

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS  
INFECCIOSAS

DANIELLY CORRÊA MOREIRA DE SEQUEIRA

**INTERAÇÃO *IN VIVO* DO FUNGO *PAECILOMYCES*  
*LILACINUS*, AGENTE CAUSAL DA HIALOHIFOMICOSE, COM  
O MODELO MURINO C57BL/6**

RIO DE JANEIRO

2012

**Interação *in vivo* do fungo *Paecilomyces lilacinus*, agente causal da hialohifomicose, com o modelo murino C57BL/6**

**DANIELLY CORRÊA MOREIRA DE SEQUEIRA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Cintia Moraes Borba  
Co-Orientador: Dr. Paulo Renato Zuquim Antas

Rio de Janeiro

2012

DANIELLY CORRÊA MOREIRA DE SEQUEIRA

**INTERAÇÃO *IN VIVO* DO FUNGO *PAECILOMYCES LILACINUS*, AGENTE CAUSAL DA  
HIALOHIFOMICOSE, COM O MODELO MURINO C57BL/6**

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Cíntia de Moraes Borba

Co-Orientador: Dr. Paulo Renato Zuquim Antas

Aprovada em: / /

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dra. Isabella Dib Ferreira Gremião (Presidente)**

Doutora em Ciências

Instituto Oswaldo Cruz

---

**Dra. Joseli de Oliveira Ferreira**

Doutora em Biologia Parasitária

Instituto Oswaldo Cruz

---

**Dra. Paula Mello De Luca**

Doutora em Biologia Parasitária

Instituto Oswaldo Cruz

## AGRADECIMENTOS

Quando eu tinha oito 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.” Diante dessas lembranças, não há outra maneira de iniciar meus agradecimentos que não seja dizendo: “Obrigada, meu Deus”. Obrigada por ter permitido que eu começasse a trilhar o caminho que foi o sonho da minha vida. Por ter me dado forças para passar noites em claro, ânimo nos momentos em que eu me senti desestimulada, paciência naqueles outros em que eu tive vontade de largar tudo... Por ter me dado iluminação nos momentos em que eu olhava tudo e não via nada, e pensava que jamais iria aprender. Não foram poucos esses momentos, em que, diante do desafio do novo, eu me desesperei. Eu consegui aprender, me superar, compreender. Sei que a estrada pela frente é longa, e eu dei apenas o primeiro passo. Mas foi por Ele que eu cheguei aqui. Obrigada, Senhor!

Agradeço ao meu marido Romulo e a minha filha Sarah, por terem estado ao meu lado em todos esses momentos. Também não foram poucos os dias em que fizemos um lanche correndo em vez de aproveitarmos os almoços em família. Muitos cinemas perdidos, passeios adiados, deveres de casa sem a supervisão materna... Mas também foi muito grande a torcida, o orgulho, a satisfação a cada etapa concluída (claro que também foram muitos os votos de que eu terminasse o mestrado em sã consciência!). Obrigada, meus amores. Vocês são a minha vida!

Agradeço à minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Cintia de Moraes Borba, por seus ensinamentos, por sua paciência e por todo o incentivo. Pelo carinho e cuidado com as palavras nos momentos em que eu precisei ser corrigida. Pela disponibilidade, pelo comprometimento e por toda a segurança que eu tive ao ser guiada por ela. Por todos os obstáculos que, mesmo sem essa obrigação, fez questão de transpor comigo, a ela eu credito o meu amadurecimento e

minha vontade de seguir adiante. Pelo que aprendi com ela, tenho muito mais apurado o meu senso de ética, responsabilidade e profissionalismo. Obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador, Dr. Paulo Renato Zuquim Antas, por ter tentado falar de Imunologia para quem enxergava essa ciência como algo do outro mundo. Não foi fácil, e sei que foi só o começo, mas consegui!

Às queridas mestras e colaboradoras Dr<sup>a</sup>. Joseli de Oliveira Ferreira e Dr<sup>a</sup>. Paula Mello De Luca, que me impediram de fugir a cada vez que os experimentos imunológicos davam errado. Por toda a paciência ao padronizar protocolos e fazer cálculos intermináveis, e principalmente por reconhecerem todo o meu esforço em fazer com que desse certo, mesmo que não fosse perfeito. Obrigada, Lila, pelo envolvimento e entusiasmo a cada novo resultado, e Paulinha, por ter despertado em mim o interesse pela citometria, que foi o meu maior desafio ao longo desse trabalho!

Ao Dr. Rodrigo Caldas de Menezes, por toda a ajuda com os exames histopatológicos, e por sua calma e placidez que por muitos momentos era só o que eu precisava! Obrigada!

À coordenação do programa de pós-graduação do IPEC, especialmente à Priscila e ao Dr. Armando Schubach por sua incansável dedicação.

À minha querida amiga e parceira de trabalho Marcelly, por tudo o que me ensinou, por todos os momentos em que estive ao meu lado, e principalmente, por ser uma pessoa incrível, dona de um coração maravilhoso e de uma simplicidade ímpares. Obrigada, “Tchutchuca”, por toda ajuda com os experimentos e por ter sido meu braço direito, esquerdo e cérebro!

Ao Germano e à Mariana, por terem me ajudado a passar, muitas vezes sorrindo, por toda essa correria!

À minha parceira Tatiana, do Laboratório de AIDS, e ao Alessandro, da Plataforma de Citometria de Fluxo pelos primeiros passos com a citometria, e pela paciência nas tardes sem fim e cheias de reclamações. Obrigada, muito mesmo!

Ao Rafael, do Laboratório de Hanseníase pela ajuda com a Imunofluorescência. Foram as mais belas imagens que eu vi ao longo de todo esse trabalho. Valeu, Rafa!

A todos os colegas do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, especialmente à Dr<sup>a</sup>. Gisela Lara da Costa, minha orientadora da Iniciação Científica e hoje, minha amiga, por ter sempre torcido e me incentivado desde o momento da inscrição para o mestrado. Gigi, você estará sempre nos meus agradecimentos e no meu coração!

Aos colegas dos Laboratórios de Imunologia Clínica e Imunoparasitologia, especialmente ao Josué, Juan, Virgínia e Rodrigo, por toda a ajuda e força que me deram! Vocês foram maravilhosos!

Aos colegas do Biotério do Pavilhão 26, pelo cuidado com os animais e por toda atenção e carinho que dispensaram a mim, especialmente o Luis, a Marilene e as veterinárias Jeniff e Giuliana. Valeu, gente!

À equipe do CECAL, especialmente ao Incerlande, pelo treinamento de coleta de sangue por meio de punção cardíaca.

À Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos os amigos que acreditaram 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...”**

**Galileu Galilei**

de Sequeira, D. C. M. **Interação *in vivo* do fungo *Paecilomyces lilacinus*, agente causal da hialohifomicose, com o modelo murino C57BL/6.** Rio de Janeiro, 2012. 110 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

*Paecilomyces lilacinus* é um fungo filamentoso, hialino, assexuado e agente causal da hialohifomicose. Esse fungo é considerado um patógeno emergente e oportunista capaz de infectar crianças, adultos imunossuprimidos, como também imunocompetentes. O presente trabalho objetivou estudar a resposta à infecção, *in vivo*, de camundongos C57BL/6, imunocompetentes e imunossuprimidos, frente a *P. lilacinus*. Dois isolados de origem humana do fungo foram avaliados quanto à virulência, tendo como critérios, sinais clínicos, sobrevivência, índice esplênico, lesões histológicas nos animais e reisolamento de células fúngicas viáveis do baço. Além disso, o perfil imunológico dos animais foi feito através da quantificação de células T CD4+ e CD8+ esplênicas, seus perfis de marcadores de ativação e memória em linfócitos T (CD25, CD69 e CD62L), e da avaliação de anticorpos no plasma contra epítomos de *P. lilacinus*. Os resultados demonstraram que ambos os isolados fúngicos apresentaram características morfológicas compatíveis com a espécie e foram capazes de infectar os animais do grupo dos imunocompetentes e provocar a doença, com manifestações clínicas, no modelo imunossuprimido. Um dos isolados, proveniente de lesão cutânea, foi considerado mais virulento, pelos critérios avaliados, que o isolado proveniente de lesão subcutânea na região da tíbia. A avaliação imunológica mostrou diferenças na cinética de expressão de moléculas de ativação pelos linfócitos CD4+ e CD8+ dos animais inoculados com os dois isolados, sendo mais recente para o isolado da região tibial, e tardia para o isolado de pele. Foi possível também verificar que esse padrão se mantinha nos animais imunossuprimidos, mas com um grau de ativação aparentemente mais elevado do que nas células obtidas dos animais imunocompetentes. Com relação a avaliação da produção de anticorpos específicos contra o fungo, nossos dados sugerem que a imunossupressão não exerceu influência na resposta humoral, visto que ambos os grupos de animais, imunocompetentes e imunossuprimidos, inoculados com o fungo foram capazes de produzir anticorpos IgG específicos anti-*P. lilacinus*.

**Palavras chaves:** *Paecilomyces lilacinus*, virulência, modelo experimental, imunossupressão, resposta imune celular e humoral.



de Sequeira, D. C. M. **Interaction, *in vivo*, of the fungus *Paecilomyces lilacinus*, etiological agent of hyalohyphomycosis, with C57BL/6 murine model.** Rio de Janeiro, 2012. 110 f. Master [Science dissertation in Clinic Research in Infectious Diseases] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

### ABSTRACT

*Paecilomyces lilacinus* is a filamentous, hyaline, asexual fungus and causal agent of hyalohyphomycosis. This fungus is considered an emergent and opportunistic pathogen, to be able to infect children and adults immunosuppressed, as well as immunocompetent ones. This study investigated the response to infection, *in vivo*, of the immunocompetent and immunosuppressed C57BL/6 mice inoculated with *P. lilacinus*. Two strains from human lesions were evaluated regarding virulence using the following criteria: clinical signs, survival, splenic index, histopathological lesions and the number of viable fungal cells recovered from spleen. Besides, the immunological profile of the mice was done by quantification of CD4+ and CD8+ on splenocytes and their profiles of activation markers on T lymphocytes (CD25 and CD69), as well as memory markers (CD62L), and evaluation of antibodies in plasma against *P. lilacinus* epitopes. The results demonstrated that both strains showed morphological features compatible with the species and were able to infect the immunocompetent group of animals and cause disease, with clinical manifestations, in the immunosuppressed model. One of the strains from skin lesions was considered to be more virulent than the strain from subcutaneous lesion of the tibia area.

The immunological evaluation showed differences in the activation molecules expression in CD4+ and CD8+ T cells obtained from animals infected with each fungal strain. Activation happened earlier in cells from the tibia strain infected animals, when compared to those obtained from animals infected with the skin isolated strain. We were also able to observe the same pattern of expression in cells obtained from immunosuppressed infected animals, although the degree of activation seem to be much higher than those observed in the immunocompetent mice. It was also possible to suggest that the immunosuppression did not interfere in the humoral immune response, since both groups of the animals, immunocompetent and immunosuppressed, inoculated with the fungus were able to produce specific IgG anti-*P. lilacinus* antibodies.

**Key words:** *Paecilomyces lilacinus*, virulence, experimental model, immunosuppression, cellular and humoral immune response.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
Tabela 1: Variação de peso dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com <i>P. lilacinus</i> (isolado PL.T)	<b>31</b>
Tabela 2: Variação de peso dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com <i>P.lilacinus</i> (isolado PL.P)	<b>31</b>
Tabela 3: Índice esplênico dos camundongos imunocompetentes inoculados com <i>Paecilomyces lilacinus</i> , isolados PL.T e PL.P, e seus controles inoculados com PBS	<b>41</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1: Fotomicrografia eletrônica do fungo <i>Paecilomyces lilacinus</i> . A) Conidióforo, conídios; fiálide e <i>stalk</i> ; B) Conídio fusiforme e fiálide com delicado pescoço em forma de garrafa e porção basal dilatada .	<b>2</b>
Figura 2. Divisão dos animais em experimentação por grupos (por isolado).	<b>22</b>
Figura 3: Macrocultura de <i>Paecilomyces lilacinus</i> após 12 dias de cultivo em meio batata dextrose ágar, a 25 <sup>0</sup> C. A- Colônia de coloração violácea; B- Reverso da colônia em coloração púrpura.	<b>29</b>
Figura 4. Microcultivo em lâmina de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , com 14 dias de crescimento, a 25 <sup>0</sup> C em meio extrato de malte ágar, corado com lactofenol de Amann com azul de algodão. A) Isolado PL.T. Conídios em cadeias; B) Isolado PL.P. Hifas vegetativas, septadas e conidióforo sustentando fiálides verticiladas em forma de garrafa com porção basal dilatada e delicado pescoço. Aumento original 1000 x.	<b>30</b>
Figura 5. Camundongo imunossuprimido inoculado (i.v.) com <i>Paecilomyces lilacinus</i> (isolado PL.T) apresentando lesão na base da cauda.	<b>33</b>
Figura 6. Camundongos imunossuprimidos inoculados (i.v.) com <i>Paecilomyces lilacinus</i> (isolado PL.P) apresentando múltiplas lesões dermatológicas no dorso e nódulo abdominal.	<b>33</b>

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 7. Percentual de sobrevivência dos camundongos após inoculação intravenosa com $10^5$ conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , isolados PL.T e PL.P, e com PBS durante o período de 45 após a inoculação. A) Camundongos imunocompetentes B) Camundongos imunossuprimidos.	<b>35</b>
Figura 8 – Necropsia de camundongo imunocompetente inoculado (i.v.) com <i>Paecilomyces lilacinus</i> , isolado PL.T. Órgãos com características morfológicas, cor e tamanho preservados.	<b>36</b>
Figura 9 – Redução do tamanho do baço de camundongo controle imunossuprimido com dexametasona, com relação ao baço de camundongo controle imunocompetente.	<b>37</b>
Figura 10. Corte histológico de tecido hepático de camundongos imunossuprimidos inoculados com <i>Paecilomyces lilacinus</i> , isolado PL.T aos 21 dias de inoculação. A - Foco inflamatório misto, multifocal, constituído por macrófagos, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos, centralizando estruturas fúngicas semelhantes a conídios no parênquima. PAS, aumento original 1000 x; B – Estrutura fúngica no parênquima hepático. Grocott, aumento original 1000 x.	<b>38</b>
Figura 11. Corte histológico de tecido pulmonar de camundongos imunocompetentes inoculados com <i>Paecilomyces lilacinus</i> , isolado PL.P aos 21 dias de inoculação. A – Estrutura fúngica semelhante a conídio no citoplasma de fagócito. PAS, aumento original 1000 x; B – Estrutura fúngica no parênquima pulmonar. Grocott, aumento original 1000 x.	<b>40</b>

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 12. Corte histológico de nódulo retirado da região abdominal de camundongo imunossuprimido inoculado com <i>Paecilomyces lilacinus</i> , isolado PL.P, aos 45 dias de inoculação. A) Presença de conídios e fragmentos de hifas em meio a material necrótico. PAS, aumento original 1000 x.	<b>41</b>
Figura 13. Número de células de <i>Paecilomyces lilacinus</i> recuperadas de baço de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. Cada linha representa a média de UFC recuperada de baço de seis camundongos eutanasiados com 7, 21 e 45 dias após a inoculação. A) Isolado PL.T; B) Isolado PL.P.	<b>44</b>
Figura 14: Quantificação de esplenócitos de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com <i>Paecilomyces lilacinus</i> e com PBS nos dias 7,21 e 45 após a inoculação. <b>A)</b> Isolado PL.T; <b>B)</b> Isolado PL.P	<b>46</b>
Figura 15. Gráficos representativos do perfil morfológico (tamanho FS x granulosidade SS) das células de baço dos camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS (grupo IV) com relação ao controle imunocompetente (grupo II). <b>A)</b> imunocompetente aos 7 dias pós-inóculo; <b>B)</b> imunossuprimido aos 7 dias pós-inóculo; <b>C)</b> imunocompetente aos 21 dias pós-inóculo. <b>D)</b> imunossuprimido aos 21 dias pós-inóculo; <b>E)</b> imunocompetente aos 45 dias pós-inóculo; <b>F)</b> imunossuprimido aos 45 dias pós-inóculo. Um total de 10.000 eventos foi adquirido dentro do <i>gate</i> de linfócitos.	<b>48</b>

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 16. Percentual de células CD4+ e CD8+ no baço de camundongos imunocompetentes (CPT) e Imunossuprimidos (SPM) inoculados com <i>Paecilomyces lilacinus</i> , isolado PL.T (A), e PL.P (B) e seus respectivos controles PBS, nos dias 7, 21 e 45 após a inoculação	<b>52</b>
Figura 17. Percentual de marcadores de ativação em células CD4+ esplênicas, de camundongos imunocompetentes (CPT) e imunossuprimidos (SPM) inoculados com <i>Paecilomyces lilacinus</i> , isolados PL.T (A, C e E) e PL.P (B, D e F) seus respectivos controles inoculados com PBS, nos dias 7, 21 e 45 após a inoculação.	<b>58</b>
Figura 18. Percentual de marcadores de ativação em células CD8+ esplênicas, de camundongos imunocompetentes (CPT) e imunossuprimidos (SPM) inoculados com <i>Paecilomyces lilacinus</i> , isolados PL.T (A, C e E) e PL.P (B, D e F) seus respectivos controles inoculados com PBS, nos dias 7, 21 e 45 após a inoculação.	<b>64</b>
Figura 19. Reatividade do soro de camundongos ao fungo <i>P. lilacinus</i> : <b>A)</b> Soro de camundongo imunossuprimido inoculado com o isolado PL.P, na diluição de 1:20; <b>B)</b> Soro de camundongo imunossuprimido inoculado com PBS (controle), na diluição de 1:20; <b>C)</b> Soro de camundongo imunossuprimido inoculado com o isolado PL.T, na diluição de 1:40; <b>D)</b> Soro de camundongo imunossuprimido controle, na diluição de 1:40; <b>E)</b> Soro de camundongo imunocompetente inoculado com o isolado PL.T, na diluição de 1:80; <b>F)</b> Soro de camundongo imunocompetente controle, na diluição de 1:80; <b>G)</b> Soro de camundongo imunocompetente inoculado com o isolado PL.P, na diluição de 1:160; <b>H)</b> Soro de camundongo imunocompetente controle, na diluição de 1:160.	<b>66</b>

**Figura****Página**

Figura 20. Gráficos representativos de citometria de fluxo. **(A)** Tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) dos conídios. Um total de 20.000 eventos foi adquirido dentro do *gate* de conídios. **(B)** Percentuais de marcação de IgG no soro dos camundongos imunocompetentes inoculados com PBS (0,07%), **(C)** Percentuais de marcação de IgG no soro dos camundongos imunocompetentes inoculados *P. lilacinus* (76,78%), na diluição 1:500. **(D)** Percentuais de marcação de IgG no soro dos camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS (0,10%), **(E)** Percentuais de marcação de IgG no soro dos camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinus* (72,68%), na diluição 1:500.

## SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS

AIDS*	Síndrome de imunodeficiência adquirida
APC*	Alofocianina
APC-Cy7*	Alofocianina cianina7
BDA	Batata dextrose agar
BG*	<i>Background</i>
BSA*	Albumina do soro bovino
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
CLSI*	Instituto de padrões clínicos e laboratoriais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPT PBS	Camundongos imunocompetentes inoculados com PBS (controle)
CPT PL	Camundongos imunocompetentes inoculados com <i>Paecilomyces lilacinus</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC*	Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF*	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GM-CSF*	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
HE	Hematoxilina-Eosina
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
IFN- $\gamma$ *	Interferon (gama)
IL*	Interleucina
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
M-CSF*	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MIC*	Concentração inibitória mínima
PAMP*	Padrões moleculares associados à patógenos
PAS*	Ácido periódico de Schiff
PBS*	Solução salina tamponada com fosfato



PE*	Ficoeritrina
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
SPM PBS	Camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS (controle)
SPM PL	Camundongos imunossuprimidos inoculados com <i>Paecilomyces lilacinus</i>
Th1*	Linfócito T Helper 1
Th2*	Linfócito T Helper 2
TNF- $\alpha$ *	Fator de Necrose tumoral (alfa)
UFC	Unidade formadora de colônia
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

---

\* Abreviaturas em inglês

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

**SUMÁRIO**

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Justificativa</b>	<b>17</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>18</b>
3.1. Objetivo geral	<b>18</b>
3.2. Objetivos específicos	<b>18</b>
<b>4. Materiais e métodos</b>	<b>19</b>
4.1. Isolados	<b>19</b>
4.2. Análise morfológica	<b>19</b>
4.3. Condições de cultivo e preparo da suspensão de conídios	<b>20</b>
4.4. Imunossupressão	<b>20</b>
4.5. Animais	<b>20</b>
4.6 Inoculação dos animais	<b>22</b>
4.7. Sinais clínicos e sobrevivência	<b>23</b>
4.8. Obtenção do sangue, necropsia e histopatologia	<b>23</b>
4.9. Determinação do índice esplênico	<b>24</b>
4.10. Reisolamento do fungo	<b>25</b>
4.11. Resposta imune celular	<b>25</b>
4.11.1 Citometria de Fluxo	<b>25</b>
4.12 Resposta imune humoral	<b>26</b>
4.12.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	<b>26</b>
4.12.2 Pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo	<b>27</b>
4.13 Análise estatística	<b>28</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>29</b>
5.1. Características morfológicas	<b>29</b>
5.2. Sinais clínicos da doença nos camundongos inoculados	<b>30</b>
5.3. Sobrevivência dos camundongos	<b>34</b>
5.4. Necropsia	<b>36</b>

5.5. Exame histopatológico	37
5.6. Índice esplênico	42
5.7. Reisolamento de células fúngicas	43
5.8. Resposta imune celular	45
5.8.1. Celularidade do baço: quantificação de esplenócitos e de células TCD4+ e TCD8+	45
5.8.2 Imunofenotipagem	53
5.8.2.1: Perfil da expressão de moléculas em linfócitos CD4+ e CD8+ dos camundongos imunocompetentes inoculados com os isolados PL.T e PL.P e seus respectivos controles inoculados com PBS	53
5.8.2.2 Perfil da resposta imune celular dos camundongos imunocompetentes inoculados com os isolados PL.T e PL.P e seus respectivos controles, inoculados com PBS.	59
5.9. Resposta imune humoral	65
<b>6. Discussão</b>	<b>69</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>90</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO</b>	<b>110</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson 1974 é um fungo filamentoso, hialino, assexuado. Por ser a sua forma sexuada sugerida estar dentro do gênero *Byssochlamys*, esse fungo pertenceria ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales (Inglis & Tigano, 2006). Recentes estudos moleculares com o objetivo de elucidar a posição filogenética deste fungo sugeriram uma nova classificação taxonômica para *P. lilacinus*, demonstrando que o fungo não está relacionado ao gênero *Paecilomyces* “*stricto sensu*”, representado por *Paecilomyces variotii*, uma espécie extremamente termófila, formadora de clamidosporos e muitas vezes, também patogênica. Assim, os autores propuseram o nome *Purpureocillium lilacinum*, ao verificarem a forte relação desta espécie com outras produtoras de conídios violáceos (Luangsa-ard *et al.*, 2011). Nessa dissertação, devido a não familiaridade, ainda, da comunidade científica com a nova terminologia, utilizaremos o nome anterior do fungo, ou seja, *Paecilomyces lilacinus*.

