocompetentes.

Ao contrário do observado no grupo imunossuprimido, camundongos imunocompetentes apresentaram maiores percentuais de CD4⁺ comparado a CD8⁺, conforme descrito na literatura, especialmente nos camundongos infectados (CI₁) com *P. lilacinum*. Esses dados sugerem que, nos camundongos imunocompetentes, diferentemente do observado nos camundongos imunossuprimidos, no quais a presença do fungo foi capaz de intensificar a mortalidade celular, a linfoproliferação de CD4⁺ foi estimulada pela presença do patógeno.

Em trabalho experimental demonstrando a infecção em camundongos pelo fungo *Cryptococcus neoformans*, Lindell e colaboradores (105) demonstraram a capacidade protetora de células CD8⁺ em ausência de CD4⁺, por meio do reconhecimento de macrófagos infectados com o fungo e consequente produção de IFN- γ . É importante lembrar que, embora não sejam claros os mecanismos por meio dos quais a resposta imune promovida pelos linfócitos CD8⁺ nas infecções fúngicas é efetuada, sabe-se que, em indivíduos com deficiência de CD4⁺, os linfócitos CD8⁺ adquirem marcadores de ativação com magnitude similar, além de se diferenciarem em células efetoras produtoras de IFN- γ sem o “help” de CD4⁺.

No grupo dos camundongos inicialmente imunocompetentes que foram, posteriormente, imunossuprimidos (CI/SI₁), observamos após a

imunossupressão, a inversão na razão CD4⁺/CD8⁺. Embora não tenhamos quantificado os linfócitos antes da administração da dexametasona, assumimos que os animais tinham percentuais equivalentes aos observados nos camundongos imunocompetentes aos 21 dias após a infecção, verificamos maiores percentuais de CD4⁺. Ao perfazer a imunossupressão e após 14 dias, portanto no 35º dia após o inóculo, quantificamos essas células e percebemos que, conforme o esperado, a mortalidade de CD4⁺ foi acentuada e CD8⁺ apresentou maiores percentuais celulares.

A ativação de linfócitos T virgens ocorre após a apresentação do antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) nos órgãos linfóides secundários. O design da resposta imune se dá pelo reconhecimento antigênico e ação de moléculas co-estimulatórias que induzem os processos de ativação e diferenciação expressos pelo aumento ou diminuição de várias outras moléculas (125). Sabemos que a geração de células de memória é delineada por sua capacidade de migração e função efetora (126) e essas células podem ser categorizadas de acordo com a co-expressão de CD62L e CCR7 (96).

Em nosso trabalho foi possível identificar linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ de memória central e memória efetora/efetores. No primeiro ponto de observação (7 dias), linfócitos CD8⁺ de memória central e efetora/efetores oriundos de camundongos imunocompetentes foram as maiores populações encontradas. Apesar do consenso entre alguns pesquisadores de que linfócitos CD4⁺ sejam necessários (127, 128), alguns trabalhos relatam que linfócitos CD8⁺ requerem um tempo menor para iniciar a expansão clonal e, conseqüentemente, responder ao estímulo antigênico, o que poderia explicar nossos resultados

(129, 130). Nos períodos subsequentes, não observamos diferenças estatísticas entre os percentuais de linfócitos CD8⁺ de memória central entre os grupos imunocompetente e imunossuprimido, porém, do período inicial (dia 7) ao intermediário (14^o dia após a infecção), notamos uma maior população de células CD8⁺ de memória efetora/efetoras em ambos os grupos. No grupo imunocompetente, essa diferença foi maior no grupo controle, ao contrário do grupo imunossuprimido, cujos animais infectados apresentaram maiores percentuais desse fenótipo, comparado àqueles que foram inoculados com PBS. Podemos supor que, em razão da deficiência de CD4⁺, as células dos imunossuprimidos (CI₁) tenham expressado esse fenótipo na tentativa de conter a carga fúngica (106), ainda considerável neste ponto de observação como registrado no gráfico de recuperação de células (Figura 4).

No que concerne à cinética da expressão de linfócitos CD4⁺ de memória central e efetora/efetores, nossos dados foram bastante heterogêneos. Observamos o predomínio de células de memória central de camundongos imunocompetentes infectados com *P. lilacinum* sobre imunossuprimidos (CI₁ e SI₁, respectivamente), nos períodos inicial (dia 7) e final (dia 21) da infecção, enquanto no período intermediário não foram observadas diferenças entre os grupos. Se considerarmos que a presença do patógeno pode induzir a ativação de APCs e, conseqüentemente a apresentação desses antígenos nos órgãos linfóides, onde reside esse fenótipo celular, podemos pressupor que essas células sofrem ondas de ativação durante a infecção crônica por nós observada.