Em temperatura ambiente, as colônias desse fungo, segundo Luangsa-ard *et al.*, (2011), atingem o diâmetro de 25 a 33 mm em 7 dias. Apresentam-se aveludadas a flocosas, com micélio aéreo inicialmente branco, que se desenvolve gradualmente em tons lilás, assumindo coloração rosada a violácea após a esporulação. O reverso pode ser incolor, porém, na maioria das vezes é púrpura. Exsudato limitado ou ausente.

Ao microscópio são vistas hifas vegetativas hialinas, com delicada parede celular, variando entre 2,5 a 4,0  $\mu\text{m}$  de largura. O conidióforo pode

medir entre 4 a 6  $\mu\text{m}$  de comprimento, ocasionalmente formando sinêmios frouxos. Também são visualizadas pequenas hastes (*stalks*) de parede espessa e rugosa de 3 a 4  $\mu\text{m}$  de extensão, consistindo de ramificações verticiladas com 2 a 4 fiálides terminais (Figuras 1A, 1B), constituídas por uma porção basal dilatada e delicado pescoço em forma de garrafa, cujos diâmetros variam de 6 - 9 x 2,5 - 3,0  $\mu\text{m}$  de comprimento (Luangsa-ard *et al.*, 2011).

Os conídios de *P. lilacinus* são formados em sucessão basipetal, ou seja, conídios mais jovens são produzidos na base a partir da extremidade aberta de uma fiálide. Esses conídios podem ser arredondados ou elípticos a fusiformes (Figura 1B), de paredes delicadas a levemente rugosas, hialinas ou quando em massa na cor púrpura, e medem cerca de 2,5 – 3,0 x 2 – 4  $\mu\text{m}$ . Podem estar soltos ou agrupados em longas cadeias divergentes ou enovelados. Clamidosporos ausentes (Luangsa-ard *et al.*, 2011).

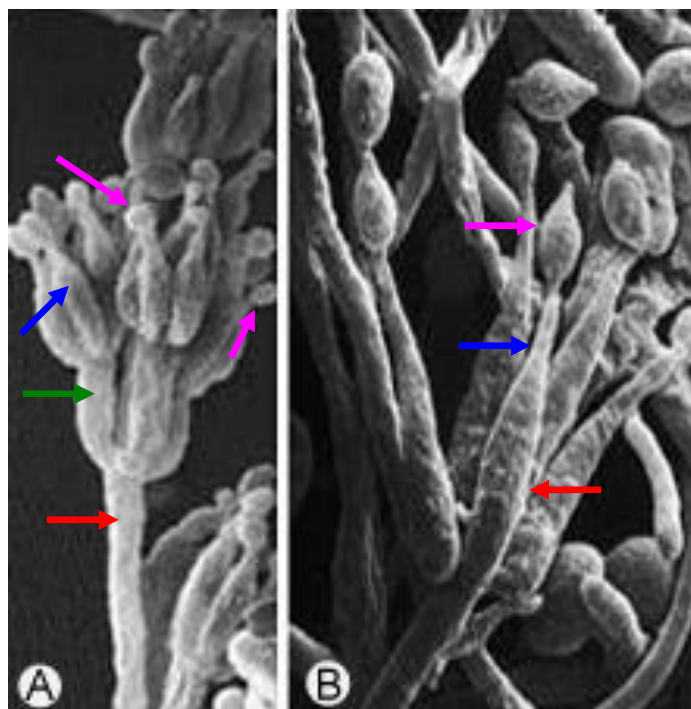


Figura 1: Fotomicrografia eletrônica do fungo *Paecilomyces lilacinus*. **A)** Conidióforo (  $\rightarrow$  ), conídios (  $\rightarrow$  ); fiálide (  $\rightarrow$  ) e *stalk* (  $\rightarrow$  ); **B)** Conídio



fusiforme ( ) e fiálide com delicado pescoço ( ) em forma de garrafa e porção basal dilatada ( ). Fonte: Adaptado da foto de Hoog (2000).

*P. lilacinus* é um fungo cosmopolita e ubiqüitário, que vive em saprofitismo no solo, no ar e em vegetais em decomposição, como grãos e alimentos. Muitos estudos apontam a utilização do fungo como agente de biocontrole, uma vez que é descrito como parasita de insetos (Marti *et al.*, 2006) e nematódeos (Gunasekera *et al.*, 2000). Entretanto, também é descrito como agente causal de infecções em animais como tatus (Gordon 1984), tartarugas (Li *et al.*, 2008), crocodilos (Maslen *et al.*, 1988) e mais raramente em cães (Littman & Goldschmidt, 1987) e gatos (Pawloski *et al.*, 2010).

Em 1982, Ajello introduziu o termo hialohifomicose para designar infecções causadas por fungos hialinos, a saber, aqueles que se apresentam no tecido do hospedeiro sob a forma de hifas não pigmentadas, septadas, podendo ser ramificadas ou não. A doença é provocada por *Paecilomyces* spp. e diversos outros fungos, como por exemplo, *Acremonium* spp., *Beauveria* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp. e *Penicillium* spp. A produção de um micélio hialino no hospedeiro é a principal característica da doença, entretanto, algumas espécies como *Acremonium* spp., *Fusarium* spp. e *Scedosporium* spp., *Trichoderma* spp., inclusive *P. lilacinus*, 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 (Perfect & Shell, 1996; Das *et al.*, 2010).

*P. lilacinus* é considerado um patógeno emergente e oportunista, e a despeito de sua moderada virulência, é capaz de infectar crianças (Tan *et al.*,

1992) e adultos imunossuprimidos, sendo necessário destacar o crescente número de relatos da doença em imunocompetentes (Perfect & Schell, 1996; Westenfeld *et al.*, 1996; Gutierrez-Rondero *et al.*, 1999; Carey *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2004; Pastor & Guarro, 2006; Jaromi & Khaksar, 2007).

O fungo é considerado potencialmente resistente a algumas técnicas de esterilização, e uma vez que contamina loções e cremes utilizados na clínica, a pele constitui uma das principais vias de penetração do fungo (Orth *et al.*, 1996, Pastor & Guarro, 2006, Itin *et al.*, 1998), juntamente com o trato respiratório e implantes de dispositivos cirúrgicos, como cateteres (Tan *et al.*, 1992) e lentes (Gordon & Norton, 1985).

As manifestações clínicas da hialohifomicose variam de lesões nodulares cutâneas e subcutâneas em imunocompetentes, a infecções disseminadas nos imunossuprimidos. De acordo com Pastor & Guarro (2006), as formas cutâneas e subcutâneas constituem 1/3 dos casos relatados de hialohifomicose por *P. lilacinus*, e podem ser caracterizadas por erupções papulares, eritematosas, vesiculares ou necróticas (Gutierrez-Rondero *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2004; Itin *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2011; Ezzedine *et al.*, 2011; Antas *et al.*, 2012).

Infecções oculares, como ceratites e endoftalmites são as formas mais recorrentes da doença (Westenfeld *et al.*, 1996; Pastor & Guarro, 2006), tendo como fatores predisponentes o implante de lentes intra-oculares, cirurgias oftalmológicas e traumas não cirúrgicos (Pintor *et al.*, 2001). Em menor escala, são relatados também casos de doenças oftalmológicas provocadas pelo uso de lentes de contato (Starr, 1987 *apud* Pastor & Guarro, 2006).

Em revisão publicada Pastor & Guarro (2006) sumarizaram os casos de infecções oculares, cutâneas e subcutâneas e em outros sítios que não a pele e globo ocular. Esses autores descreveram a ocorrência de 122 casos de hialohifomicose por *P. lilacinus*, de 1964 e 2004, com três surtos de infecções oculares: em 1977 e 1980 nos Estados Unidos e em 2004 no Brasil. Adicionalmente, relataram um surto na Suíça, em 1996, cuja manifestação clínica da doença foi cutânea. Os fatores predisponentes para as formas cutâneas e em outros sítios foram transplantes, especialmente renais, leucemia, uso prolongado de corticosteróides, prolongada neutropenia e diabetes (Shoham *et al.*, 2005). Em oito desses casos o desfecho foi o óbito do paciente, sendo um deles, no Brasil (Castro *et al.*, 1990). De 2007 até o momento foram relatados mais dezoito casos da doença, comprovadamente provocada por *P. lilacinus*, sendo cinco deles em pacientes imunocompetentes. Bursites, endocardites e rinites foram algumas das formas mais raras, entretanto, as formas cutâneas e oculares foram as mais prevalentes (Garbino *et al.*, 2002; Jaromi & Khaksar, 2007; Chung *et al.*, 2007; Wessollosky *et al.*, 2008; Van Schooneveld *et al.*, 2008; Ford *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008, Muller *et al.*, 2008; Motswaledi *et al.*, 2009; Ounissi *et al.*, 2009; Ezzedine *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Innocenti *et al.*, 2011; Antas *et al.*, 2012).

Os escassos relatos da infecção causada por *P. lilacinus* no Brasil não se devem ao fato de sua ausência na microbiota do país, mas provavelmente a três outros fatores: o desconhecimento da comunidade médico-científica com relação ao fungo, a dificuldade de seu isolamento e a sua classificação como contaminante e não como o agente causal (Castro *et al.*, 1990; Hofling-Lima *et al.*, 2005). Segundo Hofling-Lima *et al.* (2005), a análise da frequência e a



etiologia das doenças oculares micóticas diagnosticadas por cultura e os fatores associados às ceratites fúngicas feita por pesquisadores do Laboratório de Doenças Externas Oculares da UNIFESP, Brasil, demonstrou o predomínio de infecções por fungos filamentosos, sobre as leveduras, entre eles, *P. lilacinus*.

A susceptibilidade *in vitro* de *P. lilacinus* a antifúngicos foi testada através de ensaios de micro e macrodiluição em caldo e Etest, preconizados pelo CLSI, e os resultados obtidos demonstraram a resistência desse fungo à maioria dos antifúngicos utilizados. A anfotericina B não exerceu qualquer atividade contra o fungo, e, contrastando com a maioria dos fungos filamentosos, a atividade da flucitosina e do fluconazol, bem como da maioria dos derivados azólicos contra *P. lilacinus* foi praticamente nula. Entretanto, novos triazólicos como posaconazol, albaconazol e ravuconazol apresentaram valores de concentração inibitória mínima (MIC) bastante baixos, indicando boa atividade contra o fungo (Pastor & Guarro, 2006).

Em virtude da evidente resistência do fungo aos tratamentos convencionais, a atividade antifúngica de várias combinações de fármacos também foi testada. Quando empregada sem adição de nenhum outro fármaco, a atividade da anfotericina B apresentou MICs de >16mg/l, e uma vez combinada ao voriconazol, por exemplo, essa MIC foi reduzida para 0,12mg/l. As combinações entre os derivados azólicos e terbinafina também demonstraram sinergismo contra diversos isolados (Pastor & Guarro, 2006). Devido à alta resistência de *P. lilacinus* as terapias antifúngicas clássicas, voriconazol e posaconazol representam fármacos alternativos eficientes (Antas *et al.*, 2012).

Ainda não foi estabelecido um tratamento padrão para a hialohifomicose causada por *P. lilacinus*. Nas formas oculares, este vai desde a aplicação de terapias tópicas, subconjuntivas ou intra-oculares, combinadas a administração de antifúngicos sistêmicos até a enucleação do globo ocular. Garbino *et al.* (2002), relataram o caso de uma paciente que, após diversos episódios de endoftalmite, teve sucesso no tratamento com voriconazol, corroborando com o trabalho descrito por Yuan *et al.* (2009), a partir de estudos *in vivo*, utilizando o modelo murino, e *ex vivo*, a partir da doação de córneas humanas, que apontou o voriconazol como o tratamento de escolha em casos de ceratites causadas por *P. lilacinus*.

Nas infecções cutâneas e subcutâneas o sucesso no tratamento, na maioria dos casos, foi obtido com a administração sequencial de vários agentes antifúngicos, como itraconazol, miconazol, fluconazol, cetaconazol, voriconazol, caspofungina e terbinafina. A administração de anfotericina B só obteve resultados favoráveis quando associada a outro fármaco. O tratamento com itraconazol obteve sucesso em alguns casos, especialmente quando utilizado por pacientes imunocompetentes (Orth *et al.*, 1996; Carey *et al.*, 2003; Pastor & Guarro, 2006). Apesar de ter sido empregado em poucos casos, o voriconazol resultou em altos níveis de eficácia (Martin *et al.*, 2002; Hilmarsdottir *et al.*, 2000 *apud* Pastor & Guarro, 2006), sendo importante destacar o sucesso do tratamento em pacientes imunossuprimidos (Martin *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2011). Em recente trabalho publicado, Rodríguez *et al.* (2010), também relataram a eficácia do voriconazol frente à forma invasiva de hialohifomicose provocada por *P. lilacinus* em modelo murino, após severa imunossupressão.

Em muitos casos a combinação de agentes antifúngicos e também a associação desses agentes com procedimentos cirúrgicos foram necessários para a remissão da doença (Pastor & Guarro, 2006; Chung *et al.*, 2007; Ford *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2009). Em resumo, o tratamento com agentes antifúngicos orais sem cirurgia tem sido eficiente somente para pacientes imunocompetentes (Gottlieb & Atkins, 2001).

*P. lilacinus* é considerado para alguns autores um fungo com virulência relativamente baixa, pois os mesmos descreveram que é necessário um alto inóculo e imunossupressão para provocar uma infecção em hospedeiro experimental (Pujol *et al.*, 2002; Pastor & Guarro, 2006). O uso do modelo animal é bastante útil para elucidar os mecanismos de invasão e replicação de um microrganismo no hospedeiro humano, e as respostas desse hospedeiro ao patógeno. Fungos podem se comportar de formas totalmente diversas *in vivo* e *in vitro*, alterando, por muitas vezes, suas características morfofisiológicas e até a resposta aos antifúngicos, portanto, a utilização de um modelo experimental em pesquisas fúngicas é essencial. Podemos citar, ainda, a importância do uso de animais na identificação de fungos e restauração da virulência após longos períodos de estocagem (Kamei & Miyaji, 2001).

Hubalek & Hornick (1977) realizaram pesquisas com modelo murino imunocompetente e imunossuprimido, aliados a altos inóculos com isolados de *P. lilacinus*, e não obtiveram resultados favoráveis na recuperação de células viáveis, apesar de lesões estarem presentes em diversos órgãos. Mais recentemente, Rodriguez *et al.* (2009), induziram uma infecção aguda em animais severamente imunossuprimidos, utilizando altos inóculos desse fungo, que culminou em 100% de mortalidade após 10 dias de infecção. Pastor &

Guarro (2006) concluíram que os modelos experimentais requeriam grandes inóculos para o estabelecimento da infecção, por *P. lilacinus*, entretanto, Brito *et al.* (2011) obtiveram sucesso em estabelecer a infecção com um inóculo relativamente baixo ( $4,4 \times 10^4$  conídios), corroborando com Yuan *et al.* (2009) que conseguiram estabelecer a infecção com inóculos de  $10^6$  conídios e  $10^3$  hifas. Esses dados apontam para a necessidade de mais estudos *in vivo*, na tentativa de padronizar o tamanho do inóculo eficaz no estabelecimento da infecção e a virulência das espécies (Antas *et al.*, 2012).

Além do camundongo, diversos animais como ratos, coelhos e porcos da Índia têm sido usados em modelos com espécies de *Paecilomyces*. Em modelo de infecção de córnea de coelhos tratados ou não com acetato de hidrocortisona, Agrawal *et al.* (1979) observaram um maior impacto nos animais imunossuprimidos pelo fármaco. Sponsel *et al.* (2006) verificaram a eficácia do tratamento tópico com voriconazol em coelhos com ceratite provocada por *P. lilacinus*. Diante desses dados, Pujol *et al.* (2002) enfatizaram a importância da utilização dos modelos animais nos estudos de patogênese, interações entre o fungo e o hospedeiro e a terapia de infecções provocadas por esse fungo.

Pouco se conhece acerca dos fatores de virulência de *P. lilacinus*. Sabe-se que esse fungo é capaz de secretar proteases e quitinases que estão envolvidas no processo infeccioso e patogênese sobre os vários estágios do ciclo de vida de nematódeos parasitas de plantas (Bonants *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 2003). Quanto à produção de micotoxinas, *P. lilacinus* também é capaz de produzi-las, denominadas paecilotoxinas ou leucinostatinas, potencialmente

tóxicas para animais experimentais, e indutoras de uma exacerbada resposta inflamatória (Mikami *et al.*, 1989; Westenfeld *et al.*, 1996).

Em recente trabalho publicado, os autores utilizaram isolados de *P. lilacinus* provenientes do solo de Chernobyl para demonstrar sua capacidade em produzir melanina (Egorova *et al.*, 2011). Sabe-se que esse pigmento é essencial para a sobrevivência do fungo em condições de radiação, exposição a altas temperaturas e extrema dessecação, uma vez que armazena água e íons, e por isso, é considerado um clássico fator de virulência (Langfelder *et al.*, 2003).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a corticoterapia afeta a imunomodulação através de citocinas produzidas por linfócitos e altera o trânsito, número e funções de leucócitos (Stock *et al.*, 2005). Os corticóides, incluindo a dexametasona, também prejudicam consideravelmente as respostas linfoproliferativas devido à redução na síntese de IL-2, citocina essencial para a expansão clonal dos linfócitos ativados. Uma menor disponibilidade de IL-2 constitui uma supressão de IL-1 pelos monócitos, e conseqüentemente, a produção de mediadores pró-inflamatórios também é prejudicada. Monocitopenia também é provocada pelos corticóides, bem como neutrofilia, tanto pela liberação de neutrófilos maduros das reservas medulares quanto pela redução da migração dessas células para exsudatos inflamatórios (Antachopoulos & Roilides, 2005).

De acordo com Brito *et al.* (2011), a confirmação do estado imunossupressivo é dada pelo curso da infecção oportunista, uma vez que os camundongos imunocompetentes infectados com *P. lilacinus* foram capazes de

controlar a infecção e não desenvolver a doença, ao contrário dos imunossuprimidos, que apresentaram lesões graves.

Devemos considerar que o sistema imunológico tão amplamente definido como um sistema de defesa é, antes de tudo, um sistema de equilíbrio, e, portanto, nem sempre a capacidade invasiva de um microrganismo se reverte em dano ao indivíduo. Como o número de indivíduos expostos aos microrganismos é muito maior do que os que desenvolvem a doença, podemos acreditar que em algum momento dessa interação, ocorre um equilíbrio entre parasita e hospedeiro (Casadevall & Pirofski, 2000).

Entretanto, desordens tanto na imunidade inata, como por exemplo, o comprometimento da capacidade fagocítica de macrófagos ( $M\phi$ ), quanto na adaptativa, como a redução de populações linfocitárias, parecem ter papel fundamental no estabelecimento e progressão de doenças (Romani, 2011).

Com o incremento do número de indivíduos imunossuprimidos, fungos têm emergido como a maior causa de doenças humanas. Esses microrganismos possuem mecanismos de escape da resposta imune inata, que é a primeira linha de defesa do organismo contra a infecção. Conídios de *Aspergillus* spp., por exemplo, podem se internalizar em células epiteliais e permanecer viáveis por muito mais tempo, comparado aos conídios no interior de fagócitos “profissionais” como os  $M\phi$ . Esses conídios também são capazes de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, gerando uma resposta imune exacerbada que vai culminar em dano ao hospedeiro (Shoham *et al.*, 2005).

Uma resposta imune eficaz requer uma ação coordenada das imunidades inata e adaptativa. Depois de derrubadas as barreiras da pele e

mucosas pelo patógeno, uma variedade de células, como M $\phi$ , neutrófilos e células dendríticas (DC), desempenham papéis fundamentais, como fagocitose e apresentação de antígenos (Antachopoulos & Roilides, 2005). Cenci *et al.* (1997) utilizando um modelo murino de aspergilose invasiva, demonstraram a especificidade de fagócitos ao desempenhar as funções de eliminação do fungo. Enquanto os M $\phi$  alveolares fagocitavam e matavam os conídios, leucócitos e monócitos polimorfonucleares eram letais às hifas do fungo. Cabe ressaltar que, para uma fagocitose eficiente, se faz necessária a participação de um número suficiente de fagócitos no sítio da infecção, e a produção e ativação de fagócitos maduros é estimulada por um grupo de glicoproteínas, destacando-se entre elas, G-CSF, M-CSF e GM-CSF, que são as mais importantes defesas contra fungos (Antachopoulos & Roilides, 2005).

O reconhecimento do patógeno pelo sistema imune se dá através dos receptores de padrões de reconhecimento de patógenos (PRR) do hospedeiro, que “percebem” os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), presentes no fungo (Romani, 2011). Esse reconhecimento leva à ativação da atividade fagocítica e à indução da resposta adaptativa (T *helper*) pelas células dendríticas (Antachopoulos & Roilides, 2005).

As duas maiores classes de linfócitos são as células T, selecionadas no timo, onde passam a expressar as moléculas CD4 ou CD8, e as células B, que amadurecem na medula óssea. As células T são componentes cruciais da resposta imune adaptativa. Entretanto, essas células só são capazes de reconhecer o antígeno e combatê-lo se o mesmo estiver agregado a proteínas especializadas, denominadas complexo principal de histocompatibilidade – MHC. As moléculas de MHC Classe I são responsáveis por apresentar os

peptídeos às células citolíticas CD8+, enquanto o MHC Classe II está associado à apresentação dos peptídeos aos linfócitos auxiliares CD4+ (Abbas & Lichtman, 2008).

Os linfócitos T CD4+ podem ser subdivididos em tipo I (Th1) e tipo II (Th2), e são caracterizados por padrões de produção de citocinas que desempenham diferentes papéis na resposta imune. Citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 e IL-18 são produzidas a partir da ativação de células Th1 em resposta à interação entre DC e o fungo, e como consequência disso, temos ativação de M $\phi$ , geração de células T citotóxicas e hipersensibilidade tardia. Em contrapartida, citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13 desencadeiam reações alérgicas e modulam negativamente a resposta inflamatória (Antachopoulos & Roilides, 2005). Assim, concluímos que os linfócitos T CD4+ têm sido implicados no controle inicial das infecções, através de mecanismos mediados por uma resposta pró-inflamatória, promovida pela secreção de citocinas que orquestram uma resposta imune efetiva (Espinosa & Rivera, 2011).

Embora uma enorme ênfase seja dada ao papel das células T CD4+ na imunidade celular, há evidências de que os linfócitos T CD8+ também mediam uma resposta imune protetora contra os fungos. Apesar de seus mecanismos de ação não terem sido completamente elucidados, dados sugerem a ação dessas células diretamente nos sítios da inflamação, através de mecanismos citotóxicos dependentes da liberação de perforinas e granzimas. Em infecções por *Aspergillus fumigatus*, por exemplo, é sugerido que sua ação citotóxica confira imunidade nos casos de aspergilose invasiva (Vecchiarelli *et al.*, 2007).



Os processos de ativação e diferenciação celular se caracterizam pela expressão de moléculas (“marcadores”) de superfície nos linfócitos CD4 e CD8. Molécula CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2) é expressa por progenitores linfóides e linfócitos T e B maduros. Liga-se a IL-2 com baixa afinidade e é indicador de ativação intermediária. A ativação dos linfócitos rapidamente aumenta a expressão de CD69, sendo este marcador um indicador de ativação inicial (Caruso *et al.*, 1997).

A memória celular é outro mecanismo da resposta imune, definida pela resposta à re-exposição ao mesmo antígeno e geralmente, é mais intensa e rápida. A diferenciação em células de memória é um processo bastante complexo, caracterizado pela expressão diferencial de moléculas de superfície celular. O CD62L é uma L-selectina que atua como “*homing receptor*” para entrada de leucócitos nos tecidos linfóides secundários através das veias endoteliais. Os ligantes presentes nas células endoteliais reconhecem os leucócitos que expressam L-selectina, promovendo uma diminuição na velocidade do tráfego dessas células pela corrente sanguínea, facilitando a diapedese e a entrada dos linfócitos nos órgãos linfóides secundários. Linfócitos T imaturos, que ainda não encontraram o antígeno específico, expressam CD62L, pois precisam entrar nos linfonodos para encontrá-los. Após o contato com o antígeno específico, os linfócitos T efetores, e os ditos T<sub>EM</sub> (memória efetora) não expressam CD62L, pois circulam na periferia. Por outro lado, os linfócitos T<sub>CM</sub> (memória central), expressam CD62L para residirem nos órgãos linfóides secundários, onde permanecem prontos para proliferar ao reencontrar o antígeno (Lanzavecchia & Salusto, 2005).

O sistema imune não se mantém inerte à presença de fungos comensais ou parasitas, e, portanto, é necessário um equilíbrio no fino balanço entre as respostas imunes Th1-Th2. A resposta imune Th1 é necessária para o “*clearance*” da infecção fúngica, enquanto a Th2 geralmente resulta em susceptibilidade (Romani, 2011). A interação entre as DCs com o patógeno é de suma importância para determinar o direcionamento da resposta imune, uma vez que hifas e conídios são reconhecidos por diferentes PRRs. Por exemplo, conídios de *Aspergillus* estimulam os receptores TLR2 e TLR4 a induzir uma resposta imune do tipo Th1, enquanto as hifas levam à perda de TLR4, permanecendo intacta a sinalização dos TLR2, estimulando a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Netea *et al.*, 2003 *apud* Antachopoulos & Roilides, 2005).

Os linfócitos B são importantes componentes da resposta imune adaptativa, produzindo e secretando milhões de moléculas que reconhecem diferentes antígenos. Cooperam com Mφ, DC e linfócitos T, sendo excelentes apresentadores de antígeno. Além disso, evidências indicam o efeito regulatório dos linfócitos B na apresentação de antígenos pelas DC, através da produção de citocinas e quimiocinas criticamente envolvidas nos processos de maturação e migração dessas células. No entanto, esse é apenas um dos caminhos percorridos pelas células B na imunomodulação da resposta imune celular (Abbas & Lichtman, 2008).

Como um dos principais componentes da imunidade humoral, os linfócitos B são produtores dos anticorpos que vão exercer suas funções efetoras em locais distantes de onde foram criados. A primoinfecção ou a vacinação leva à ativação de linfócitos B *naïve* e sua consequente

diferenciação em células produtoras de anticorpos e de memória (Abbas & Lichtman, 2008). Partindo desse pressuposto, apesar do conceito de que a imunidade celular é o principal mecanismo de defesa contra patógenos intracelulares, se aceita, atualmente, a idéia de que certos tipos de anticorpos podem ser protetores (Blanco & Garcia, 2008; Romani, 2011).

Por muito tempo, considerou-se que a resposta imune celular era a mais importante defesa do hospedeiro contra a maioria, senão todos os fungos (Casadevall *et al.*, 2002). Apesar do papel da resposta imune humoral contra fungos não estar bem estabelecido, diversos autores propõem que os anticorpos possam desempenhar funções auxiliares na ativação do sistema imune, opsonizando e auxiliando a fagocitose, através da limitação do crescimento das hifas no interior dos fagócitos, agindo como neutralizadores de proteases ou toxinas produzidas pelo fungo e ativando o sistema complemento (Casadevall *et al.*, 2002, Blanco & Garcia, 2008; Alves *et al.*, 2009).

## 2. JUSTIFICATIVA

Nosso interesse em conhecer a interação fungo-hospedeiro utilizando o modelo murino C57BL/6 é justificado pela escassez de estudos sobre a virulência e o papel da resposta imune do hospedeiro frente a isolados de *Paecilomyces lilacinus*, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. No Brasil, nosso grupo é pioneiro em pesquisas com esse fungo, e trabalhos anteriores, utilizando o modelo murino BALB/c imunocompetente e imunossuprimido, forneceram importantes dados acerca da virulência de dois isolados desse fungo. No entanto, a literatura registra que linhagens *inbred* como o BALB/c apresentam-se frequentemente mais susceptíveis que a linhagem *inbred* C57BL/6, como por exemplo, nos pólos de resistência x susceptibilidade à infecção com *Leishmania major* (Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Complementando esse estudo, foram realizados testes *in vitro* da interação de macrófagos de camundongos C57BL/6 com conídios de *P. lilacinus* provenientes de três diferentes casos clínicos de hialohifomicose (Peixoto *et al.*, 2010), que forneceram dados importantes sobre a dinâmica da

célula fúngica no interior dos fagócitos. Assim, nossos estudos *in vivo*, utilizando esse mesmo modelo murino, poderão ampliar o conhecimento da relação parasita-hospedeiro e seus mecanismos de resistência e susceptibilidade.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a resposta à infecção, *in vivo*, de camundongos C57BL/6, competentes e deprimidos imunologicamente, frente a isolados de *Paecilomyces lilacinus*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estudar as características morfológicas, *in vitro*, dos isolados de *P. lilacinus*;
- 2- Estudar os sinais clínicos e a evolução da infecção fúngica em camundongos competentes e deprimidos imunologicamente por meio de análise macro e microscópica de lesões em diferentes órgãos, índice esplênico, perda de peso dos animais, quantificação de esplenócitos e recuperação de células fúngicas do baço;

3- Analisar o perfil imunológico dos animais infectados através: (a) da quantificação de células T CD4+ e CD8+ esplênicas, seus perfis de marcadores de ativação em linfócitos T (CD25 e CD69), bem como de marcadores de migração celular (CD62L), e (b) da avaliação de anticorpos no plasma sanguíneo contra epítomos de *P. lilacinus*.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4.1. ISOLADOS

Foram utilizados dois isolados de *Paecilomyces lilacinus*, denominados PL.T e PL.P. O isolado PL.T, gentilmente cedido por Dr. Oliver Kurzai do *Institut für Hygiene und Mikrobiologie de Würzburg*, Alemanha, foi proveniente de paciente humano do sexo masculino, de 43 anos, que apresentou um abscesso subcutâneo na região tibial anterior direita com evolução lenta por dois anos (Kurzai *et al.*, 2003), e o isolado PL.P, gentilmente cedido por Dra. Annete Fotergill do *Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center de San Antonio*, Estados Unidos, foi proveniente de biopsia de lesão cutânea de paciente humano.

##### 4.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Os isolados foram caracterizados morfológicamente através de cultivo em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar\* (BDA), por 12 dias,

para análise das colônias. Para a observação microscópica foram realizadas microculturas (Ridell, 1950) em meio extrato de malte ágar (MEA), à temperatura ambiente. As estruturas fúngicas foram analisadas, por meio de lâminas preparadas em lactofenol de Amann com azul de algodão (fenol 20 g, ácido láctico 20 ml, glicerol 40 ml, água destilada 20 ml, azul de algodão 0,05 g/100ml). Posteriormente foram visualizadas em microscópio óptico Zeiss modelo Axiophot.

---

\* A procedência das principais substâncias químicas e meios utilizados estão no anexo 1.

#### 4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO E PREPARO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS

Os isolados foram cultivados em meio BDA, à temperatura ambiente, por 7 a 12 dias, para esporulação. Os conídios produzidos foram ressuspensos em 5ml de salina tamponada com fosfato (PBS 50 mM, pH 7,2). Em seguida, incubados por 5 min a 4°C, homogeneizados em vórtex por 3 min, e colocados a 37°C por 5 min. Após o período de incubação, os conídios foram centrifugados por 30 min a 380 x g, e o sobrenadante coletado para quantificação em câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi avaliada por unidade formadora de colônia (UFC) (Goihman-Yahr *et al.*, 1980).

#### 4.4. IMUNOSSUPRESSÃO

Uma solução estéril contendo fosfato dissódico de dexametasona na dose de 5 mg/kg e tetraciclina na concentração de 1000 mg/L foi administrada na água dos camundongos três dias antes da inoculação dos camundongos com os isolados fúngicos e após a inoculação, diariamente, até o término do experimento (45 dias). A posologia dos fármacos foi determinada a partir de

experimentos, anteriormente realizados pelo grupo, para a indução da imunossupressão no caso da dexametasona e prevenção de infecção bacteriana para a tetraciclina (Brito *et al*, 2011).

#### 4.5. ANIMAIS

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), após licenciamento do projeto pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Fiocruz (CEUA – FIOCRUZ), sob o número L-041/07.

Foram utilizados 180 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.

Para cada isolado, os grupos de camundongos em experimentação foram divididos da seguinte forma:

- 30 animais imunocompetentes inoculados com *P. lilacinus*.
- 15 animais imunocompetentes inoculados com PBS - Controle.
- 30 animais imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinus*.
- 15 animais imunossuprimidos inoculados com PBS - Controle.

Os grupos de animais imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com cada isolado foram compostos de 12 animais para análise de sobrevivência e 18 animais para necropsia e demais avaliações. Os grupos



controles foram compostos de 6 animais para a análise da sobrevivência e 9 animais para necropsia e demais avaliações (Figura 2).

Os camundongos foram examinados nos dias 7, 21 e 45 após a inoculação com os isolados.

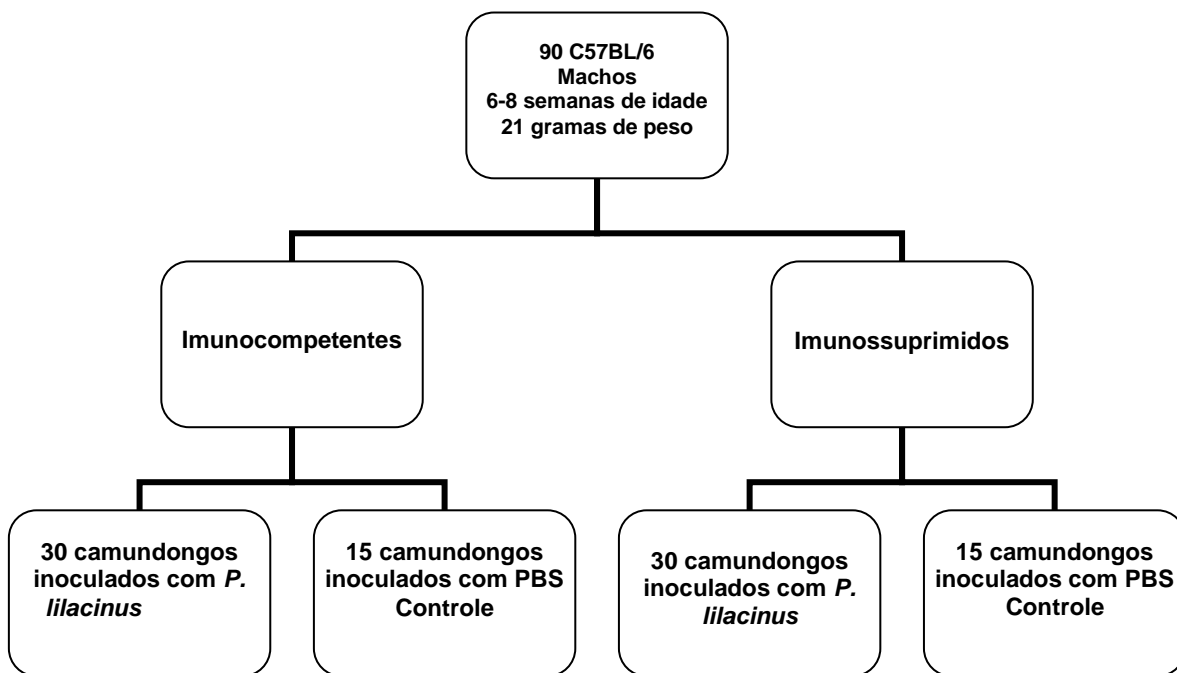


Figura 2. Divisão dos animais em experimentação por grupos (por isolado).

Os camundongos, em número de cinco por caixa, conforme preconizados pela CEUA 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 m<sup>3</sup>/h, com umidade e temperatura ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ) controladas.

#### 4.6. INOCULAÇÃO

Após utilização de 01 gota de cloridrato de proximetacaína a 0,5% (colírio anestésico), grupos de 60 camundongos, 30 competentes e 30 deprimidos imunologicamente foram inoculados com os isolados fúngicos. Os animais foram contidos manualmente e em seguida inoculados como descrito por Brito *et al.* (2011). Em resumo, para esse procedimento foi utilizada seringa “BD ultra fine”, contendo os conídios, com agulha de tamanho 0,3 x 12 mm. A agulha foi inserida, gentilmente, até o fundo da órbita ocular atingindo a veia orbital para então serem introduzidos 0,02 ml da suspensão de células, contendo  $10^5$  conídios, com viabilidade superior a 85%. Grupos controles foram similarmente inoculados com PBS. Os camundongos foram utilizados para os estudos dos sinais clínicos da infecção, tempo de sobrevivência, histopatologia e perfil imunológico.

#### 4.7. SINAIS CLÍNICOS E SOBREVIVÊNCIA DOS CAMUNDONGOS

Doze camundongos do grupo imunocompetente e 12 do grupo imunossuprimido, inoculados com cada isolado foram observados em relação aos sinais clínicos (perda de peso, apatia, lesões cutâneas). A capacidade de sobrevivência dos camundongos imunossuprimidos e imunocompetentes foi avaliada durante 45 dias após a inoculação e comparada com a dos camundongos utilizados como controle.

#### 4.8. OBTENÇÃO DO SANGUE, NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA

Seis camundongos dos grupos imunocompetente e imunossuprimido e três camundongos dos grupos controle foram pesados e anestesiados

intraperitonealmente com 0,03 ml de cloridrato de quetamina a 10% associado a 0,01 ml de cloridrato de xilazina a 2%, para a obtenção de amostras de sangue por meio de punção cardíaca, nos 7<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 45<sup>o</sup> dias pós-inoculação. Em seguida, os camundongos foram eutanasiados por exposição prolongada ao CO<sub>2</sub>. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal em suporte de dissecação e após exame do pêlo, pele e mucosas, foi realizada antissepsia com solução alcoólica de iodo a 10% (v/v), e abertas às cavidades torácica e abdominal. Neste momento, foram investigadas alterações macroscópicas como cor, consistência, tamanho e possíveis lesões nos diferentes órgãos, e após, foram retirados assepticamente o fígado, o baço e os pulmões. Quando os animais apresentaram lesões aparentes foram retirados fragmentos de pele para análise posterior.

O fígado, os pulmões e os tecidos coletados foram fixados em solução de formalina a 10%; desidratados em solução alcoólica crescente de 70 a 90%, 60 min cada; emblocados em parafina; cortados em finas seções e corados em hematoxilina-eosina (HE), pelo método de Grocott (impregnação pela prata) e pela coloração ácido periódico-Schiff (PAS) para o exame histopatológico.

Os mesmos procedimentos foram realizados também para os animais utilizados como grupo controle.

#### 4.9. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ESPLÊNICO

O índice esplênico foi determinado somente para os animais imunocompetentes inoculados com os dois isolados fúngicos estudados. O aumento do baço foi determinado como sendo a razão entre os pesos do baço e do corpo do animal infectado, dividido pela razão entre os pesos do baço e

do corpo do animal controle (Fernandes *et al.*,1999), O aumento do órgão foi expresso em unidades em relação ao controle. O valor médio do peso relativo dos baços dos camundongos do grupo controle foi considerado como igual a uma unidade.

#### 4.10. REISOLAMENTO DO FUNGO

No mesmo momento da necropsia, o baço dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com o fungo 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 Mycosel, objetivando determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) no órgão. As placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 60 dias, para o reisolamento do fungo.

O baço dos camundongos utilizados como controles (grupos II e IV), também foram processados como exposto acima.

#### 4.11. RESPOSTA IMUNE CELULAR

##### 4.11.1 Citometria de Fluxo

Esplenócitos foram recuperados dos baços coletados durante as necropsias dos animais, para análise por citometria de fluxo. As hemácias foram lisadas a partir da adição de 3 µl de tampão de lise (0,1M NH<sub>4</sub>Cl, pH 7.15) por baço. Após, foram realizadas 3 lavagens consecutivas com tampão de coloração gelado (PBS, 0,1% de BSA, 0,01% de azida sódica) e transferidas para os tubos FACS (Becton Dickinson, EUA), centrifugadas por 10 min em

670 x g, à 4°C, e descartado o sobrenadante. Ao *pellet* contendo  $10^5$  cels/50µl, foram adicionados 2µl/amostra de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos específicos (CD4-FITC, CD8-PE, CD25-APC-Cy7, CD62L-APC e CD69-PerCP, Becton Dickinson), na tentativa de verificar a expressão dos marcadores de superfície para os subtipos de células T. Após incubação à 4°C por 30 min, no escuro, as células foram lavadas com tampão de coloração e fixadas por incubação com 500 µl de paraformaldeído a 1%. Posteriormente, foram transferidas para mini-tubos de 1,2 mL (SSI, EUA) e estocadas a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo CyAn (Beckman Coulter, CO, EUA). Para análise dos dados obtidos, foi utilizado o *software* FlowJo (*Flow Cytometry Analyses Software*, Tree Star, EUA). A população de linfócitos foi definida a partir da criação de uma região em gráfico de *dot plot* baseado no tamanho no eixo “x” (FSC: *forward scatter*) versus granulosidade das células (SSC: *side-scatter*) no eixo “y”. Dentro dessa região, foram definidas as subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) e posteriormente analisados os marcadores de ativação e migração celular dentro de cada subpopulação.

#### 4.12. RESPOSTA IMUNE HUMORAL

##### 4.12.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Em lâminas próprias para a RIFI foram colocados 4 µl de PBS contendo  $5 \times 10^7$  conídios/ml (obtidos segundo metodologia descrita no item 4.3). Após a secagem das lâminas, foram adicionados os soros dos camundongos dos grupos imunocompetente e imunossuprimido inoculados com o fungo e controles, diluídos a 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160 e incubados por 60 min em câmara úmida. Depois de três lavagens consecutivas com PBS + 0,2%

de BSA foi adicionado o conjugado (anti-mouse IgG conjugado à fluoresceína – FITC produzido em rato, Sigma, Missouri, EUA) previamente diluído em azul de Evans (1:64, segundo informações do fabricante) e incubado em câmara úmida por mais 60 min. As lâminas foram lavadas novamente em PBS + 0,2% de BSA, e montadas em Vectashield para a leitura em microscópio Zeiss Colibri Axio Observer 21.

#### 4.12.2 Pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo

Em placas de 96 poços de fundo em U (Corning Costar®, EUA) foram incubados 50 µl do soro dos camundongos dos grupos imunocompetente e imunossuprimido inoculados com o fungo e controles, diluídos a 1:25, 1:50, 1:500, adicionados de 50 µl da suspensão contendo  $2,5 \times 10^5$  conídios (obtidos segundo metodologia descrita no item 4.3), por 60 min, a 37°C. Após, foram realizadas 3 lavagens em PBS + 10% de SFB, seguidas da adição de 100 µl do conjugado (anti-mouse IgG conjugado à fluoresceína – FITC produzido em rato, Sigma, Missouri, EUA) nas diluições 1:200, 1:400 e 1:800, e incubação, no escuro, por 60 min. Posteriormente, foram realizadas novas lavagens, seguidas de fixação com paraformaldeído a 1%, para posterior aquisição no citômetro de fluxo Cyan (Beckman Coulter, CO, EUA). Para análise dos dados utilizamos o *software* FlowJo (*Flow Cytometry Analyses Software, Tree Star, EUA*). A população de conídios foi definida a partir da criação de uma região em gráfico de *dot plot* baseado no tamanho no eixo “x” (FSC: *foward scatter*) versus granulosidade das células (SSC: *side-scatter*) no eixo “y”. Dentro dessa região analisamos o percentual e a intensidade de fluorescência da marcação com o anticorpo anti-mouse IgG FITC.