Correlacionando os dados da análise citofluorimétrica com a observação do curso da doença nos camundongos aqui estudados, observamos que, de

uma maneira geral, o fenótipo de linfócitos CD4⁺ de memória efetora/efetores apresentou percentuais mais altos comparados às células de memória central, conforme o esperado numa infecção sistêmica com comprometimento e/ou presença do fungo em órgãos e tecidos, como por nós demonstrado. Tais resultados confirmam o descrito na literatura, a respeito da capacidade desse subtipo celular de migrar para os tecidos periféricos e produzir citocinas em resposta à presença do patógeno (126).

Diversos estudos têm demonstrado que o padrão Th1 de citocinas possui maior efetividade no controle das infecções fúngicas (13, 62, 131). No entanto, para impedir a exacerbação da resposta inflamatória, que pode resultar em maior lesão tecidual, há mecanismos imunorregulatórios que controlam a evolução da resposta imune, dentre eles, a formação de células T regulatórias (132). Em nosso trabalho, foi possível identificar a presença de células T regulatórias, destacando que no primeiro ponto de observação (dia 7), as células dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos infectados com o fungo (CI₁ e SI₁, respectivamente) apresentaram menores percentuais desse fenótipo, comparado aos respectivos controles (CC₁ e SC₁).

Tal perfil foi também observado por Berod e colaboradores (133), em infecção experimental de camundongos com *Mycobacterium bovis* e os autores concluíram que a possível explicação para esse fato se deve a maior produção de células T efetoras na fase aguda da infecção, com o objetivo de conter a ação do patógeno. Após esse período, foi possível notar, no presente trabalho, que os grupos infectados (CI₁ e SI₁) passaram a expressar mais T_{regs} que seus controles (CC₁ e SC₁), especialmente os imunossuprimidos.

Correlacionando estes dados com os obtidos na análise imunohistoquímica, na qual observamos um predomínio de neutrófilos sobre macrófagos, podemos supor que as T_{reg} podem ter sido requeridas para controlar a inflamação. Sabemos que não apenas reduzem a função das APCs, mas também criam um ambiente imunossupressor por meio da redução de IL-6 e aumento da produção de IL-10, desta forma, suprimindo os efeitos potencialmente deletérios de neutrófilos por meio da ação da IL-10 (79).

Adicionalmente à celularidade, expansão e geração/manutenção de células de memória central e efetora/efetoras e células T regulatórias, outro parâmetro considerado relevante ao avaliarmos a resposta imune à *P. lilacinum*, é o perfil funcional dessas mesmas células, ou seja, a produção de citocinas. Em nosso estudo, avaliamos a produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-2 por linfócitos CD4+ e CD8+ coletados do baço de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. Nesse contexto, devemos considerar as diferenças entre os dois grupos experimentais, uma vez que, sabe-se que os glucocorticóides, como a dexametasona, são potentes imunossupressores capazes de alterar as funções proliferativas dos linfócitos, bem como a resposta inflamatória de macrófagos e outras células(134).

No trabalho publicado em 2005, Antachopoulos e Roilides (14) descreveram o papel fundamental de citocinas do tipo Th1, como IFN- γ e TNF- α na resposta imune efetiva contra fungos. IFN- γ produzido pelos linfócitos estimula a migração, adesão e atividade antifúngica de macrófagos e neutrófilos contra *Candida* spp. e fungos filamentosos. Além disso, essa citocina é capaz de prevenir a supressão da atividade de monócitos induzida

pela dexametasona. Os autores relataram ainda que TNF- α , além de estimular as funções de fagócitos, induzem a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , IL-1, IL-16 e IL-12. A importância da IL-2 nas infecções fúngicas é refletida por sua capacidade de interagir com linfócitos T que expressam seus receptores e estimular sua proliferação. Além disso, foram descritas suas propriedades semelhantes à lectina, com especificidade de se ligar à manose presente na parede celular de *Candida* spp., otimizando a resposta imune à esse patógeno (107).

A produção de citocinas supracitadas por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, avaliada no presente trabalho, chama a atenção pelo elevado percentual de produção por linfócitos provenientes dos camundongos imunossuprimidos, principalmente IFN- γ , comparado aos imunocompetentes. Apesar de alguns autores relatarem que hospedeiros imunocompetentes produzem maiores percentuais de citocinas que os imunossuprimidos, uma explicação para nossos resultados é a de que a imunossupressão pode ter induzido uma superativação desses linfócitos e conseqüentemente alta produção de citocinas, na tentativa de coordenar a resposta à infecção, especialmente no período inicial da infecção (dia 7), em virtude do alto número de células fúngicas recuperadas do baço desses animais.

Resultados similares aos nossos foram obtidos por Machado e colaboradores (118), em estudo experimental utilizando camundongos BALB/c imunocompetentes e imunossuprimidos infectados por *Leishmania chagasi*. Os autores observaram um aumento significativo de IFN- γ e IL-2 nos grupos imunossuprimidos, comparados aos imunocompetentes, entretanto, assim como por nós observado, esses maiores percentuais de produção de citocinas

não tiveram relação com a diminuição da carga parasitária. Os autores afirmam ainda que, apesar dos altos percentuais de produção de IFN- γ , a resposta do hospedeiro pode ser defectiva, devido a falhas na resposta via IFN- γ .

Em síntese, consideramos que nossos resultados reunidos, ampliam os conhecimentos não apenas sobre *Purpureocillium lilacinum*, mas também sobre as bases da relação parasito-hospedeiro, de modo a contribuir para o entendimento de seus mecanismos de resistência e susceptibilidade.

7. CONCLUSÕES

Os resultados da avaliação da infecção experimental e da resposta imune de camundongos C57BL/6, imunocompetentes e imunossuprimidos, permitem concluir:

- ❖ O fungo foi capaz de infectar, mesmo em baixo inóculo, hospedeiros imunocompetentes e imunossuprimidos. O modelo imunocompetente, apesar de comprovada a infecção, não desenvolveu sinais visíveis de hialohifomicose, ao contrário do observado nos imunossuprimidos que apresentaram sinais clínicos da doença como lesões dermatológicas e ceratites, compatíveis com a descrição na literatura dos casos clínicos humanos de hialohifomicose;
- ❖ O fosfato dissódico de dexametasona foi eficiente na imunossupressão dos camundongos, demonstrada pelas alterações de comportamento, peso, coloração e textura dos órgãos internos e atrofia do baço, em virtude de mortalidade celular, comprovada pela quantificação dessas células por citometria de fluxo;
- ❖ Os camundongos imunocompetentes infectados apresentaram taxa de sobrevivência maior que os animais imunossuprimidos. Houve aumento do número de células fúngicas no baço dos camundongos imunossuprimidos, estatisticamente maior que nos imunocompetentes no início da infecção. Além disso, a imunossupressão foi capaz de aumentar o número de células fúngicas no baço dos camundongos,

inicialmente, imunocompetentes que foram, posteriormente, imunossuprimidos, indicando que deficiências na resposta celular favorecem a infecção fúngica;

❖ A análise histopatológica dos órgãos dos camundongos infectados revelou:

- a maioria dos animais inoculados por via intravenosa não apresentou alterações no tecido hepático e pulmonar, porém células fúngicas, semelhantes a conídios, foram observadas, juntamente a linfócitos e plasmócitos.

- os animais imunocompetentes infectados por via subcutânea apresentaram dermatite, paniculite e ulcerações na pele com infiltrado inflamatório difuso atingindo as dermes superficial e profunda, constituído por neutrófilos, macrófagos e linfócitos com presença de conídios e hifas. Os imunossuprimidos apresentaram lesões mais severas e maior número de estruturas fúngicas que os imunocompetentes.

❖ A análise do perfil imunológico dos animais infectados revelou:

- na resposta imune sistêmica: houve um predomínio de linfócitos CD4⁺ nos animais imunocompetentes, cuja proporção de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ se inverteu nos imunossuprimidos, comprovando a ação da dexametasona sobre linfócitos CD4⁺. CD4⁺ de memória efetora/efetores foi o fenótipo expresso em maiores percentuais em ambos os modelos, provavelmente por

essas células terem a capacidade de migrar para tecidos periféricos e neles realizar suas funções. Maior expressão de células de memória central e memória efetora/efetora CD8⁺, no início da infecção, especialmente no grupo dos imunossuprimidos com deficiência de CD4⁺, podendo ser fundamental para uma boa resposta imunológica. Maiores percentuais de T_{reg} em imunossuprimidos, provavelmente porque nesses animais os efeitos da inflamação mediada por neutrófilos poderiam gerar dano aos hospedeiros. Maior percentual das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-2 no período inicial da infecção (7 dias), resultado, provável, da produção intensa pelos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ na tentativa de debelar a infecção.

- na resposta imune *in situ*: foram observados menores percentuais de macrófagos e neutrófilos, além de menor produção de óxido nítrico e IL-1 por macrófagos dos animais imunossuprimidos demonstrando a interferência quantitativa e qualitativa da dexametasona sobre as células envolvidas na resposta ao fungo.

8. PERSPECTIVAS

Como principal perspectiva, temos a publicação de dois artigos, um deles já em fase de submissão. Adicionalmente, aguardamos o resultado do processo seletivo PDJ (Pós-doutorado Junior) do CNPq, para o qual submetemos um projeto que visa a caracterização de peptídeos fúngicos que reajam com soro de camundongo por *Immunoblotting* seguida de análise proteômica por MALDI-TOF.