#### 4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparações entre os grupos para a análise da virulência dos isolados foram realizadas através do teste *t-Student*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Na avaliação macromorfológica, à temperatura ambiente, aos 12 dias de cultivo, foi possível verificar, que ambos os isolados de *Paecilomyces lilacinus* apresentaram colônias inicialmente brancas, assumindo coloração violácea, com reverso púrpura, características da espécie (Luangsa-ard *et al.*, 2011) (Figura 3). A partir do microcultivo em lâmina foi possível observar hifas vegetativas hialinas, de parede lisa, com longos conidióforos verticilados sustentando 2 a 4 fiálides em forma de garrafa com delicado pescoço e porção basal dilatada. Também foram observados conídios elípticos a fusiformes, hialinos, medindo 2,5 – 3,0 x 2,0 – 2,5  $\mu\text{m}$  (Figura 4).

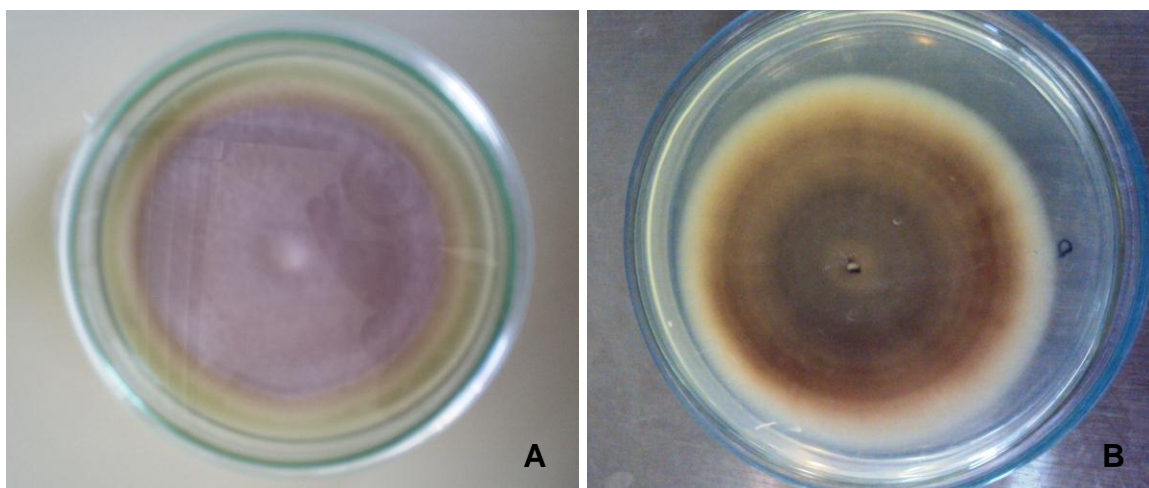




Figura 3: Macrocultura de *Paecilomyces lilacinus* após 12 dias de cultivo em meio batata dextrose ágar, a 25<sup>0</sup> C. **A**- Colônia de coloração violácea; **B**- Reverso da colônia em coloração púrpura.

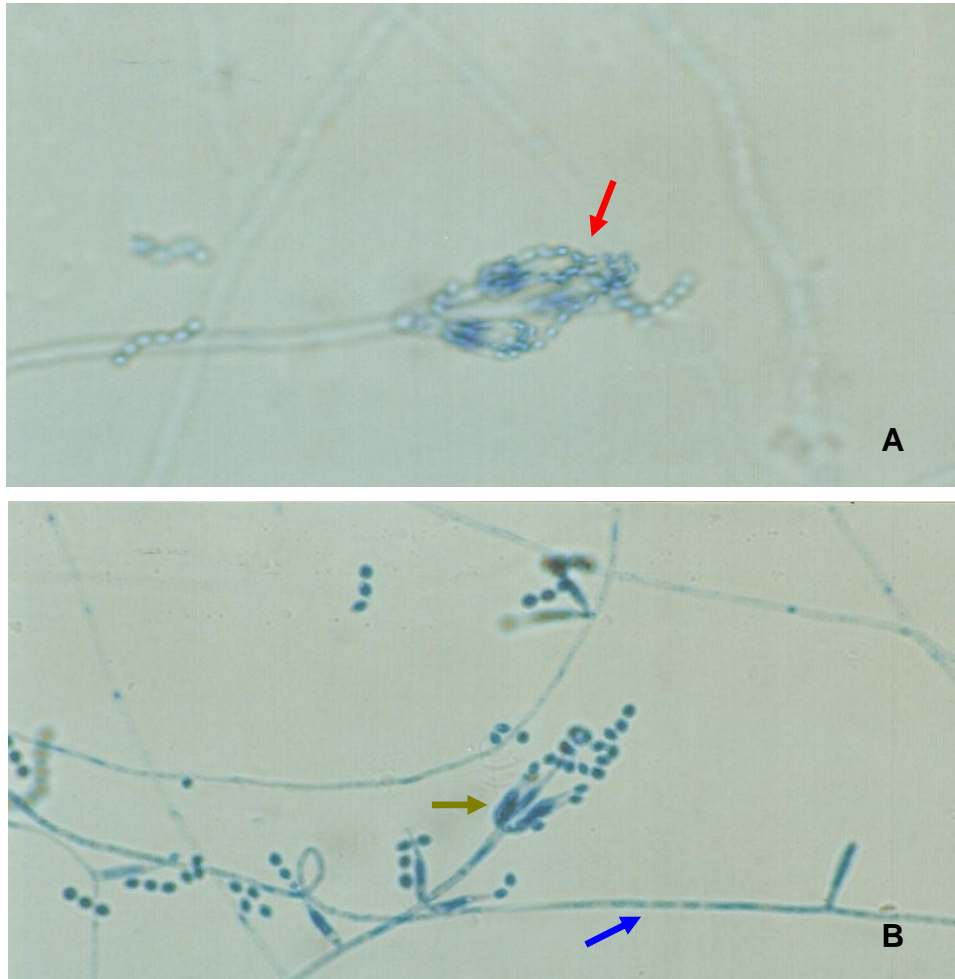


Figura 4. Microcultivo em lâmina de *Paecilomyces lilacinus*, com 14 dias de crescimento, a 25<sup>0</sup>C em meio extrato de malte ágar, corado com lactofenol de Amann com azul de algodão. **A**) Isolado PL.T. Conídios em cadeias (—→); **B**) Isolado PL.P. Hifas vegetativas, septadas (—→) e conidióforo sustentando fiálides verticiladas (—→) em forma de garrafa com porção basal dilatada e delicado pescoço. Aumento original 1000 x.

## 5.2. SINAIS CLÍNICOS NOS CAMUNDONGOS INOCULADOS

A maioria dos camundongos imunocompetentes, inoculados com ambos os isolados de *P. lilacinus*, não apresentou sinais clínicos da doença. Os camundongos mantiveram-se ativos ao longo do período observado, bem como os do grupo controle, inoculados com PBS. Entretanto, no tempo de 45 dias após a inoculação, 01 camundongo imunocompetente inoculado com o isolado PL.T apresentou severa ceratite no olho direito (dados não mostrados). Os camundongos dos grupos imunossuprimidos, inoculados com os isolados e controles, apresentaram perda de peso (Tabelas 1 e 2), apatia e queda de pêlo. Ambos os isolados foram capazes de provocar lesões na base da cauda (Figura 5) a partir do 21<sup>o</sup> dia após inoculação e entre os camundongos inoculados com o isolado PL.P, foi possível observar a presença de dermatite no dorso e nódulo abdominal em um dos camundongos inoculado com esse isolado (Figura 6).

Tabela 1: Variação de peso dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinus* (isolado PL.T)

Grupo	Dias após inoculação							
	0		7		21		45	
<b>CPT PL</b>	21g	↑	23,71 ± 1,80	↑	25,32 ± 1,59	↑	27,69 ± 1,70	
<b>CPT PBS</b>	21g	↑	23,85 ± 0,16	↑	23,94 ± 1,46	↑	25,91 ± 2,11	
<b>SPM PL</b>	21g	↓	18,55 ± 1,16	↓	19,07 ± 3,25	↓	19,5 *	
<b>SPM PBS</b>	21g	↓	19,38 ± 0,78	↔	21,04 ± 1,96	↓	18,33 ± 0,82	

\* Não foi calculada a média, apenas utilizado o peso do único animal sobrevivente neste ponto de coleta.

Tabela 2: Variação de peso dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinus* (isolado PL.P)

Grupo	Dias após inoculação							
	0		7		21		45	
<b>CPT PL</b>	21g	↑	23,89 ± 1,43	↑	24,42 ± 1,93	↑	27,11 ± 1,86	
<b>CPT PBS</b>	21g	↑	24,7 ± 1,27	↑	24,96 ± 3,25	↑	25,14 ± 1,47	
<b>SPM PL</b>	21g	↓	17,27 ± 1,78	↓	18,19 ± 1,02	↓	16,83 ± 2,03	
<b>SPM PBS</b>	21g	↓	19,09 ± 1,91	↓	17,57 ± 0,93	↓	18,90 ± 1,48	

Legenda:

SPM PL = camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinus*

SPM PBS = camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS

CPT PL = camundongos imunocompetentes inoculados com *P. lilacinus*

CPT PBS = camundongos imunocompetentes inoculados com PBS

↓ perda de peso    ↑ ganho de peso    ↔ manutenção do peso

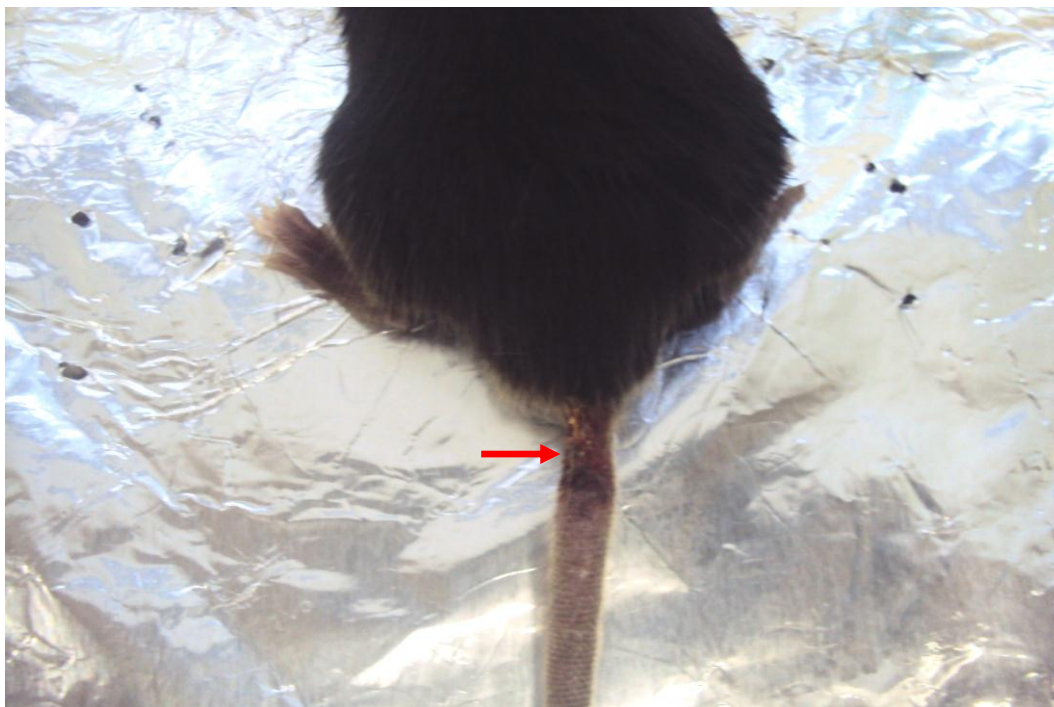


Figura 5. Camundongo imunossuprimido inoculado (i.v.) com *Paecilomyces lilacinus* (isolado PL.T) apresentando lesão na base da cauda ( → ).

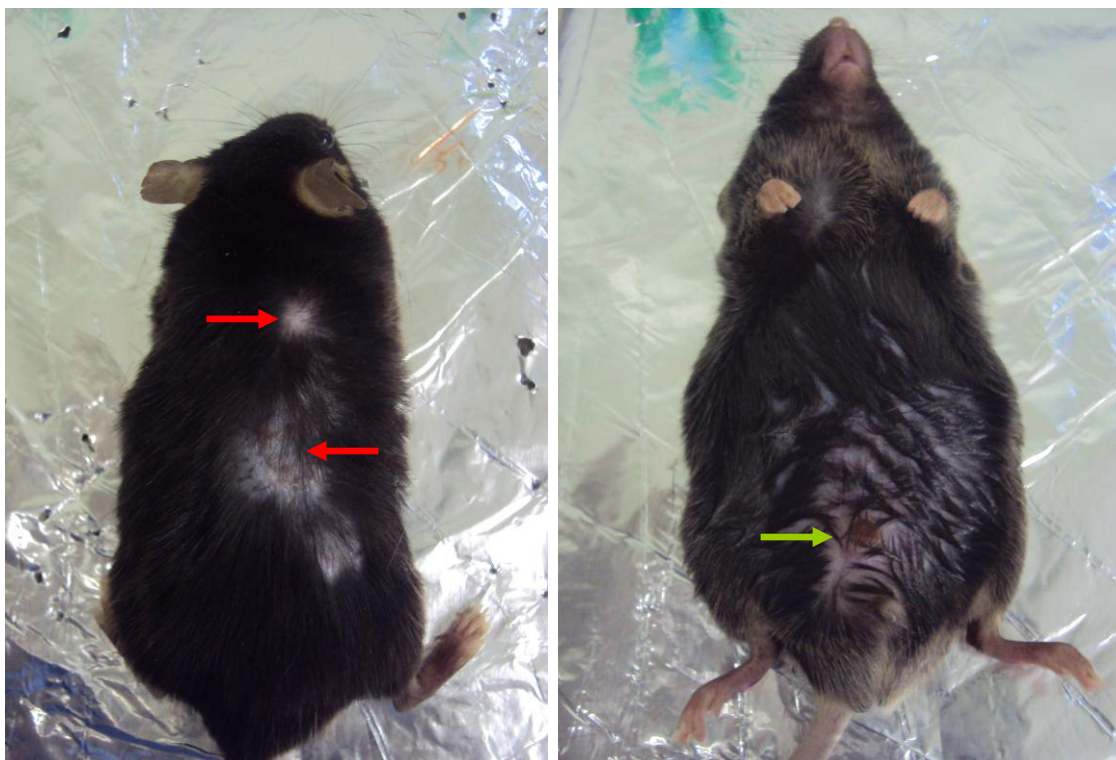




Figura 6. Camundongos imunossuprimidos inoculados (i.v.) com *Paecilomyces lilacinus* (isolado PL.P) apresentando múltiplas lesões dermatológicas no dorso (  ) e nódulo abdominal (  ).

### 5.3. SOBREVIVÊNCIA DOS CAMUNDONGOS

Os camundongos imunocompetentes, inoculados com o isolado PL.T e o grupo controle apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto os animais inoculados com o isolado PL.P apresentaram 90% de sobrevivência ao final dos 45 dias de observação (Figura 7A). Com relação aos camundongos imunossuprimidos inoculados com o fungo, os animais inoculados com o isolado PL.T apresentaram 20% de sobrevivência e os inoculados com o isolado PL.P apresentaram 0% de sobrevivência ao final do experimento (45 dias de observação). O grupo controle também apresentou 0% de sobrevivência (Figura 7B).

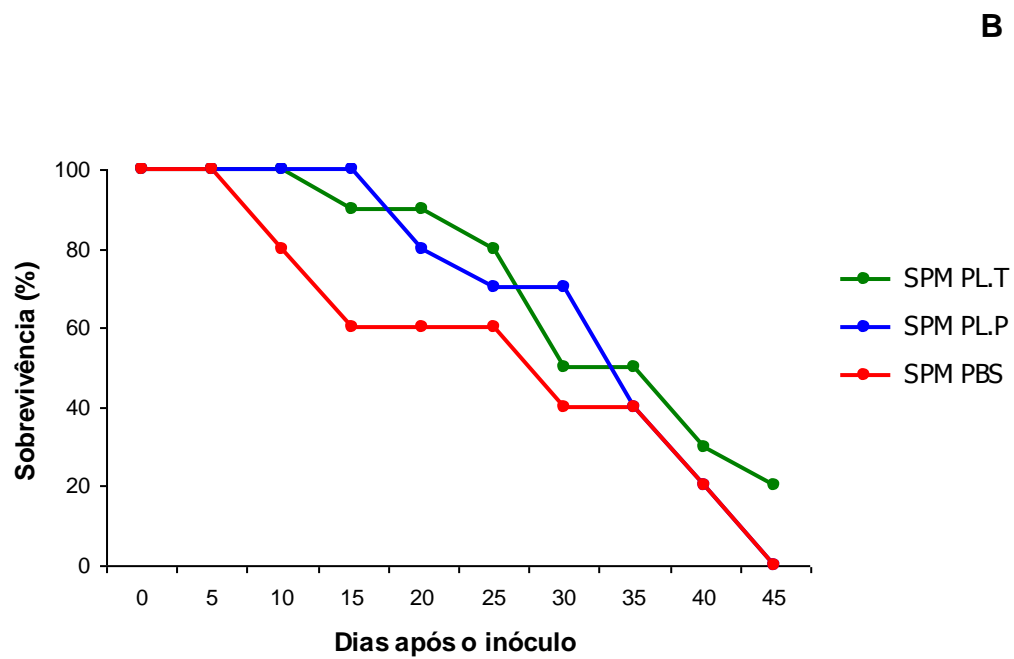
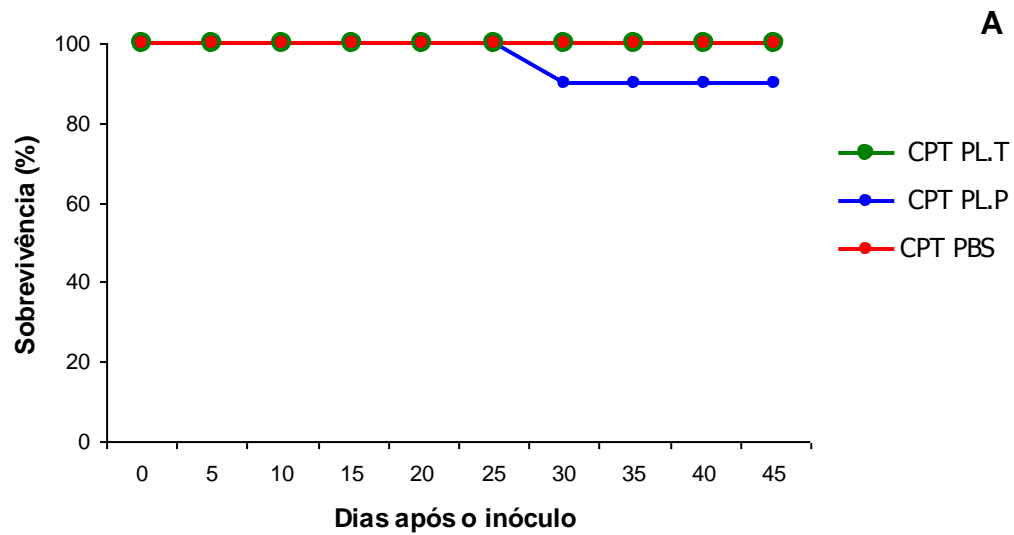


Figura 7. Percentual de sobrevivência dos camundongos após inoculação intravenosa com  $10^5$  conídios de *Paecilomyces lilacinus*, isolados PL.T e PL.P,

e com PBS durante o período de 45 após a inoculação. A) Camundongos imunocompetentes B) Camundongos imunossuprimidos.

#### 5.4. NECROPSIA

Durante a necropsia foi possível observar que os órgãos dos camundongos imunocompetentes inoculados com ambos os isolados, apresentaram aspecto normal com relação ao tamanho e coloração (Figura 8), quando comparados aos camundongos controles. O baço dos camundongos inoculados com o fungo foi o único órgão a apresentar alterações, tendo sido observado um expressivo aumento do tamanho do órgão no 7º dia pós-inóculo.



Figura 8 – Necropsia de camundongo imunocompetente inoculado (i.v.) com *Paecilomyces lilacinus*, isolado PL.T. Órgãos com características morfológicas, cor e tamanho preservados.

Nos camundongos imunossuprimidos, inoculados com o fungo ou com PBS, o baço apresentou atrofia e coloração pálida em relação ao controle imunocompetente (Figura 9). Essa coloração foi também observada no fígado e nos rins, além de alterações em sua consistência (dados não mostrados).

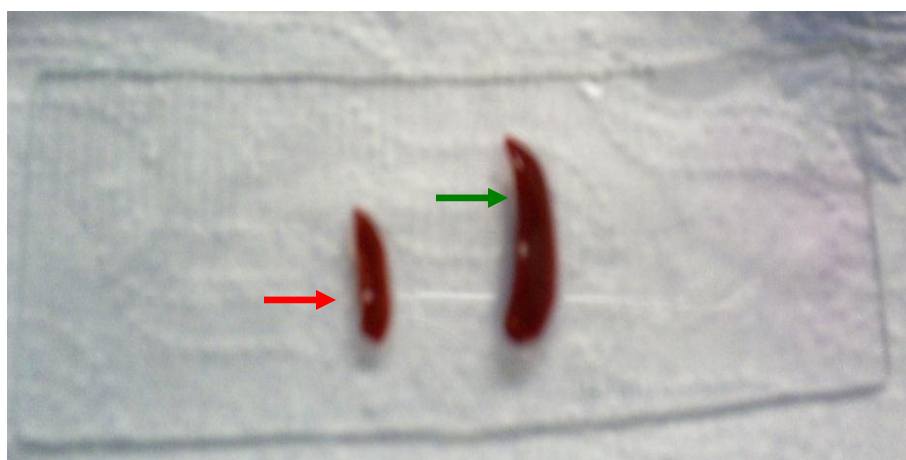


Figura 9 – Redução do tamanho do baço de camundongo controle imunossuprimido com dexametasona (→), com relação ao baço de camundongo controle imunocompetente (→).

### 5.5. EXAME HISTOPATOLÓGICO

Nos tecidos hepático e pulmonar dos camundongos imunocompetentes inoculados com o isolado PL.T não foram observadas alterações histológicas nem estruturas fúngicas. Já nos camundongos imunossuprimidos, em cerca de 70% das lâminas com resultados positivos, foi possível observar hepatite com moderado infiltrado inflamatório misto, multifocal, constituído por macrófagos, neutrófilos e linfócitos. O infiltrado foi observado no parênquima em torno da



veia centrolobular e na região periportal. Também foram observadas estruturas fúngicas semelhantes a conídios no parênquima hepático em meio a reação inflamatória (Figura 10) como também no interior de macrófagos no tecido pulmonar (dados não mostrados).

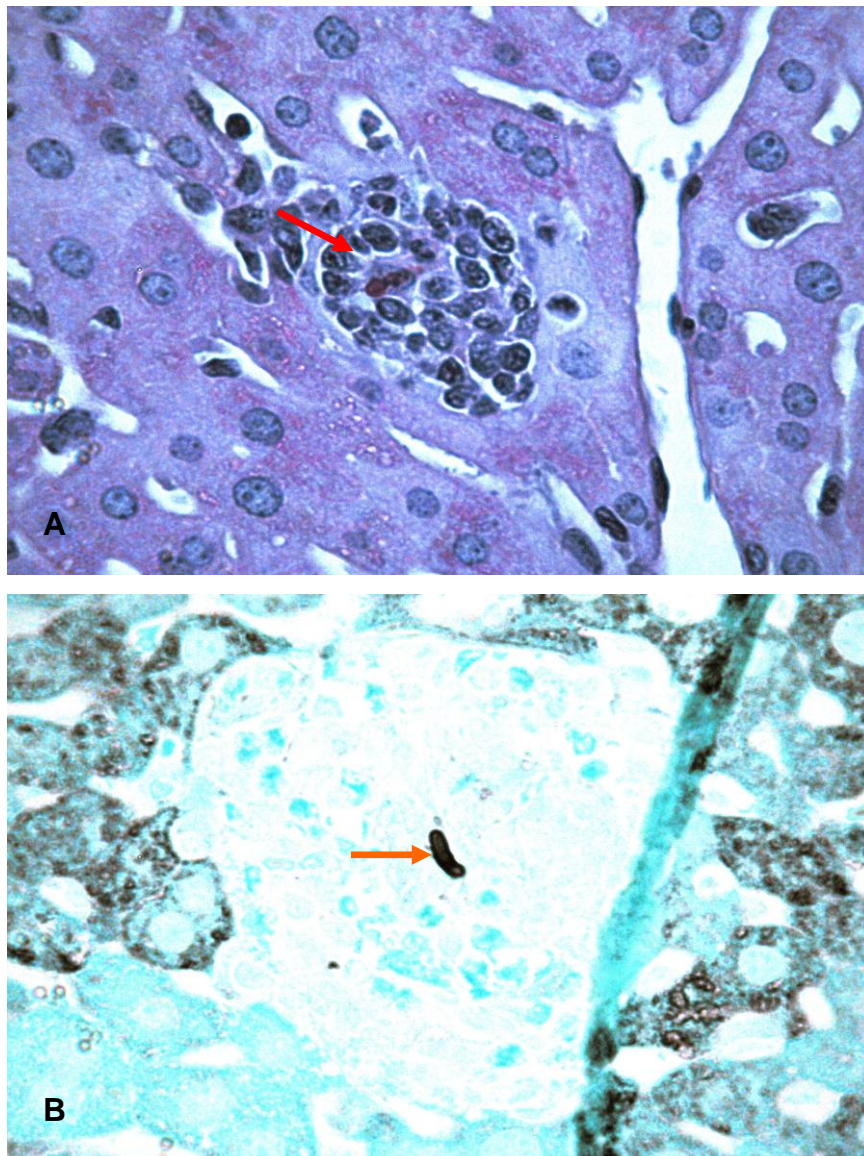


Figura 10. Corte histológico de tecido hepático de camundongos imunossuprimidos inoculados com *Paecilomyces lilacinus*, isolado PL.T aos 21 dias de inoculação. **A** - Foco inflamatório misto, multifocal, constituído por macrófagos, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos, centralizando estruturas fúngicas semelhantes a conídios no parênquima ( **→**). PAS, aumento original



1000 x; **B** – Estrutura fúngica no parênquima hepático ( ). Grocott, aumento original 1000 x.

Com relação ao isolado PL.P, 90% das lâminas de tecido pulmonar analisadas, de animais imunossuprimidos e imunocompetentes, apresentaram alterações histológicas, que diferiram apenas na quantidade de estruturas fúngicas encontradas. Enquanto o tecido pulmonar de imunossuprimidos apresentou diversos conídios no parênquima e no citoplasma de macrófagos, nos imunocompetentes observamos raros conídios dispersos no citoplasma (Figura 11). Alguns camundongos imunossuprimidos apresentaram pneumonites multifocais, com moderado infiltrado inflamatório constituído por macrófagos e neutrófilos. Conídios foram observados no lúmen e parede alveolar no citoplasma de macrófagos em grandes quantidades, formando agregados nas paredes dos alvéolos (dados não mostrados). Apenas um camundongo do grupo dos imunocompetentes inoculado com o isolado PL.P apresentou discreto foco inflamatório no parênquima hepático constituído por macrófagos, neutrófilos e linfócitos, porém estruturas fúngicas não foram observadas. Os camundongos imunossuprimidos inoculados com o mesmo isolado não apresentaram alterações histológicas no tecido hepático (dados não mostrados).

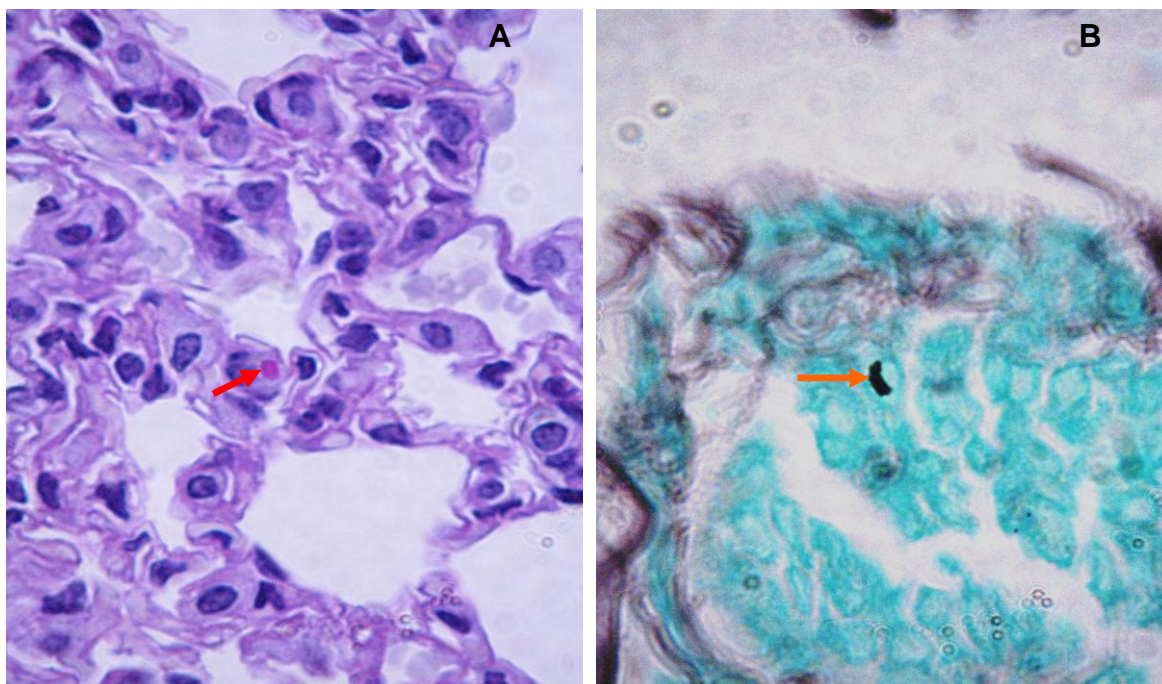


Figura 11. Corte histológico de tecido pulmonar de camundongos imunocompetentes inoculados com *Paecilomyces lilacinus*, isolado PL.P aos 21 dias de inoculação. **A** – Estrutura fúngica semelhante a conídio no citoplasma de fagócito ( → ). PAS, aumento original 1000 x; **B** – Estrutura fúngica no parênquima pulmonar ( → ). Grocott, aumento original 1000 x.

Nas lâminas confeccionadas a partir do nódulo abdominal, coletado de camundongos imunossuprimidos inoculados com o isolado PL.P, coradas por HE, foi possível observar dermatite com moderado infiltrado inflamatório difuso, constituído por neutrófilos, que se estendeu para o tecido subcutâneo. Através das colorações de PAS e Grocott, foram observados diversos conídios e fragmentos de hifas em meio a material purulento (Figura 12). A cultura em todos os casos foi positiva para *P.lilacinus*.

A frequência de estruturas fúngicas encontradas nos tecidos dos animais foi maior nos tempos iniciais da infecção com ambos os isolados. Em

camundongos imunocompetentes só foi possível a observação dessas estruturas nos tecidos coletados no 7º dia após a inoculação, enquanto os imunossuprimidos foram os que apresentaram alterações histopatológicas mais evidentes, com maiores quantidades de conídios livres e fragmentos de hifas de *P. lilacinus*. No 21º dia essa frequência diminuiu até a completa ausência de estruturas fúngicas no 45º pós-inóculo, nos grupos dos camundongos tratados com a dexametasona.

Nos camundongos utilizados como controle, não foram observadas alterações e estruturas fúngicas nos tecidos avaliados.

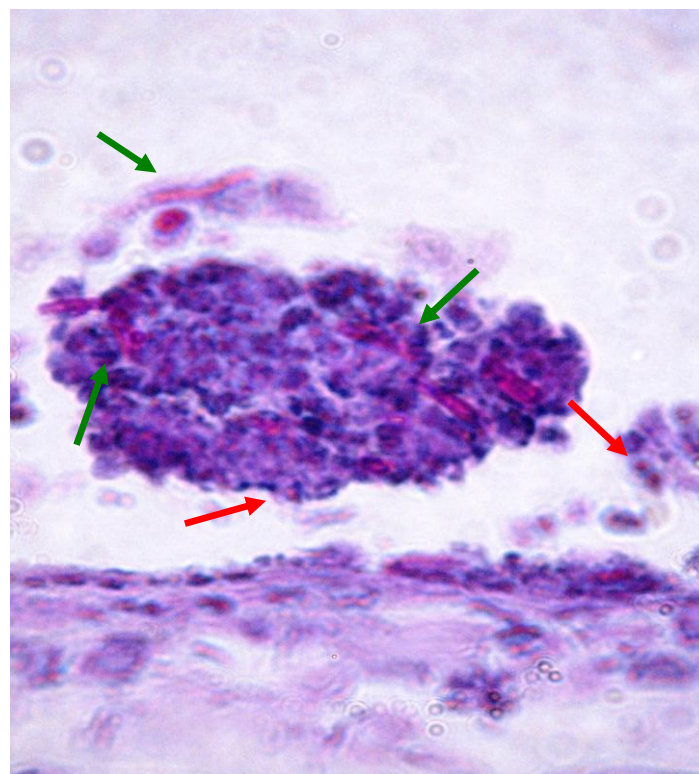


Figura 12. Corte histológico de nódulo retirado da região abdominal de camundongo imunossuprimido inoculado com *Paecilomyces lilacinus*, isolado PL.P, aos 45 dias de inoculação. **A)** Presença de conídios ( → ) e fragmentos de hifas ( → ) em meio a material necrótico. PAS, aumento original 1000 x

## 5.6. ÍNDICE ESPLÊNICO

A tabela 3 apresenta os valores dos índices esplênicos dos camundongos imunocompetentes inoculados com ambos os isolados e seus respectivos controles. Ao longo do período, os valores de índice esplênico foram decrescentes e houve diferenças significativas nas médias entre os isolados ( $P > 0,05$ ).

Tabela 3: Índice esplênico dos camundongos imunocompetentes inoculados com *Paecilomyces lilacinus*, isolados PL.T e PL.P, e seus controles inoculados com PBS

Grupos	Dias após a inoculação			
	07	21	45	Média do período
CPT PL.T	2,02±1,32	1,26±0,94	1,37±0,86	1,44±1,30*
CPT PL.P	2,12±0,37	0,9±0,29	0,4±0,06	0,77±1,25
CPT PBS	1	1	1	1

CPT PL.T = camundongos imunocompetentes inoculados com o isolado PL.T – n=6 por ponto analisado

CPT PL.P = camundongos imunocompetentes inoculados com o isolado PL.P – n= 6 por ponto analisado

CPT PBS = camundongos imunocompetentes inoculados com PBS – n= 3 por ponto analisado

\*  $P > 0,05$

## 5.7. REISOLAMENTO DE CÉLULAS FÚNGICAS

O reisolamento de células fúngicas foi realizado a partir do cultivo de tecido esplênico, nos tempos de 7, 21 e 45 dias após a inoculação, e está demonstrado na figura 14. Foi observado que grande quantidade de células fúngicas pôde ser recuperada no 7º dia após a inoculação com ambos os isolados, nos animais imunocompetentes e imunossuprimidos.

Para os camundongos imunocompetentes inoculados com o isolado PL.T (Figura 13A) não foi possível a recuperação do fungo no 21º dia pós-inoculação. É provável que fatores relativos ao cultivo das células fúngicas impossibilitaram o reisolamento do fungo nesse ponto. Entre os camundongos imunossuprimidos, foi observado um declínio progressivo da quantidade de unidades formadoras de colônia, do mesmo isolado citado acima, a partir do 7º dia pós-inoculação, porém ao final do experimento um número maior de células fúngicas viáveis foram recuperadas do baço dos animais quando comparado aos animais imunocompetentes. Foi possível também o reisolamento de células fúngicas de material ocular de um camundongo imunocompetente inoculado com o isolado PL.T, com severa ceratite no olho direito aos 45 dias pós-inóculo (dados não mostrados).

Nos camundongos inoculados com o isolado PL.P (Figura 13B), competentes e suprimidos imunologicamente, observamos uma curva de recuperação de células, em todos os pontos, semelhante a curva dos animais inoculados com o isolado PL.T, com picos no 7º dia após a inoculação, seguido de uma diminuição gradativa até o fim do período de observação. Entretanto, a média de recuperação de células fúngicas a partir do baço dos animais

inoculados com o isolado PL.P foi significativamente ( $P > 0,05$ ) maior que a média de células recuperadas do órgão dos animais inoculados com o isolado PL.T em todos os pontos de observação.

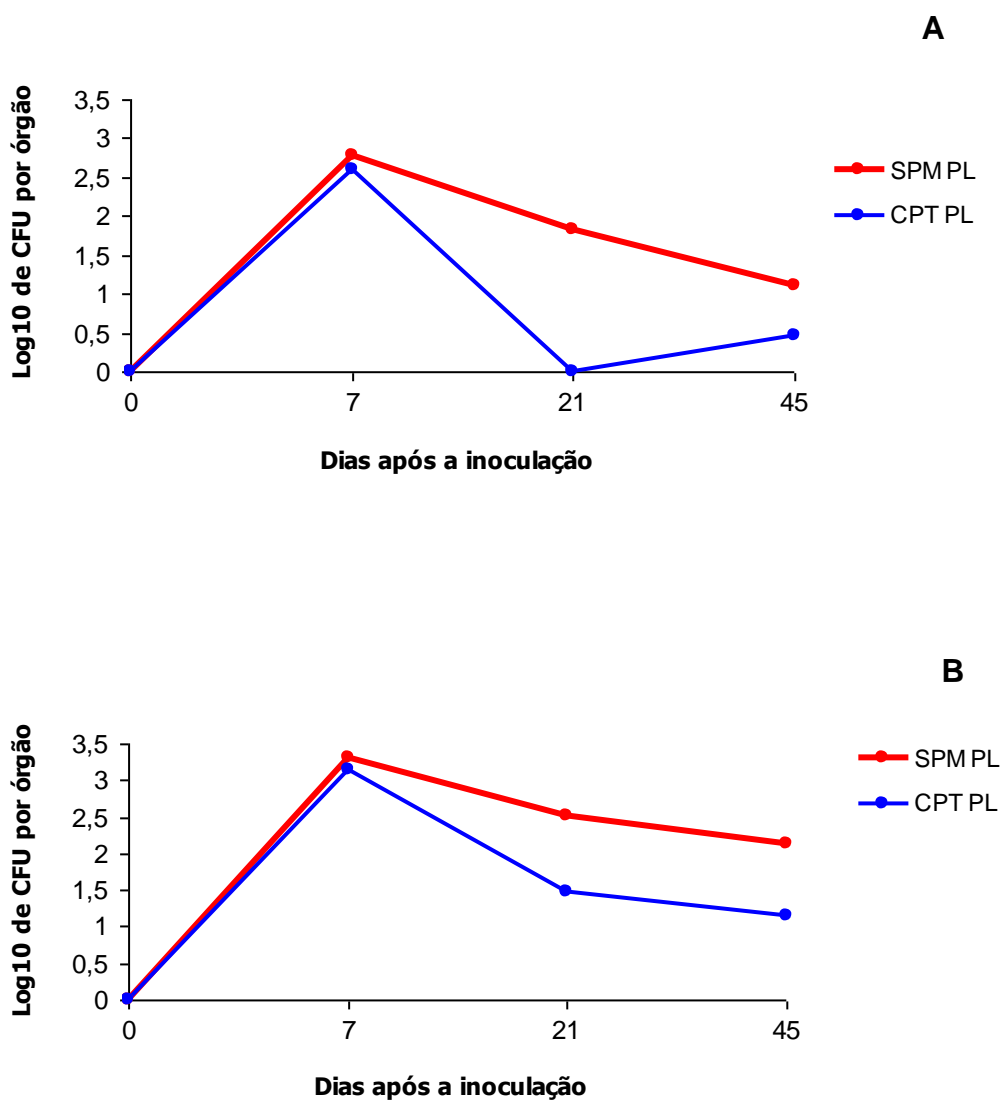


Figura 13. Número de células de *Paecilomyces lilacinus* recuperadas de baço de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. Cada linha representa a média de UFC recuperada de baço de seis camundongos eutanasiados com 7, 21 e 45 dias após a inoculação. **A)** Isolado PL.T; **B)** Isolado PL.P.

## 5.8. RESPOSTA IMUNE CELULAR

### 5.8.1. Celularidade do baço: quantificação de esplenócitos e de células TCD4+ e TCD8+

No sétimo dia após a inoculação com o isolado PL.T, os animais imunocompetentes inoculados e controles apresentaram, respectivamente, 120 e 45 milhões de células por baço. Nos imunossuprimidos, esse número foi reduzido drasticamente, sendo suas contagens 3 e 6,5 milhões de células nos inoculados e controle, respectivamente.

No tempo intermediário após a inoculação (21º dia), ainda com o isolado PL.T, observamos acentuada redução na celularidade do baço dos animais do grupo imunossuprimido. Apesar disso, o grupo imunocompetente inoculado com o este isolado manteve, proporcionalmente, cerca de duas vezes mais células que seu controle, contando com 25 e 13 milhões de células, respectivamente. Entre os imunossuprimidos, não houve uma redução expressiva com relação ao início da infecção. No grupo inoculado com o fungo foi possível quantificar aproximadamente 2 milhões de células, e no seu grupo controle 4,5 milhões.

Ao fim do experimento, no 45º dia após a inoculação, ocorreu uma inversão no perfil de celularidade comparando os animais inoculados com o fungo e seus controles, tanto no grupo dos imunocompetentes quanto no dos imunossuprimidos em relação aos tempos de experimento anteriores, portanto, 7º e 21º dias (Figura 14A).



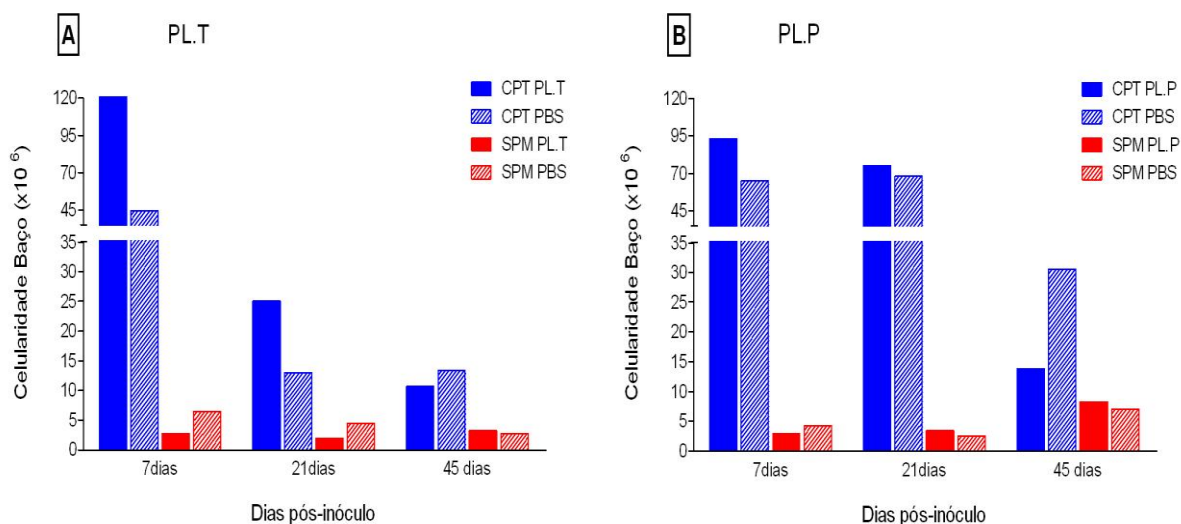


Figura 14: Quantificação de esplenócitos de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com *Paecilomyces lilacinus* e com PBS nos dias 7,21 e 45 após a inoculação. **A)** Isolado PL.T; **B)** Isolado PL.P.