Consideramos que estas abordagens podem contribuir para a obtenção de dados novos e a compreensão de aspectos ainda não elucidados da resposta imune contra *P.lilacinum*, não apenas no modelo experimental, mas principalmente promovendo informações básicas para estudos futuros acerca do potencial infeccioso deste fungo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Luangsa-Ard J, Houbraken J, van Doorn T, Hong SB, Borman AM, Hywel-Jones NL, et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiol Lett. 2011;321(2):141-9.
2. Tan TQ, Ogden AK, Tillman J, Demmler GJ, Rinaldi MG. *Paecilomyces lilacinus* catheter-related fungemia in an immunocompromised pediatric patient. J Clin Microbiol. 1992;30(9):2479-83.
3. Shivaprasad A, Ravi GC, Shivapriya, Rama. A Rare Case of Nasal Septal Perforation Due to *Purpureocillium lilacinum*: Case Report and Review. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg. 2013;65(2):184-8.
4. Saghrouni F, Saidi W, Ben Said Z, Gheith S, Ben Said M, Ranque S, et al. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Purpureocillium lilacinum* in an immunocompetent patient: case report and review. Med Mycol. 2013;51(6):664-8.
5. Todokoro D, Yamada N, Fukuchi M, Kishi S. Topical voriconazole therapy of *Purpureocillium lilacinum* keratitis that occurred in disposable soft contact lens wearers. Int Ophthalmol. 2014;34(5):1159-63.
6. Permi HS, Sunil KY, Karnaker VK, Kishan PH, Teerthanath S, Bhandary SK. A rare case of fungal maxillary sinusitis due to *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host, presenting as a subcutaneous swelling. J Lab Physicians. 2011;3(1):46-8.
7. Antas PR, Brito MM, Peixoto E, Ponte CG, Borba CM. Neglected and emerging fungal infections: review of hyalohyphomycosis by *Paecilomyces*

lilacinus focusing in disease burden, in vitro antifungal susceptibility and management. *Microbes Infect.* 2012;14(1):1-8.

8. Huang CY, Sun PL, Tseng HK. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* successfully treated by oral voriconazole and nystatin packing. *Mycopathologia.* 2011;172(2):141-5.

9. Ding CH, Tzar MN, Rahman MM, Muttaqillah NA, Redzuan SR, Periyasamy P. *Paecilomyces lilacinus* fungaemia in an AIDS patient: the importance of mycological diagnosis. *Pak J Med Sci.* 2014;30(4):914-6.

10. Pastor FJ, Guarro J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(10):948-60.

11. Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol.* 2005;129(5):569-82.

12. Stock P, Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Respiratory tolerance is inhibited by the administration of corticosteroids. *J Immunol.* 2005;175(11):7380-7.

13. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):275-88.

14. Antachopoulos C, Roilides E. Cytokines and fungal infections. *Br J Haematol.* 2005;129(5):583-96.

15. Peixoto ML, Santos DO, Souza Ide C, Neri EC, Sequeira DC, De Luca PM, et al. Interaction of an opportunistic fungus *Purpureocillium lilacinum* with human macrophages and dendritic cells. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(5):613-7.

16. Peixoto E, Oliveira JC, Antas PR, Borba CM. In-vitro study of the host-parasite interactions between mouse macrophages and the opportunistic fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010;104(6):529-34.
17. Brito MM, Lima Mda S, Morgado FN, Raibolt P, Menezes R, Conceicao-Silva F, et al. Characteristics of *Paecilomyces lilacinus* infection comparing immunocompetent with immunosuppressed murine model. *Mycoses*. 2011;54(5):e513-21.
18. de Sequeira DCM. Interação in vivo do fungo *Paecilomyces lilacinus*, agente causal da hialohifomicose, com o modelo murino C57BL/6 Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - FIOCRUZ; 2012.
19. de Sequeira DC, Peixoto ML, De Luca PM, Oliveira-Ferreira J, Antas PR, Borba CM. Detection of antibody to *Purpureocillium lilacinum* by immunofluorescent assay and flow cytometry in serum of infected C57BL/6 mice. *J Immunol Methods*. 2013;396(1-2):147-51.
20. Khan A, Williams K, Molloy MP, Nevalainen H. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein Expr Purif*. 2003;32(2):210-20.
21. Wang J, Wang J, Liu F, Pan C. Enhancing the virulence of *Paecilomyces lilacinus* against *Meloidogyne incognita* eggs by overexpression of a serine protease. *Biotechnol Lett*. 2010;32(8):1159-66.
22. Yang F, Abdelnabby H, Xiao Y. The role of a phospholipase (PLD) in virulence of *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinum*). *Microb Pathog*. 2015;85:11-20.

23. Martinez AF, Moraes LA. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of five new leucinostatins produced by *Paecilomyces lilacinus* CG-189. *J Antibiot (Tokyo)*. 2015;68(3):178-84.
24. Westenfeld F, Alston WK, Winn WC. Complicated soft tissue infection with prepatellar bursitis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host: case report and review. *J Clin Microbiol*. 1996;34(6):1559-62.
25. Mikami Y, Yazawa K, Fukushima K, Arai T, Udagawa S, Samson RA. Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains. *Mycopathologia*. 1989;108(3):195-9.
26. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*. 2003;38(2):143-58.
27. Egorova AS, Gessler NN, Belozerskaya TA. Melanin pigments in the fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Dokl Biochem Biophys*. 2011;437:84-6.
28. Ajello L. Hyalohyphomycosis. A disease entity whose time has come. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 1987:242-7.
29. Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis*. 1996;22 Suppl 2:S112-8.
30. Das S, Saha R, Dar SA, Ramachandran VG. *Acremonium* species: a review of the etiological agents of emerging hyalohyphomycosis. *Mycopathologia*. 2010;170(6):361-75.