Com relação à celularidade dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos, inoculados com o isolado PL.P, e seus respectivos controles foi possível observar um padrão semelhante de redução acentuada da celularidade do baço nos grupos imunossuprimidos durante todo o período de experimentação (Figura 14B). No 7º dia após a inoculação, no grupo dos imunocompetentes inoculados com o isolado PL.P observamos 93 milhões de células e no grupo controle 65 milhões. Nos camundongos imunossuprimidos a celularidade do baço apresentou níveis baixos, 2,85 milhões de células entre os animais inoculados com o fungo e 4,25 milhões no grupo controle.

No 21º dia pós-inóculo a quantificação de células do baço no grupo dos imunocompetentes, inoculados com esse mesmo isolado do fungo foi elevada, 75 milhões de células e seu controle apresentou 68 milhões. O perfil dos imunossuprimidos diferiu, uma vez que observamos um ligeiro aumento no

número de células do baço dos camundongos inoculados com o fungo, com um total de 3,4 milhões de células, e 2,5 milhões no grupo controle.

No último ponto de observação do experimento, portanto o 45<sup>o</sup> dia após a inoculação com o isolado PL.P, o grupo dos animais imunocompetentes controle apresentou 30,5 milhões de células, enquanto que os camundongos imunocompetentes inoculados com o fungo apresentaram 13,8 milhões de células. No grupo dos imunossuprimidos, observamos quantidades maiores de células do baço dos camundongos inoculados com o fungo: 18,2 milhões de células, contra 7 milhões nos animais controles.

Durante o experimento foi observado, pela citometria de fluxo, um decréscimo no número de esplenócitos apresentando morfologia compatível com células viáveis no baço dos camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS com relação ao controle imunocompetente, aos 7<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 45<sup>o</sup> dias após o inóculo (Figura 15).

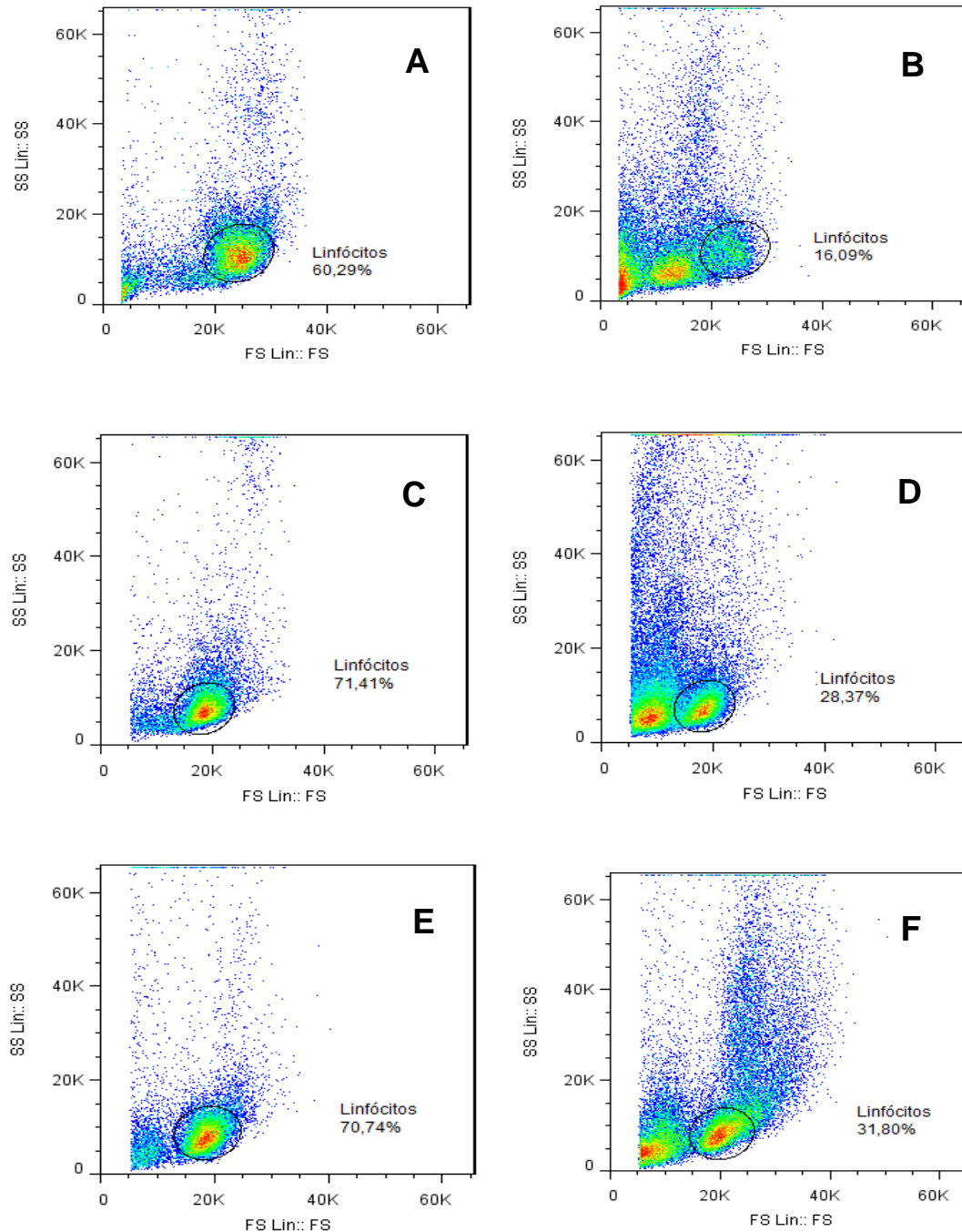


Figura 15. Gráficos representativos do perfil morfológico (tamanho FS x granulosidade SS) das células de baço dos camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS com relação ao controle imunocompetente. A) imunocompetente aos 7 dias pós-inóculo; B) imunossuprimido aos 7 dias pós-inóculo; C) imunocompetente aos 21 dias pós-inóculo; D) imunossuprimido aos 21 dias pós-inóculo; E) imunocompetente aos 45 dias pós-inóculo; F) imunossuprimido aos 45 dias pós-inóculo. Um total de 10.000 eventos foi adquirido dentro do gate de linfócitos.

Com relação à quantificação de células CD4+ e CD8+ esplênicas de camundongos imunocompetentes foi observado, no sétimo dia após a inoculação com o isolado PL.T, os animais apresentaram um ligeiro decréscimo na expressão de células CD4+ tanto quanto de CD8+ quando comparado ao grupo controle (Figura 16A). Foram quantificadas 20,43 e 12,83% de células CD4+ e CD8+, respectivamente, no grupo inoculado com o fungo, enquanto no grupo controle obtivemos 22,31% e 16,28% de células CD4+ e CD8+, respectivamente. No 21º dia pós-inoculação os camundongos inoculados com o mesmo isolado, apresentaram 21,15% de células CD4+ e 33,27% de células CD8+. Os animais do grupo controle apresentaram 19,5% e 32,53% de células CD4+ e CD8+, respectivamente. No último ponto do experimento, 45º dia, os camundongos inoculados com o fungo apresentaram 28,09% de CD4+ e 21,7% de CD8+. Os controles apresentaram 33,76% e 22,12% de células CD4+ e CD8+, respectivamente (Figura 16A).

A figura 16B apresenta o percentual de células CD4+ e CD8+ para os camundongos imunocompetentes inoculados com o isolado PL.P e o grupo controle, inoculado com PBS. Ao 7º dia pós-inóculo com o fungo, os camundongos apresentaram um ligeiro aumento de células CD4+ em relação ao grupo controle, 25,79% e 23,62%, respectivamente e percentuais de 13,3% de positividade para CD8+ em ambos os grupos. No 21º dia após a inoculação, o grupo dos animais inoculados com o isolado PL.P apresentou 19,39% de positividade para células CD4+, enquanto que o grupo controle apresentou percentuais mais altos, 23,01%. Para as células CD8+, a exemplo do observado no início do experimento, não houve uma diferença evidente entre o

grupo inoculado e o controle, sendo os percentuais de positividade de linfócitos CD8+ verificados em 12,81% e 12,18%, respectivamente.

Ao final do experimento, no 45º dia, houve um aumento no número de células CD4+ e CD8+, para o grupo dos animais inoculados com o fungo em relação ao controle, mais acentuado no caso das células CD8+. Foram quantificadas 37,4% de células CD4+ e 32,27% de CD8+ no grupo inoculado com o fungo, enquanto que o grupo controle, apresentou 35,62% e 23,22% de células CD4+ e CD8+, respectivamente.

No que se refere aos resultados obtidos nos grupos de animais imunossuprimidos inoculados com os mesmos isolados de *P. lilacinus* e seus respectivos grupos controle inoculados com PBS (Figura 16A e B), observamos uma inversão na proporção CD4/CD8, já que, em todos os períodos do estudo e em todos os grupos estudados, foram encontrados percentuais mais elevados de células CD8+ do que CD4+ no baço dos animais.

No sétimo dia após a inoculação com o isolado PL.T, as células CD4+ obtidas dos camundongos imunossuprimidos inoculados com o fungo foram quantificadas em 5,08%, contra 29,27% de células CD8+. Entre os controles, foram quantificadas 22,67% de células CD4+ e 42,32% de CD8+. No 21º dia pós-inóculo, os camundongos imunossuprimidos inoculados com o isolado PL.T apresentaram 5,26% de células CD4+, contra 14,37% para o grupo controle inoculado com PBS. O percentual de positividade de células CD8+ nos camundongos inoculados foi 7,89%, contra 40,36% entre os controles. Ao final do experimento, portanto no 45º dia, os camundongos inoculados com o mesmo isolado apresentaram um percentual de positividade de células CD4+ para o grupo inoculado com o fungo de 21,85%, e 39,71% de células CD8+.

enquanto que no grupo controle esses percentuais foram de 3,89% e 22,08% respectivamente (Figura 16A).

Em relação aos camundongos imunossuprimidos inoculados com o isolado PL.P e no grupo controle, observamos que, no 7º dia após o inóculo, a proporção de células CD4+ foi maior no grupo inoculado com o fungo, 23,45% enquanto o seu controle apresentou, 9,57% de células. A percentagem de células CD8+ entre os imunossuprimidos inoculados com o fungo e seu controle foi de 45,69% e 48,71%, respectivamente. Ao 21º dia após a inoculação os camundongos imunossuprimidos, infectados com o mesmo isolado, apresentaram percentual de células CD4+ (18,07%) semelhante ao obtido no grupo controle (21,27%), diferentemente do observado para o percentual de células CD8+, que foi de 49,08% para o grupo inoculado com o fungo e 30,7% para o grupo controle. Ao final do experimento, 45º dia, tanto o grupo de camundongos imunossuprimidos inoculados quanto o grupo controle apresentaram uma baixa percentagem de células CD4+, totalizando 6,71% e 4,02%, respectivamente. Em relação às células CD8+, o grupo controle apresentou um ligeiro aumento no percentual dessas células (25,89%), quando comparado ao percentual de células do grupo inoculado com o fungo (23,57%) (Figura 16B).

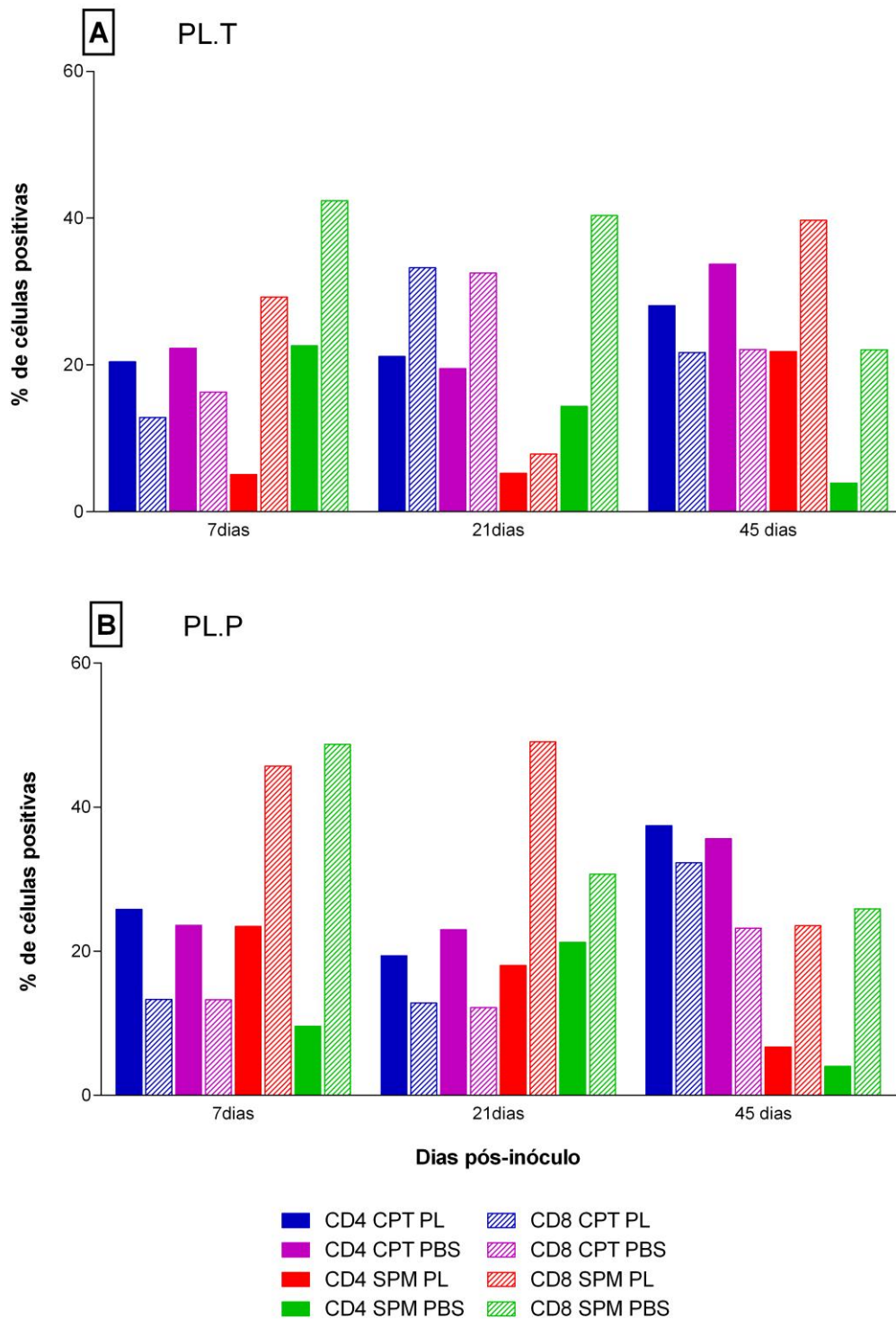


Figura 16. Percentual de células CD4+ e CD8+ no baço de camundongos imunocompetentes (CPT) e imunossuprimidos (SPM) inoculados com *Paecilomyces lilacinus*, isolado PL.T (A), e PL.P (B) e seus respectivos controles PBS, nos dias 7, 21 e 45 após a inoculação

## 5.8.2 Imunofenotipagem

5.8.2.1: Perfil da expressão de moléculas de ativação e migração celular em linfócitos CD4+ de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com os isolados PL.T e PL.P e seus respectivos controles inoculados com PBS

Os percentuais de expressão dos marcadores de ativação CD25 e CD69 e de migração celular, CD62L, em linfócitos CD4+ de camundongos imunocompetentes inoculados com o isolado PL.T e com PBS estão demonstrados nas figuras 17 A, C e E respectivamente. No 7º dia pós-inóculo, observamos uma queda de 11,89 pontos percentuais de células CD4+CD62L+ no grupo infectado com o fungo (48,98%) quando comparado ao grupo controle, em que foi observado um percentual de marcação para essas células de 60,87%. No 21º dia, ocorreu um ligeiro decréscimo na expressão desse marcador em ambos os grupos, porém o grupo infectado apresentou um percentual um pouco maior de células CD4+CD62L+ (34,93%) do que o grupo controle (28,57%), com um aumento de 6,36 pontos percentuais. Ao fim do experimento, 45º dia, este padrão de expressão de CD62L permaneceu o mesmo, com o grupo infectado apresentando um percentual de 39,08% células CD4+CD62L+ e o grupo controle de 32,37% (Figura 17A).

Com relação à expressão de CD25 e CD69, estas foram bastante discretas durante todo o experimento. No 7º dia pós-inóculo, o grupo inoculado com o fungo apresentou um percentual ligeiramente maior de células CD25+ (2,7%) do que o grupo controle (1,97%), enquanto que na marcação para CD69



foi observado o inverso, com o grupo infectado apresentando 1,27% das células expressando CD69 contra 1,74% no grupo controle. No tempo intermediário (21º dia), os grupos inoculado com o fungo e controle, apresentaram níveis bem semelhantes de células CD4+ expressando CD25, 4,62% e 5,28% de células respectivamente, enquanto o percentual de expressão para CD69 no grupo dos inoculados com o fungo foi aproximadamente metade no grupo infectado (0,42%) quando comparado ao grupo controle (0,87%). Ao final do experimento, no 45º dia pós-inóculo, 2,6% das células do grupo inoculado com o fungo expressaram CD25, e no grupo controle, esse número foi de 3,79%. Em ambos os grupos não foi detectada a expressão de CD69 nesse tempo (Figura 17 C e E).

Nos animais imunossuprimidos inoculados com o isolado PL.T, observamos, nos primeiros 21 dias de infecção, uma diminuição considerável na expressão da molécula CD62L pelas células CD4+ dos animais infectados quando comparados ao grupo controle (em torno de 18,8 pontos percentuais para os dias 7 e 21 após o inóculo), não tendo sido possível porém detectar sua expressão no grupo inoculado com o fungo no 21º de infecção. Por outro lado, ao final do período de experimentação (45º dia), a expressão da molécula CD62L foi bem semelhante entre os dois grupos estudados, apresentando um percentual de 67,69% de linfócitos CD4+CD62L+ no grupo dos animais imunossuprimidos infectados com o isolado PL.T, e de 69,74% no grupo controle imunossuprimido (Figura 17 B).

Com relação à expressão da molécula CD25 pelas células CD4 dos animais imunossuprimidos inoculados com esse mesmo isolado, observamos, no 7º dia após o inóculo, que o grupo infectado apresentou 5,01% de células

CD4+CD25+, 4,13 pontos percentuais acima do que foi observado no grupo controle (0,88%). No 21º após a infecção, houve um aumento muito acentuado nos percentuais de marcação para CD25 em ambos os grupos, porém o grupo infectado apresentou um aumento de 38,36 pontos percentuais em relação ao grupo controle não infectado. No 45º dia após a infecção, ambos os grupos apresentaram percentuais baixos e semelhantes de células CD4+CD25+, 0,44% no grupo infectado com PL.T, e 0,75% no grupo controle (Figura 17D).

A expressão de CD69 foi semelhante a de CD25, atingindo seu máximo de expressão, tanto no grupo infectado como no grupo controle, no 21º dia após o inóculo. Neste caso, o grupo inoculado com o fungo apresentou uma marcação de 10,88 pontos percentuais a mais para células CD4+CD69+ (13,87%) do que o grupo controle (3,79%). Não foi possível a detecção de células expressando o marcador CD69 em ambos os grupos ao final do experimento (45º dia após o inóculo) (Figura 17F).

Nos camundongos imunocompetentes inoculados com o isolado PL.P observamos, um perfil inverso de expressão de CD62L pelas células CD4+ dos animais inoculados em relação ao grupo controle do que aquele observado com o isolado PL.T. No 7º dia após a inoculação, o grupo inoculado com o isolado PL.P apresentou um aumento de 8,28 pontos percentuais (60,43%) de células CD4+ expressando o marcador CD62L do que o grupo controle, cujo percentual de células CD4+CD62L+ perfazia um total de 52,15%. Nos demais pontos de estudo (21º e 45º dias), o grupo infectado passou a apresentar uma menor expressão de CD62L pelas células CD4+ do que o grupo controle. No 21º dia, esta diminuição foi de 17,79 pontos percentuais, chegando a 20 pontos percentuais 45 dias após o inóculo (Figura 17B).

No 7º dia após a infecção com o isolado PL.P observamos uma diminuição na expressão da molécula CD25 pelas células CD4+ do grupo infectado (2,37%), quando comparado aos percentuais observados no grupo controle (5,46%) (Figura 17D). Esse perfil se inverte nos dias 21 e 45 após o inóculo com esse mesmo isolado do fungo, onde as células CD4+CD25+ sofrem um aumento de 17,98 pontos percentuais em relação ao grupo controle no 21º dia, caindo para 2 pontos percentuais de aumento no dia 45 após o inóculo.

Com relação à molécula CD69 observamos, nos dias 7 e 21 pós-inóculo, uma expressão semelhante deste marcador de ativação pelas células CD4+ de ambos os grupos (inoculados com PL.P e controle) (Figura 17F). Por outro lado, ao final do experimento (45º dia), verificamos um maior percentual de células CD4+CD69+ no grupo inoculado (3,43%), do que no grupo controle (0,55%).

Os camundongos imunossuprimidos inoculados com o isolado PL.P apresentaram um perfil de expressão da molécula CD62L semelhante aquele apresentado pelos animais imunocompetentes inoculados com o mesmo isolado, sendo que, no último ponto de análise, 45º dia após o inóculo, o grupo infectado apresentava uma diminuição ainda mais acentuada na expressão de CD62L pelas células CD4+, quando comparado ao grupo controle (19,43% contra 71,76%, respectivamente), do que aquela observada nos animais imunocompetentes (Figura 17B).

No 7º dia após a inoculação, os percentuais de expressão dos marcadores CD25 e CD69 pelas células CD4+ foram de 5,53% e 3,18%, respectivamente. No grupo controle, CD25 e CD69 foram expressos em 3,08%

e 3,56% das células CD4+ (Figura 17 D e F). No tempo intermediário de observação, 21º dia pós-inóculo, os marcadores CD25 e CD69, no grupo dos camundongos inoculados com o fungo, foram expressos em 13,03% e 0,29% das células CD4+, respectivamente. No grupo controle a expressão dos mesmos marcadores foi semelhante ao observado no grupo infectado (14,74% e 0,23% das células). No 45º dia, o grupo inoculado com o fungo apresentou expressão de 7,35% e 0,62% dos marcadores CD25 e CD69 pelas células CD4+. Quanto ao grupo controle, a expressão de CD25 foi bem mais baixa que a do grupo infectado (0,86%), representando um aumento de cerca de 6,5 pontos percentuais na expressão deste marcador no grupo infectado. Não foram detectadas células CD4+CD69+ no grupo controle (Figura 17 D e F).