31. Barra P, Etcheverry M, Nesci A. Improvement of the insecticidal capacity of two *Purpureocillium lilacinum* strains against *Tribolium confusum*. *Insects*. 2015;6(1):206-23.
32. Sharma A, Sharma S, Mittal A, Naik SN. Evidence for the involvement of nematocidal toxins of *Purpureocillium lilacinum* 6029 cultured on Karanja deoiled cake liquid medium. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32(5):82.
33. Gordon MA. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, from systemic infection in an armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *Sabouraudia*. 1984;22(2):109-16.
34. Schumacher VL, Mangold B, Lenzycki J, Hinckley L, Sutton DA, Frasca S, Jr. Occurrence of fruiting structures allows determination of *Purpureocillium lilacinum* as an inciting agent of pleuritis and pneumonia in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) by histopathologic correlation to culture. *Med Mycol Case Rep*. 2014;6:42-5.
35. Littman MP, Goldschmidt MH. Systemic paecilomycosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 1987;191(4):445-7.
36. Pawloski DR, Brunner JD, Singh K, Sutton DA. Pulmonary *Paecilomyces lilacinus* infection in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2010;46(3):197-202.
37. Demitsu T, Nagashima K, Okabe T, Morisawa Y, Ishikawa N, Yagisawa T, et al. Subcutaneous hyalohyphomycosis due to *Purpureocillium lilacinum* in an immunocompromised patient after renal transplantation. *J Dermatol*. 2016.
38. Lopez-Medrano R, Perez Madera A, Fuster Foz C. Eye infections caused by *Purpureocillium lilacinum*: A case report and literature review. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32(2):111-4.

39. Narita A, Seguchi J, Shiraga F. *Paecilomyces lilacinus*-induced scleritis following bleb-associated endophthalmitis after trabeculectomy. *Acta Med Okayama*. 2015;69(5):313-8.
40. Borba CM, Brito MMS. *Paecilomyces*: Mycotoxin production and human infection, in Paterson RM, Lima N (Eds), *Molecular biology of food and water borne mycotoxigenic and mycotic fungi*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2016, pp 401-23.
41. Evans JM, Wang AL, Elewski BE. Successful Treatment of *Paecilomyces lilacinus* onychomycosis with efinaconazole and tavaborole. *Skin Appendage Disord*. 2016;1(4):169-71.
42. Mihailovic N, Alnawaiseh M, Zumhagen L, Eter N. Contact lens-associated *Paecilomyces lilacinus* keratitis. *Ophthalmologe*. 2016.
43. Sharma V, Angrup A, Panwar P, Verma S, Singh D, Kanga A. Keratitis by *Paecilomyces lilacinus*: A case report from sub-himalayan region. *Indian J Med Microbiol*. 2015;33(4):585-7.
44. Turner LD, Conrad D. Retrospective case-series of *Paecilomyces lilacinus* ocular mycoses in Queensland, Australia. *BMC Res Notes*. 2015; 8:627.
45. Ciecko SC, Scher R. Invasive fungal rhinitis caused by *Paecilomyces lilacinus* infection: Report of a case and a novel treatment. *Ear Nose Throat J*. 2010;89(12):594-5.
46. Wolley M, Collins J, Thomas M. *Paecilomyces lilacinus* peritonitis in a peritoneal dialysis patient. *Perit Dial Int*. 2012;32(3):364-5.
47. Itin PH, Frei R, Lautenschlager S, Buechner SA, Surber C, Gratwohl A, et al. Cutaneous manifestations of *Paecilomyces lilacinus* infection induced by a

contaminated skin lotion in patients who are severely immunosuppressed. *J Am Acad Dermatol.* 1998;39(3):401-9.

48. Orth B, Frei R, Itin PH, Rinaldi MG, Speck B, Gratwohl A, et al. Outbreak of invasive mycoses caused by *Paecilomyces lilacinus* from a contaminated skin lotion. *Ann Intern Med.* 1996;125(10):799-806.

49. Arnoldner MA, Kheirkhah A, Jakobiec FA, Durand ML, Hamrah P. Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* keratitis with oral posaconazole. *Cornea.* 2014;33(7):747-9.

50. Ali TK, Amescua G, Miller D, Suh LH, Delmonte DW, Gibbons A. Contact-lens-associated *Purpureocillium* Keratitis: Risk factors, microbiologic characteristics, clinical course and outcomes. *Semin Ophthalmol.* 2015:1-6.