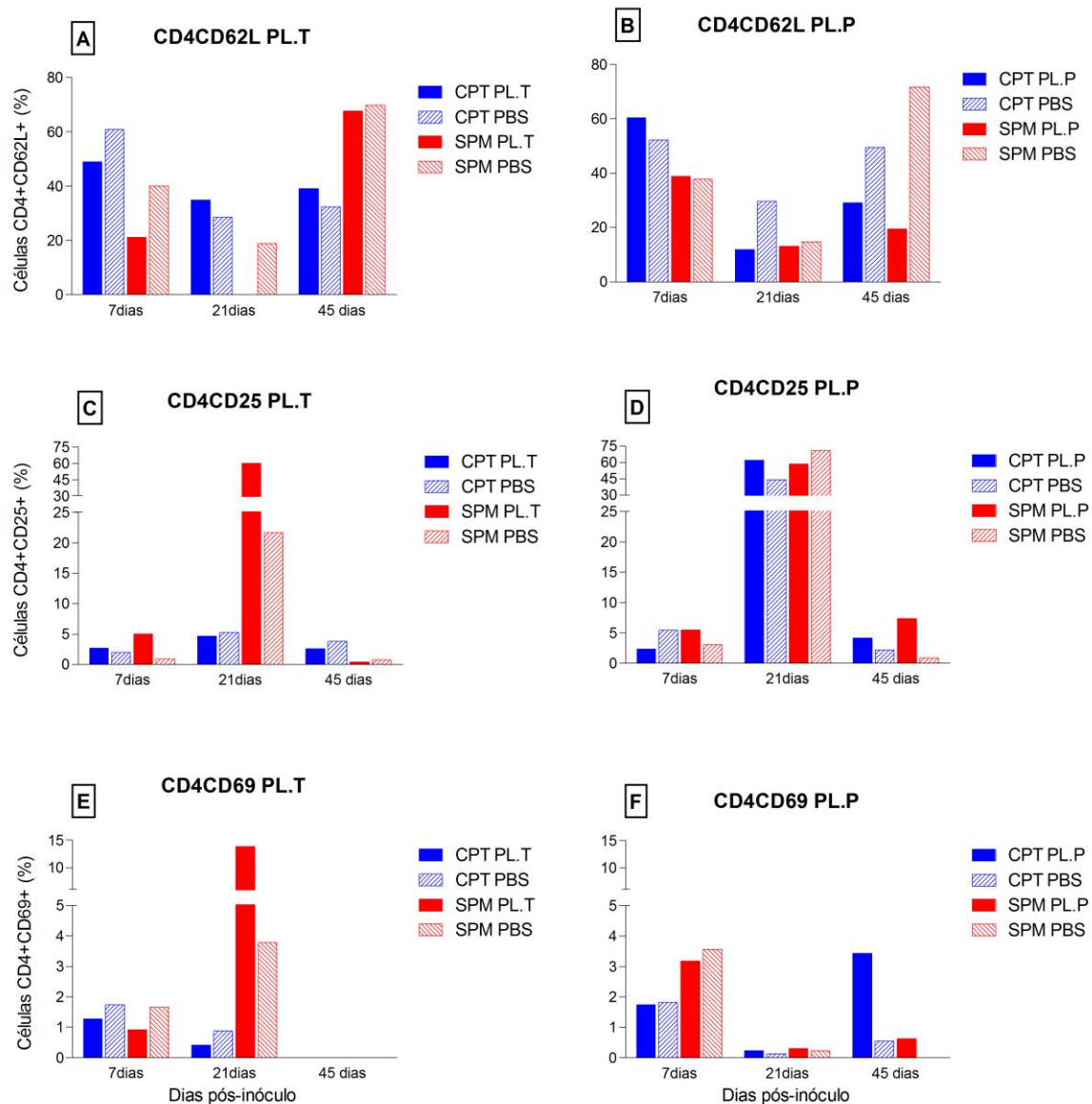


Figura 17. Percentual de marcadores de ativação e migração em células CD4+ esplênicas, de camundongos imunocompetentes (CPT) e imunossuprimidos (SPM) inoculados com *Paecilomyces lilacinus*, isolados PL.T (A, C e E) e PL.P (B, D e F) seus respectivos controles inoculados com PBS, nos dias 7, 21 e 45 após a inoculação.

5.8.2.2: Perfil da expressão de moléculas de ativação e migração celular em linfócitos CD8<sup>+</sup> de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com os isolados PL.T e PL.P e seus respectivos controles inoculados com PBS

A figura 18A, C e E demonstram os percentuais de marcação de células CD8<sup>+</sup> expressando os marcadores de ativação CD25 e CD69 e de migração celular, CD62L, nos animais infectados com o isolado PL.P e seus respectivos controles inoculados com PBS. Nossos dados indicam um comportamento de expressão da molécula CD62L nas células CD8 (Figura 18A) semelhante ao observado nas células CD4<sup>+</sup> (Figura 17A), com diminuição da expressão deste marcador no 7<sup>o</sup> dia após a infecção no grupo inoculado com o fungo (62,93%), em comparação com o grupo controle (73,26%). Nos tempos de 21 e 45 dias após a infecção houve uma tendência a equiparação dos percentuais de células CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> entre os dois grupos, inoculado e controle. No grupo inoculado com o fungo, 21 dias após o inóculo, o percentual de células CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> foi de 61,02%, decrescendo para 50,13% no 45<sup>o</sup> dia. No grupo controle esses percentuais foram de 55,89% no 21<sup>o</sup> dia, e 54,83% no 45<sup>o</sup> dia de experimento (Figura 18A).

Ao quantificarmos o marcador CD25, observamos no 7<sup>o</sup> dia após o inóculo, percentuais semelhantes de células CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nos grupos de camundongos inoculados com o isolado PL.T (2,11%) e controle (1,94%). No 21<sup>o</sup> dia os valores percentuais foram 1,36% para o grupo inoculado com o fungo e 0,81% para o grupo controle. Já no 45<sup>o</sup> dia pós-inóculo observamos

uma redução na expressão desse marcador no grupo PL.T (2,8%) quando comparado ao grupo controle (5,01%) (Figura 18C).

Em relação ao marcador de ativação CD69, no 7º dia após o inoculo obtivemos um percentual um pouco maior de células CD8+CD69+ no grupo infectado (2,09%), do que no grupo controle (1,54%). No 21º dia, esses valores diminuíram para 0,85% e 1,23% para os mesmos grupos, respectivamente. Ao fim do experimento, 45º dia, os valores foram praticamente nulos em ambos os grupos (Figura 18E).

Na figura 18 A, C e E podemos observar também o percentual de marcação das moléculas de ativação em células CD8+ de camundongos imunossuprimidos, inoculados com o isolado PL.T e seus respectivos controles não infectados.

Com relação à quantificação do marcador CD62L observamos um perfil semelhante ao observado nos animais imunocompetentes e nas células CD4+ após infecção com o isolado PL.T, ou seja, uma diminuição, neste caso mais acentuada, na expressão de CD62L pelas células CD8+ dos animais infectados (28,03%), em comparação ao grupo controle (58,94%). No 21º dia, não foi detectada a expressão deste marcador nas células CD8+ no grupo dos animais inoculados com o fungo, embora no grupo controle 35,72% das células CD8 expressassem CD62L. Ao final do experimento, no 45º dia, os percentuais de células CD8+CD62L+ foram semelhantes no grupo inoculado com o fungo (73,31%) e no grupo controle (78,56%) (Figura 18A).

No 7º dia após a inoculação, nos linfócitos CD8+ coletados do baço dos camundongos imunossuprimidos inoculados com o isolado PL.T e o grupo controle, foi observada a expressão de CD25 em 0,42% e 0,38% das células,

respectivamente. No 21º dia, não foi detectada a expressão do marcador CD25 no grupo dos animais inoculados com o fungo, por outro lado no grupo controle o percentual de células CD8+CD25+ foi de 1,79%. Ao final do período de experimentação (45º dia), o grupo inoculado com o fungo apresentava 0,38% de células CD8+ que expressavam o marcador CD25, enquanto no grupo controle esse percentual foi de 0,12%.

Com relação ao marcador CD69, na fase inicial da infecção (7º dia), foi verificado que o grupo inoculado com o fungo apresentou 2,63% de células CD8+CD69+, enquanto no grupo controle esse percentual foi de 2,27%. No 21º dia, esses percentuais foram de 6,57% e 8,85% para os mesmos grupos, respectivamente, diminuindo ao final do período observado, 45º dia, para 2,01% e 0,02% (Figura 18E).

Podemos observar, na Figura 18B, que nos camundongos inoculados com o isolado PL.P, o perfil de expressão da molécula CD62L nos linfócitos CD8+ foi muito semelhante ao observado nas células CD4+ dos animais inoculados com o mesmo isolado de *P. lilacinus* (Figura 17B). No 7º dia após a infecção observamos percentuais similares de células CD8+CD62L+ nos grupos infectado (71,92%) e controle (70,58%). A partir do 21º dia, as células CD8+ dos camundongos do grupo inoculado com o fungo sofreram uma redução na expressão desse marcador com relação ao grupo controle. No 21º dia após o inóculo com o isolado PL.P, 24,03% das células CD8+ dos camundongos infectados expressavam o marcado CD62L, contra 43,54% no grupo controle. No último dia de avaliação (45º dia), esses percentuais foram de 20,33% e 52,05% respectivamente (Figura 18B).



Os animais imunocompetentes infectados com o isolado PL.P apresentaram, durante todo o estudo, um percentual maior de células CD8+CD25+ do que o grupo controle (Figura 18D). No dia 7, a expressão do marcador de ativação CD25 nas células CD8+ do grupo infectado foi de 1,71% e de 0,51% no grupo controle. Embora tenhamos observado percentuais elevados desse marcador para ambos os grupo no 21º dia pós-inoculação (59,22% e 39,07% de positividade, respectivamente) o grupo infectado continuou apresentando maior expressão de CD25 do que o grupo controle. Ao final do experimento, 45º dia, o percentual de células CD8+CD25+ foi de 0,75% no grupo dos inoculados com o fungo e 0,13% no grupo controle.

No 7º dia pós-inoculo, foi observado que os valores percentuais para o marcador CD69 foram de 2,34% e 2,17% para os camundongos imunocompetentes inoculados com o fungo e o grupo controle, respectivamente. No 21º dia esses valores diminuíram para 0,74% e 0,38% para os mesmos grupos, respectivamente, diferentemente do observado para o 45º dia após a inoculação, cujos valores percentuais para esse marcador foram de 3,21% para os animais inoculados com o fungo, e 2,5% para o controle (Figura 18F).

Os resultados da quantificação dos marcadores de ativação nos linfócitos CD8+ coletados do baço dos camundongos imunossuprimidos inoculados com o isolado PL.P e com PBS, também estão demonstrados na figura 18B, D e F.

A imunossupressão não pareceu alterar o perfil de expressão da molécula CD62L observado nas células CD8 dos animais imunocompetentes. Novamente, nos dias 7 e 21 após o inóculo, observamos percentuais

semelhantes de células CD8+CD62L+ nos grupos infectado e controle. No tempo de observação mais tardio (45° dia), as células CD8+ dos animais infectados apresentaram uma marcante redução na expressão do marcador CD62L (11,26%), em comparação com o grupo controle (83,05%) (Figura 18A).

Ao contrário do que ocorreu com os animais imunocompetentes, no 7° dia após o inóculo, a imunossupressão parece diminuir a expressão de CD25 nos linfócitos T CD8+ dos animais infectados (0,3%), quando comparado ao grupo controle (2,51%). No 21° dia, o grupo inoculado com o fungo apresentou 50,58% de células CD8+CD25+, enquanto no grupo controle esse percentual foi de 57,98%. Quarenta e cinco dias após a infecção o grupo inoculado com o fungo apresentou 0,88% de positividade para o marcador CD25, enquanto o grupo controle não apresentou expressão detectável do mesmo nas células CD8+.

Com relação à expressão do marcador de ativação CD69, no 7° dia de infecção 5,78%, das células CD8+ do grupo inoculado com o isolado PL.P eram CD8+CD69+, enquanto no grupo controle observamos um percentual de 8,74%. No 21° dia, 0,86% das células CD8+ apresentavam marcação para CD69 no grupo infectado, enquanto que no grupo controle, esse percentual foi de 0,55%. No 45° dia após a inoculação, as células dos camundongos do grupo inoculado com o fungo apresentaram um aumento na expressão de CD69 (2,84%), quando comparado ao grupo controle (0,03%).

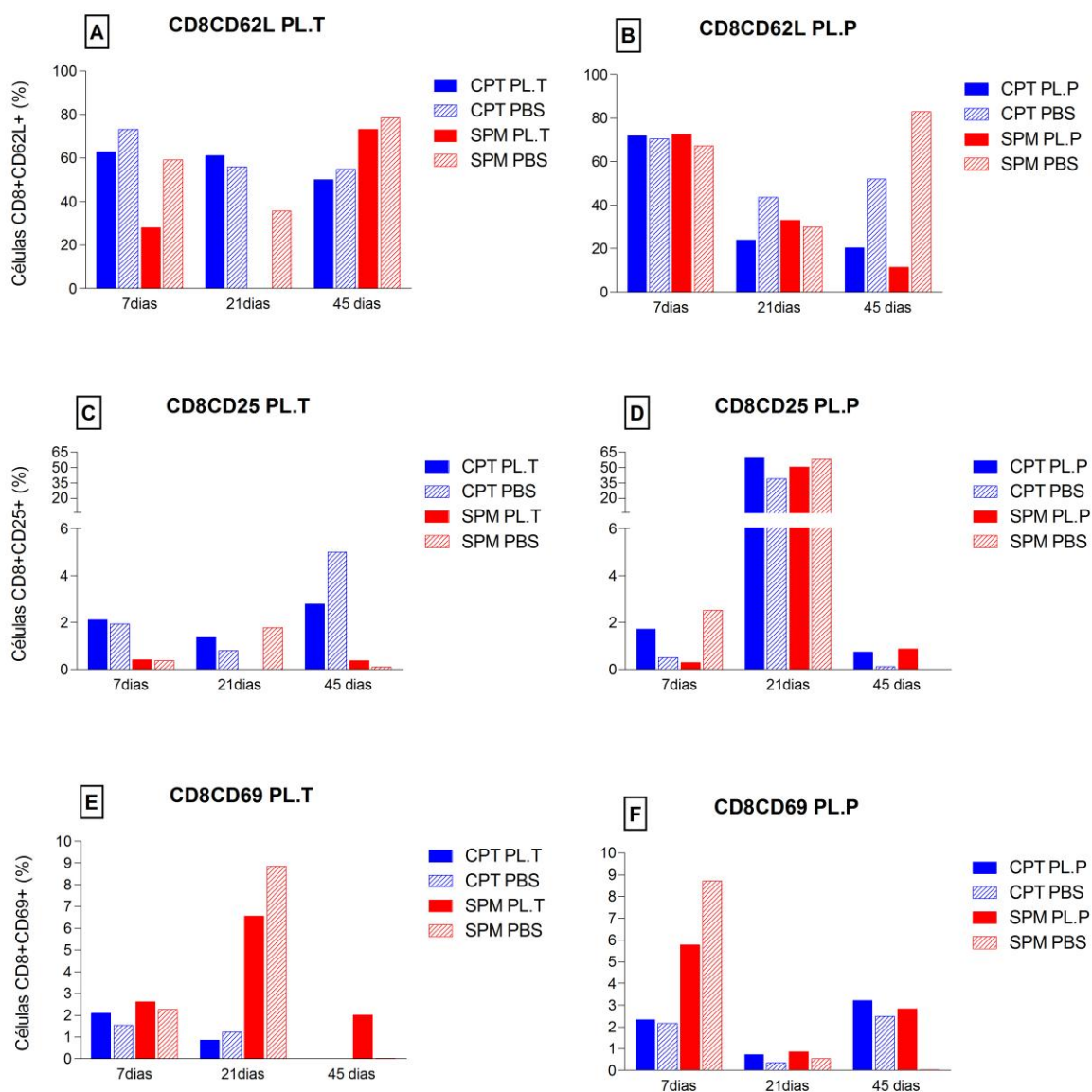


Figura 18. Percentual de marcadores de ativação e migração em células CD8+ esplênicas, de camundongos imunocompetentes (CPT) e imunossuprimidos (SPM) inoculados com *Paecilomyces lilacinus*, isolados PL.T (A, C e E) e PL.P (B, D e F) seus respectivos controles inoculados com PBS, nos dias 7, 21 e 45 após a inoculação.

## 5.9. RESPOSTA IMUNE HUMORAL

A análise da resposta imune humoral dos camundongos inoculados foi realizada utilizando as técnicas de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e citometria de fluxo.

A técnica RIFI demonstrou serem positivos para IgG específica anti-*P.lilacinus* os soros dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com os isolados de *P. lilacinus* nas diluições utilizadas (1:20, 1:40, 1:80 e 1:160), em todos os diferentes tempos de observação pós-inoculação (7, 21, 45 dias). Os animais controles, inoculados com PBS, não apresentaram reação sorológica positiva. A intensidade de fluorescência observada foi inversamente proporcional à diluição do soro dos camundongos. Na figura 19 estão demonstrados os resultados da RIFI com os soros coletados aos 21 dias após a inoculação.

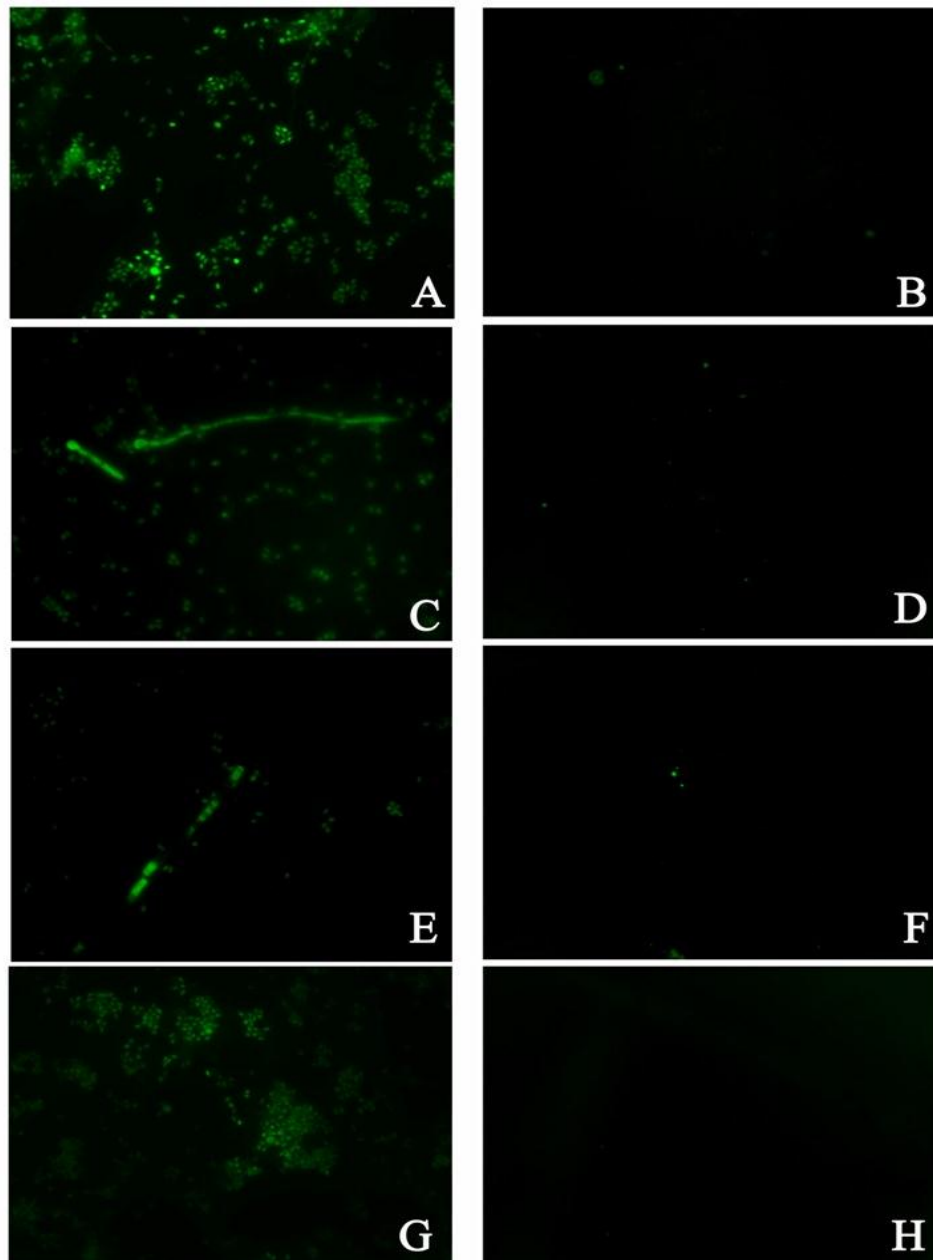


Figura 19. Reatividade do soro de camundongos ao fungo *P. lilacinus*: **A)** Soro de camundongo imunossuprimido inoculado com o isolado PL.P, na diluição de 1:20, **B)** Soro de camundongo imunossuprimido inoculado com PBS (controle), na diluição de 1:20; **C)** Soro de camundongo imunossuprimido inoculado com o isolado PL.T, na diluição de 1:40; **D)** Soro de camundongo imunossuprimido controle, na diluição de 1:40; **E)** Soro de camundongo imunocompetente inoculado com o isolado PL.T, na diluição de 1:80; **F)** Soro de camundongo imunocompetente controle, na diluição de 1:80; **G)** Soro de camundongo imunocompetente inoculado com o isolado PL.P, na diluição de 1:160; **H)** Soro de camundongo imunocompetente controle, na diluição de 1:160.