51. Hofling-Lima AL, Forseto A, Duprat JP, Andrade A, Souza LB, Godoy P. Laboratory study of the mycotic infectious eye diseases and factors associated with keratitis. *Arq Bras Oftalmol.* 2005;68(1):21-7.

52. Castro LG, Salebian A, Sotto MN. Hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* in a renal transplant patient and a review of human *Paecilomyces* species infections. *J Med Vet Mycol.* 1990;28(1):15-26.

53. Atkins SD, Clark IM, Pande S, Hirsch PR, Kerry BR. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005;51(2):257-64.

54. McLintock CA, Lee GA, Atkinson G. Management of recurrent *Paecilomyces lilacinus* keratitis. *Clin Exp Optom.* 2013;96(3):343-5.

55. Chang BP, Sun PL, Huang FY, Tsai TC, Lin CC, Lee MD, et al. *Paecilomyces lilacinus* peritonitis complicating peritoneal dialysis cured by oral

voriconazole and terbinafine combination therapy. J Med Microbiol. 2008;57(Pt 12):1581-4.

56. Yuan X, Wilhelmus KR, Matoba AY, Alexandrakis G, Miller D, Huang AJ. Pathogenesis and outcome of *Paecilomyces* keratitis. Am J Ophthalmol. 2009;147(4):691-6 e3.

57. Gottlieb T, Atkins BL. Case report. Successful treatment of cutaneous *Paecilomyces lilacinus* infection with oral itraconazole in an immune competent host. Mycoses. 2001;44(11-12):513-5.

58. Hubalek Z, Hornich M. Experimental infection of white mouse with *Chrysosporium* and *Paecilomyces*. Mycopathologia. 1977;62(3):173-8.

59. Pujol IA, C.; Ortoneda, M.; Pastor, J.; Mayayo, E.; Guarro, J. Experimental pathogenicity of three opportunist *Paecilomyces* species in a murine model. Journal de Mycologie Medicale 2002;12(2):86-9.

60. Agrawal PK, Lal B, Wahab S, Srivastava OP, Misra SC. Orbital paecilomycosis due to *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. Sabouraudia. 1979;17(4):363-70.

61. Sponsel W, Chen N, Dang D, Paris G, Graybill J, Najvar LK, et al. Topical voriconazole as a novel treatment for fungal keratitis. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(1):262-8.

62. Hohl TM, Rivera A, Pamer EG. Immunity to fungi. Curr Opin Immunol. 2006;18(4):465-72.

63. Collette JR, Lorenz MC. Mechanisms of immune evasion in fungal pathogens. Curr Opin Microbiol. 2011;14(6):668-75.

64. Chai LY, Netea MG, Vonk AG, Kullberg BJ. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. Med Mycol. 2009;47(3):227-36.

65. Chai LY, Kullberg BJ, Vonk AG, Warris A, Cambi A, Latge JP, et al. Modulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 responses by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 2009;77(5):2184-92.
66. Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, et al. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis*. 2003;188(2):320-6.
67. Safdar A, Rodriguez G, Ohmagari N, Kontoyiannis DP, Rolston KV, Raad. The safety of interferon-gamma-1b therapy for invasive fungal infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer*. 2005;103(4):731-9.
68. Bellocchio S, Bozza S, Montagnoli C, Perruccio K, Gaziano R, Pitzurra L, et al. Immunity to *Aspergillus fumigatus*: the basis for immunotherapy and vaccination. *Med Mycol*. 2005;43 Suppl 1:S181-8.
69. Calich VL, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(5):615-23.
70. Tsiodras S, Samonis G, Boumpas DT, Kontoyiannis DP. Fungal infections complicating tumor necrosis factor alpha blockade therapy. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(2):181-94.
71. Filler SG, Yeaman MR, Sheppard DC. Tumor necrosis factor inhibition and invasive fungal infections. *Clin Infect Dis*. 2005;41 Suppl 3:S208-12.
72. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(2):247-80.
73. Miranda LH, Santiago Mde A, Schubach TM, Morgado FN, Pereira SA, de Oliveira Rde V, et al. Severe feline sporotrichosis associated with an

increased population of CD8^{low} cells and a decrease in CD4⁽⁺⁾ cells. *Med Mycol.* 2016;54(1):29-39.

74. Sa VC, Silva TA, Reis CM, Cunha FQ, Figueiredo F, Bocca AL. The pattern of immune cell infiltration in chromoblastomycosis: involvement of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 and fungi persistence. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49(1):49-53.

75. Lin WL, Lin WC, Chiu CS. *Paecilomyces lilacinus* cutaneous infection associated with peripherally inserted central catheter insertion. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008;22(10):1267-8.

76. Gutierrez-Rodero F, Moragon M, Ortiz de la Tabla V, Mayol MJ, Martin C. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host successfully treated with itraconazole: case report and review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;18(11):814-8.

77. Song IH, Gold R, Straub RH, Burmester GR, Buttgereit F. New Glucocorticoids on the Horizon: Repress, Don't Activate! *J Rheumatol.* 2005;32(6):1199-207.

78. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet.* 2003;362(9398):1828-38.

79. van de Veerdonk FL, Netea MG. T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses. *Curr Fungal Infect Rep.* 2010;4(4):238-43.

80. Franchimont D, Galon J, Gadina M, Visconti R, Zhou Y, Aringer M, et al. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol.* 2000;164(4):1768-74.

81. 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(3):189-97.
82. Vecchiarelli A MA, Bistoni F. . Lymphocytes. In: MG BGN, editor. *Immunology of fungal infections*. USA: Springer; 2007.
83. Espinosa V, Rivera A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. *Cytokine*. 2012;58(1):100-6.
84. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500.
85. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(3):253-7.
86. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
87. Lastovicka J. The Phenotypic Markers of CD4+CD25+ T Regulatory Lymphocytes. *Research in Immunology: An International Journal*. 2013;2013 Article ID 119348.
88. Richert-Spuhler LE, Lund JM. The Immune Fulcrum: Regulatory T Cells Tip the Balance Between Pro- and Anti-inflammatory Outcomes upon Infection. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;136:217-43.
89. Bacher P, Kniemeyer O, Schonbrunn A, Sawitzki B, Assenmacher M, Rietschel E, et al. Antigen-specific expansion of human regulatory T cells as a major tolerance mechanism against mucosal fungi. *Mucosal Immunol*. 2014;7(4):916-28.

90. Schulze B, Piehler D, Eschke M, von Buttlar H, Kohler G, Sparwasser T, et al. CD4(+) FoxP3(+) regulatory T cells suppress fatal T helper 2 cell immunity during pulmonary fungal infection. *Eur J Immunol*. 2014;44(12):3596-604.
91. Casadevall A, Feldmesser M, Pirofski LA. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5(4):386-91.
92. Alves CC, Azevedo AL, Rodrigues MF, Machado RP, Souza MA, Machado MA, et al. Cellular and humoral immune responses during intrathoracic paracoccidioidomycosis in BALB/c mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009;32(6):513-25.
93. Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;125(1-2):47-70.
94. Chang JT, Wherry EJ, Goldrath AW. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2014;15(12):1104-15.
95. Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. From vaccines to memory and back. *Immunity*. 2010;33(4):451-63.
96. Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med*. 2004;200(6):725-35.
97. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.

98. Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:137-61.
99. Forster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):362-71.
100. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-12.
101. Bjorkdahl O, Barber KA, Brett SJ, Daly MG, Plumpton C, Elshourbagy NA, et al. Characterization of CC-chemokine receptor 7 expression on murine T cells in lymphoid tissues. *Immunology.* 2003;110(2):170-9.
102. Hengel RL, Thaker V, Pavlick MV, Metcalf JA, Dennis G, Jr., Yang J, et al. Cutting edge: L-selectin (CD62L) expression distinguishes small resting memory CD4+ T cells that preferentially respond to recall antigen. *J Immunol.* 2003;170(1):28-32.
103. Peach RJ, Hollenbaugh D, Stamenkovic I, Aruffo A. Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J Cell Biol.* 1993;122(1):257-64.
104. Baaten BJ, Li CR, Deiro MF, Lin MM, Linton PJ, Bradley LM. CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. *Immunity.* 2010;32(1):104-15.
105. Lindell DM, Moore TA, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Generation of antifungal effector CD8+ T cells in the absence of CD4+ T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol.* 2005;174(12):7920-8.

106. Nanjappa SG, Heninger E, Wuthrich M, Sullivan T, Klein B. Protective antifungal memory CD8(+) T cells are maintained in the absence of CD4(+) T cell help and cognate antigen in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(3):987-99.
107. Treseler CB, Maziarz RT, Levitz SM. Biological activity of interleukin-2 bound to *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1992;60(1):183-8.
108. Gohman-Yahr M, Pine L, Albornoz MC, Yarzabal L, de Gomez MH, San Martin B, et al. Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Mycopathologia.* 1980;71(2):73-83.
109. Borba CM, Vinhas EA, Lopes-Bezerra LM, Lucena-Silva N. Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2005;88(3-4):257-66.
110. Legrand C, Anaissie E, Hashem R, Nelson P, Bodey GP, Ro J. Experimental fusarial hyalohyphomycosis in a murine model. *J Infect Dis.* 1991;164(5):944-8.
111. Bassiri-Jahromi S. Cutaneous *Paecilomyces lilacinus* infections in immunocompromised and immunocompetent patients. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2014;80(4):331-4.
112. Cenci E, Perito S, Enssle KH, Mosci P, Latge JP, Romani L, et al. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect Immun.* 1997;65(2):564-70.
113. Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo

and in vitro with human and mouse phagocytes. J Clin Invest. 1982;69(3):617-31.

114. Demirezen S, Donmez HG, Ozcan M, Beksac MS. Evaluation of the relationship between fungal infection, neutrophil leukocytes and macrophages in cervicovaginal smears: Light microscopic examination. J Cytol. 2015;32(2):79-84.

115. Morgado FN, Schubach AO, Barros MB, Conceicao-Silva F. The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. Med Mycol. 2011;49(6):612-20.

116. Orlikowsky TW, Dannecker GE, Spring B, Eichner M, Hoffmann MK, Poets CF. Effect of dexamethasone on B7 regulation and T cell activation in neonates and adults. Pediatr Res. 2005;57(5 Pt 1):656-61.

117. Paliogianni F, Ahuja SS, Balow JP, Balow JE, Boumpas DT. Novel mechanism for inhibition of human T cells by glucocorticoids. Glucocorticoids inhibit signal transduction through IL-2 receptor. J Immunol. 1993;151(8):4081-9.

118. Machado JG HJ, Krause VLK , da Silva AV , Dias-Melicio LA, Langoni H. Cell-mediated immune response to *Leishmania chagasi* experimental infection of BALB/c immunosuppressed mice. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2010;16(1):131-46.

119. Parimi PS, Birnkrant DJ, Rao LV, Diaz G, Moore JJ. Effect of dexamethasone on lymphocyte subpopulations in premature infants with bronchopulmonary dysplasia. J Perinatol. 1999;19(5):347-51.

120. Lesniak MS, Gabikian P, Tyler BM, Pardoll DM, Brem H. Dexamethasone mediated inhibition of local IL-2 immunotherapy is dose dependent in experimental brain tumors. *J Neurooncol.* 2004;70(1):23-8.
121. Diasio RB, LoBuglio AF. Immunomodulators: Immunossuppressive agents and immunostimulants. In Goodman and Gilman (Eds), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY, 1996, pp 1291-308.
122. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* 2011;35(2):161-8.
123. Miller TA, Schaefer FW, 3rd. Changes in mouse circulating leukocyte numbers in C57BL/6 mice immunosuppressed with dexamethasone for *Cryptosporidium parvum* oocyst production. *Vet Parasitol.* 2007;149(3-4):147-57.
124. BrandãoAAH. Experimental immunosuppression in mice. Histological aspects of lymphoid organs after dexamethasone treatment and inoculation with *Candida albicans*. *Rev Odont UNESP.* 1991;20:9-16.
125. Sallusto F. The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Haematologica.* 1999;84 Suppl EHA-4:28-31.
126. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(3):326-32.
127. Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature.* 2005;434(7029):88-93.
128. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science.* 2003;300(5617):337-9.

129. Ravkov EV, Williams MA. The magnitude of CD4+ T cell recall responses is controlled by the duration of the secondary stimulus. *J Immunol.* 2009;183(4):2382-9.
130. De Boer RJ, Homann D, Perelson AS. Different dynamics of CD4+ and CD8+ T cell responses during and after acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol.* 2003;171(8):3928-35.
131. Safdar A. Antifungal immunity and adjuvant cytokine immune enhancement in cancer patients with invasive fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(1):1-4.
132. Campbell DJ, Koch MA. Treg cells: patrolling a dangerous neighborhood. *Nat Med.* 2011;17(8):929-30.
133. Berod L, Stuve P, Varela F, Behrends J, Swallow M, Kruse F, et al. Rapid rebound of the Treg compartment in DEREK mice limits the impact of Treg depletion on mycobacterial burden, but prevents autoimmunity. *PLoS One.* 2014;9(7):e102804.
134. Kunicka JE, Talle MA, Denhardt GH, Brown M, Prince LA, Goldstein G. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell Immunol.* 1993;149(1):39-49.

10. ANEXO

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

1 - Artigo publicado como primeiro autor

Journal of Immunological Methods 396 (2013) 147–151

Contents lists available at ScienceDirect

 **Journal of Immunological Methods** 

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim

Technical note

Detection of antibody to *Purpureocillium lilacinum* by immunofluorescent assay and flow cytometry in serum of infected C57BL/6 mice 

Danielly C.M. de Sequeira^{a,c}, Mariana L.P. Peixoto^a, Paula M. De Luca^b, Joseli Oliveira-Ferreira^b, Paulo R.Z. Antas^{c,*}, Cintia M. Borba^{a,1,**}

^a Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil
^b Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil
^c Laboratório de Imunologia Clínica, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

2 – Artigo publicado em co-autoria

 Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 47(5):613-617, Sep-Oct, 2014
<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0105-2014> **Major Article**

Interaction of an opportunistic fungus *Purpureocillium lilacinum* with human macrophages and dendritic cells

**Mariana Lima Perazzini Peixoto^[1], Dilvani Oliveira Santos^[2],
Ivy de Castro Campos de Souza^[2], Eloah Christina Lyrio Neri^[2],
Danielly Correa Moreira de Sequeira^[1], Paula Mello De Luca^[3]
and Cíntia de Moraes Borba^[1]**

[1] Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. [2] Laboratório de Biopatógenos e Ativação Celular, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. [3] Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.