Pela primeira vez na Micologia, foi possível detectar positividade a IgG nos soros dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos, inoculados com ambos os isolados de *P. lilacinus*, nas diluições de 1:25 até 1:500 por meio da técnica de citometria de fluxo, considerada de alta sensibilidade. Com relação ao conjugado utilizado, a titulação de 1:400 foi a escolhida por apresentar menor percentagem de fluorescência nos grupos controle. Na Figura 20 estão demonstrados os gráficos de citometria de fluxo para detecção de IgG anti-*P.lilacinus*, no soro dos camundongos dos grupos imunocompetente e imunossuprimido, após 21 dias de inoculação com o fungo e com PBS titulados em 1:500. A figura 20A representa o tamanho e a granulosidade dos conídios. Um total de 20.000 eventos foi adquirido dentro do *gate*. A intensidade de fluorescência foi estabelecida através de uma região selecionada a partir de uma amostra contendo conídios não marcados. As figuras 20B e 20C são relativas aos soros de camundongos imunocompetentes, inoculados com PBS e com o fungo, respectivamente. Podemos observar um percentual de 0,07% de células positivas no grupo controle, contra 76,78% de células positivas no grupo inoculado com o fungo. Na figura 20D e E observamos os percentuais de marcação obtidos a partir do soro dos camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS e com o fungo, respectivamente. O grupo controle apresentou 0,10% de positividade enquanto o grupo dos camundongos inoculados com o fungo a positividade foi de 72,68%.

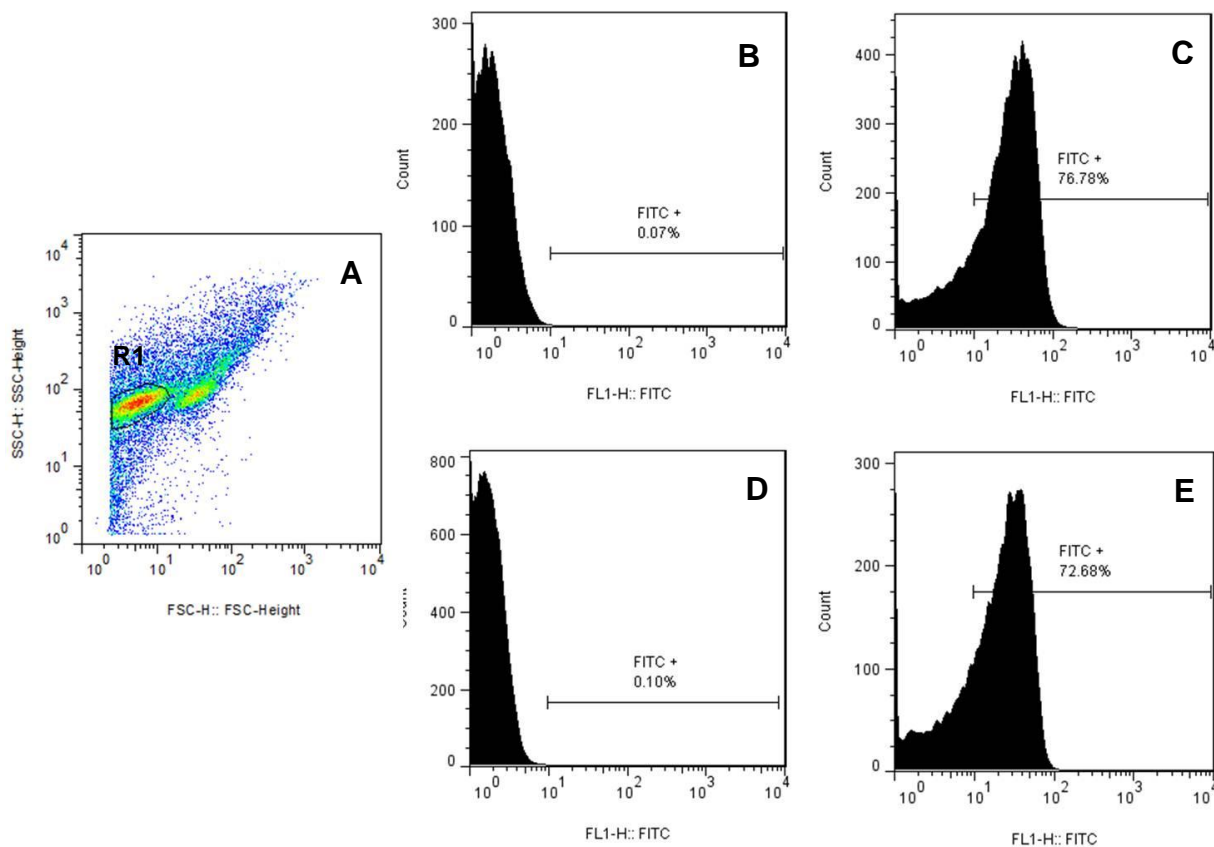


Figura 20. Gráficos representativos de citometria de fluxo. **(A)** Tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) dos conídios. Um total de 20.000 eventos foi adquirido dentro do *gate* de conídios. **(B)** Percentuais de marcação de IgG no soro dos camundongos imunocompetentes inoculados com PBS (0,07%), **(C)** Percentuais de marcação de IgG no soro dos camundongos imunocompetentes inoculados *P. lilacinus* (76,78%), na diluição 1:500. **(D)** Percentuais de marcação de IgG no soro dos camundongos imunossuprimidos inoculados com PBS (0,10%), **(E)** Percentuais de marcação de IgG no soro dos camundongos imunossuprimidos inoculados com *P. lilacinus* (72,68%), na diluição 1:500.

## 6. DISCUSSÃO

O advento de terapias imunossupressoras prolongadas, os novos e mais agressivos regimes de imunossupressão e o aumento da sobrevivência de pacientes na terapia intensiva, são alguns dos fatores diretamente relacionados com o seu estado imunológico (Antas *et al.*, 2012), que podem criar um ambiente propício para a invasão, colonização e disseminação de fungos em diversos sítios do hospedeiro. As infecções fúngicas invasivas constituem a maior ameaça para os hospedeiros imunossuprimidos, especialmente nos portadores de leucemias, linfomas, receptores de transplantes e neutropênicos (Antachopoulos & Roilides, 2005).

*Paecilomyces lilacinus* é considerado um fungo oportunista humano, emergente, com aparente tropismo pelas estruturas oculares, sendo capaz de provocar ceratites e endoftalmites que podem resultar na enucleação do globo ocular. Além das formas oculares, o fungo pode apresentar as formas cutâneas e subcutâneas, que vão de lesões locais a disseminadas, bursites, sinusites, vaginites e outras formas (Pastor & Guarro, 2006).

No presente estudo, foram analisados dois isolados de *P. lilacinus* provenientes de pacientes com lesões cutânea e subcutânea. A avaliação morfológica dos isolados revelou que ambos apresentaram características típicas da espécie, como colônias inicialmente brancas, assumindo coloração violácea, com longos conidióforos verticilados sustentando fiáides em forma de garrafa com delicado pescoço e porção basal dilatada (Luangsa-ard *et al.*, 2011). Porém, ligeiras diferenças de coloração entre as colônias e velocidade



de esporulação foram observadas. A coloração das colônias do isolado proveniente de lesão cutânea (PL.P) variou de rosa a violácea, enquanto nas colônias do isolado proveniente de lesão subcutânea na região da tíbia (PL.T), essa coloração manteve-se em tons de violáceo acinzentado. O isolado PL.P foi o que apresentou uma produção de conídios precoce e em maior quantidade quando comparado ao isolado PL.T. Esse comportamento biológico poderia conferir ao isolado PL.P alguma vantagem no processo infeccioso em relação ao isolado PL.T, uma vez que a esporulação adventícia, uma das características desse fungo (Perfect & Shell, 1996; Liu *et al.*, 1998), permite a disseminação dos pequenos conídios pelo corpo do hospedeiro. Outras diferenças fenotípicas nesse fungo, além de coloração das colônias e quantidade de esporos formados, já foram descritas por Mikami *et al.* (1989), como a produção de sinêmios e micotoxinas (paecilotoxinas) por isolados entomopatogênicos.

A utilização do modelo experimental murino nos estudos de virulência têm disponibilizado dados sobre a capacidade invasiva e a proliferação de *P. lilacinus* nos órgãos dos animais, a partir da observação dos sinais clínicos e resposta imune do hospedeiro, histopatologia e reisolamento de células fúngicas viáveis de diferentes órgãos durante a infecção (Pujol *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2007, 2011).

Em nosso estudo, utilizamos o modelo murino C57BL/6, imunocompetente e imunossuprimido, a fim de obter dados sobre virulência e resposta imunológica dos camundongos frente aos isolados de *P. lilacinus*, obtidos de formas clínicas de hialohifomicose. Como descrito, anteriormente, por Brito *et al.* (2011), foi possível comprovar, no presente trabalho, a ação

imunossupressora do fosfato dissódico de dexametasona, por meio da visualização macroscópica e pesagem dos baços dos camundongos imunossuprimidos, os quais apresentaram atrofia do órgão. Além disso, a análise citofluorimétrica das células do baço demonstrou alterações morfológicas e sugestiva morte celular, assim como observado por Miller & Schaefer (2007), estudando o modelo C57BL/6 imunossuprimido com dexametasona infectado com *Cryptosporidium parvum*.

Para a comparação da virulência entre os isolados, os animais inoculados aqui utilizados foram avaliados com relação aos, sinais clínicos, sobrevivência, índice esplênico e reisolamento de células fúngicas viáveis no baço. Nesse contexto, a maioria dos camundongos imunocompetentes inoculados com ambos os isolados se manteve ativa ao longo de todo o período observado e não apresentou perda de peso ou quaisquer sinais clínicos da doença, à exceção de um camundongo imunocompetente inoculado com o isolado PL.T que apresentou ceratite no olho direito no 45º dia de infecção, sugerindo a relação entre o sítio de inoculação e a manifestação clínica da hialohifomicose, conforme descrito por Agrawal *et al.* (1979). No estudo publicado por esses autores, ao inocularem coelhos com um isolado de *P. lilacinus* proveniente de lesão ocular de paciente humano, observaram que apenas o olho em que recebeu o inóculo fúngico desenvolveu lesões oftalmológicas, diferentemente do que foi observado nos animais do grupo controle, inoculado pela mesma via com PBS, e sem manifestação clínica.

Quanto às variações de peso dos camundongos aqui estudados, nossos resultados apontaram, em média, que o grupo dos imunocompetentes inoculados com o fungo e com PBS, não apresentou diferenças significativas

de ganho de peso. Esses resultados divergem dos descritos por Brito *et al.* (2011), que relataram uma ligeira perda de peso nos camundongos BALB/c imunocompetentes inoculados com um isolado de origem humana. Com relação aos camundongos imunossuprimidos, a perda de peso naqueles inoculados com o isolado PL.P foi maior que nos inoculados com o isolado PL.T. Nossos dados, com relação aos animais imunossuprimidos, estão de acordo com os resultados obtidos por Brito *et al.* (2011), pois verificamos nos camundongos tratados com dexametasona, inoculados com ambos os isolados e PBS, perda de peso, apatia e queda de pêlo. Além disso, os camundongos inoculados com os isolados fúngicos apresentaram lesões na base da cauda a partir do 21<sup>o</sup> dia de infecção. Ainda no grupo dos camundongos imunossuprimidos, um dos animais, inoculado com o isolado PL.P apresentou múltiplas lesões dermatológicas no dorso e um nódulo na região abdominal. Curiosamente, esse isolado, proveniente de uma lesão cutânea, reproduziu, no modelo experimental, quadro semelhante ao apresentado no paciente humano.

Na avaliação da sobrevivência dos camundongos, no presente estudo, nos animais imunocompetentes, inoculados com o isolado PL.P houve sobrevivência de 90% dos camundongos enquanto que os inoculados com o isolado PL.T 100% de sobrevivência foi observado. Nos animais imunossuprimidos, onde taxas baixas de sobrevivência já eram as esperadas devido a imunossupressão, os animais inoculados com o isolado PL.P não sobreviveram ao final do experimento (45<sup>o</sup> dia) e aqueles inoculados com o isolado PL.T apresentaram 20% de sobrevivência. Esses dados diferem daqueles obtidos por Brito *et al.* (2011), nos quais os camundongos imunocompetentes inoculados com o isolado proveniente de lesão humana

utilizado, não causou morte entre os animais ao fim do experimento (45 dias pós-inóculo). Entretanto, os mesmos autores verificaram que nos animais imunossuprimidos, inoculados com o mesmo isolado, a taxa de sobrevivência foi de 0%, semelhante ao encontrado no nosso trabalho para o isolado PL.P.

Ao exame das cavidades torácica e abdominal, durante a necropsia dos animais, não constatamos quaisquer alterações nos órgãos dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos que pudessem ser atribuídas ao fungo, com exceção da observação da esplenomegalia e da atrofia do baço nos respectivos grupos, corroborando os achados de Gordon (1984), que após inocular um isolado de *P. lilacinus* proveniente de *Dasypus novemcinctus* (tatu) em camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos, não encontrou lesões nos diferentes órgãos, exceto um abscesso na parede estomacal de um dos camundongos imunossuprimidos. Por outro lado, os resultados obtidos por Hubálek & Hornich (1977), foram diferentes dos encontrados em nosso estudo, uma vez que os autores demonstraram que camundongos imunocompetentes inoculados, intraperitonealmente, com um isolado de *P. lilacinus*, proveniente da plumagem de *Passer domesticus* (pardal), apresentaram lesões no peritônio, no fígado e no baço dos animais aos 55 dias após a inoculação. No experimento dos autores, acima citados, temos de levar em consideração o tamanho do inóculo, que foi 500 vezes maior que o por nós utilizado.

Em relação à busca por estruturas fúngicas ou lesões histológicas ao exame histopatológico realizado em nosso trabalho, não foram observadas alterações nos tecidos hepático e pulmonar dos camundongos imunocompetentes inoculados com o isolado PL.T, nem mesmo estruturas semelhantes a fungo. Nossos dados divergem dos resultados obtidos por

Hubálek & Hornich (1977), que, em infecção experimental com *P. lilacinus*, encontraram no tecido hepático de camundongos imunocompetentes, grande número de conídios e hifas. Brito *et al.* (2011), no entanto, relataram ter encontrado raros conídios no tecido de camundongos imunocompetentes. Quanto aos camundongos imunossuprimidos, inoculados com esse mesmo isolado (PL.T), verificamos alterações histológicas no tecido hepático ou estruturas fúngicas semelhantes a conídios. Observamos também essas estruturas no interior de macrófagos no tecido pulmonar. Nossos dados divergem de Brito *et al.* (2011), cuja análise histopatológica de fígado, baço, pulmão e rim de camundongos BALB/c imunossuprimidos não revelou quaisquer lesões após inoculação dos animais com o isolado de origem humana. A explicação para essa divergência pode estar na linhagem do camundongo utilizada por nós (C57BL/6), uma vez que, não sabemos se as diferentes linhagens, BALB/c e C57BL/6, respondem de forma semelhante à dexametasona, tornando-as mais ou menos susceptíveis ao fungo.

A observação das lâminas de tecido dos camundongos inoculados com o isolado PL.P, nos permitiu verificar alterações histológicas no tecido pulmonar, com abundante quantidade de estruturas fúngicas no tecido dos camundongos imunossuprimidos e raras nos imunocompetentes. Além disso, ao exame microscópico do nódulo de pele retirado da região abdominal de um dos animais imunossuprimidos, foi constatada a presença de inúmeras estruturas semelhantes a conídios e fragmentos de hifas. Nesse contexto, o isolado PL.P mostrou uma maior e mais precoce esporulação, e essas características, provavelmente, favoreceram a invasão do tecido do hospedeiro por este isolado, inclusive dos imunocompetentes, em comparação ao isolado

PL.T. Ainda de acordo com Brito *et al.* (2011), o fato de os camundongos imunocompetentes inoculados com o isolado PL.T não terem apresentado alterações histológicas, e dessas terem sido raras nos camundongos não tratados com dexametasona inoculados com o isolado PL.P, sugere que o sistema imunológico desses animais foi eficiente em conter as células fúngicas. Sabemos que a formação de estruturas adventícias pode facilitar a disseminação e invasão do fungo no hospedeiro (Liu *et al.*, 1998; Pastor & Guarro, 2006). Entretanto, a condição imunológica normal do hospedeiro é capaz de conter o fungo através da formação de granulomas, conforme observado no nosso trabalho e corroborado pelos resultados de outros autores (Hubálek & Hornich, 1977; Brito *et al.*, 2011).

Os resultados de índice esplênico dos animais imunocompetentes avaliados no presente estudo apontaram valores decrescentes nos camundongos inoculados com ambos os isolados. No início da infecção, o baço dos camundongos inoculados com o fungo apresentou acentuada esplenomegalia, provavelmente em virtude da intensa linfoproliferação estimulada pela presença do patógeno. Ao longo desse período, o volume do órgão foi se aproximando, gradativamente, do volume dos baços dos camundongos controle, porém o mesmo não se igualou, indicando, possivelmente, que o sistema imunológico dos camundongos inoculados com o fungo foi capaz de controlar a infecção. Contudo, as médias desse índice para o isolado PL.T foram, significativamente, maiores que as médias para o isolado PL.P. Esses resultados divergem um pouco dos resultados descritos por Brito *et al.* (2011), nos quais os valores do índice esplênico também foram decrescentes ao longo do período observado, porém se igualaram aos valores

do grupo controle, ao fim do experimento (35 dias), principalmente para o isolado de origem humana que é o mesmo isolado PL.T utilizado no presente estudo. A partir desses dados, poderíamos especular acerca da diferença da eficiência do sistema imune do modelo murino experimental utilizado em nosso estudo, frente à infecção com *P. lilacinus*, quando comparado ao modelo BALB/c.

O último critério para a avaliação da virulência dos isolados de *P. lilacinus* do presente estudo foi a recuperação de células fúngicas viáveis do baço dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados. Em ambos os grupos, as médias de unidades formadoras de colônia reisoladas foram estatisticamente maiores para o isolado PL.P. O pico de recuperação de células do fungo ocorreu aos 7 dias após a infecção, decrescendo gradualmente até o final do período de observação. Não foi possível a recuperação de células do isolado PL.T no 21º dia, e por isso, consideramos duas hipóteses: a) fatores inerentes aos camundongos submetidos à eutanásia nesse ponto permitiram o completo *clearance* da infecção; b) problemas no cultivo dessas células podem ter impedido o reisolamento do fungo. De uma forma geral, esses resultados corroboram os de Brito *et al.* (2011), que conseguiram reisolar células fúngicas do baço, pulmão e fígado de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos, inoculados com *P. lilacinus*, a partir do 7º dia de infecção, também decrescendo gradativamente até o 35º dia.

Os resultados obtidos em nosso estudo, utilizando dois isolados de origem humana, permitiram avaliar diferenças na virulência entre eles, da mesma forma que Brito *et al.* (2011), que compararam isolados provenientes

de forma clínica da hialohifomicose e ambiental. Nossos dados reforçam a ideia de que diferenças fenotípicas podem promover uma maior adaptação do fungo ao ambiente inóspito e permitir que ele se torne mais invasivo. O isolado PL.P, proveniente de lesão cutânea, foi considerado ser o mais virulento, pois provocou a morte de 10% dos camundongos imunocompetentes ao final do período de observação (45 dias), causou alterações histológicas no tecido pulmonar e hepático com a presença de estruturas fúngicas e maior quantidade de células do fungo recuperadas do baço, quando comparado ao isolado PL.T. Adicionalmente, os animais imunossuprimidos inoculados com o isolado PL.P apresentaram lesões dermatológicas, semelhantes as do hospedeiro humano do qual foi isolado, além de nódulo subcutâneo, onde foi possível reisolar o fungo e observar microscopicamente abundantes estruturas fúngicas semelhantes a conídios e fragmentos de hifas.

Devemos considerar, no entanto, que não apenas os fatores de virulência do fungo podem influenciar no curso da doença, mas também as condições do hospedeiro (Casadevall & Pirofski, 2000). No ambiente da imunossupressão, o modelo murino por nós estudado, permitiu comprovar essa afirmação, uma vez que foram maiores as alterações histológicas observadas, os sinais clínicos da doença e a quantidade de fungos recuperados do baço.

A despeito de alguns trabalhos experimentais com *P. lilacinus* atribuírem a esse fungo uma baixa virulência, e afirmarem ser necessário inóculos altos e imunossupressão para reproduzir a infecção (Pastor & Guarro, 2006), e conseqüentemente diversos autores utilizarem inóculos altos para infectar camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos (Hubálek & Hornich, 1977; Pujol *et al.*, 2002), tal afirmação foi questionada, recentemente, por nosso



grupo (Brito *et al.*, 2011), já que, utilizando um inóculo de  $4,4 \times 10^4$  conídios por animal, considerado baixo, foi possível comprovar a infecção em camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos, através de achados histopatológicos e da recuperação de células fúngicas de diversos órgãos.

No presente estudo, utilizamos um modelo experimental descrito como resistente a infecção por *Leishmania major* (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Camundongos da linhagem C57BL/6, imunocompetentes e imunossuprimidos, estudados aqui, foram inoculados com  $10^5$  conídios, por animal, e apresentaram resultados semelhantes aos descritos por Brito *et al.* (2011), no que concerne ao estabelecimento da infecção. Além de estudarmos o isolado PL.P, proveniente de lesão cutânea, utilizamos o isolado PL.T, proveniente de abscesso subcutâneo na região da tíbia, sendo o mesmo isolado estudado por Brito *et al.* (2011). Apesar de analisarmos a virulência desse isolado para BALB/c e C57BL/6 em experimentos e épocas diferentes, os resultados encontrados, em geral, foram similares para os grupos de camundongos estudados, porém algumas divergências foram observadas nos animais imunocompetentes inoculados com o isolado PL.T, como: a) ganho de peso; b) ausências de estruturas fúngicas no tecido; c) menor quantidade de células fúngicas viáveis recuperadas do baço. Esses resultados podem sugerir que o modelo C57BL/6 foi mais resistente ao isolado PL.T, quando comparado ao modelo BALB/c. Porém novos ensaios, ocorrendo paralelamente, devem ser realizados para a confirmação dessa hipótese.

Em 1987, Sthephan & Al-Din demonstraram, *in vitro*, que a temperatura ótima de crescimento e esporulação de *P. lilacinus* varia entre 20°C a 25°C, podendo chegar até 30°C. É possível que a temperatura do hospedeiro tenha

alguma relação com as manifestações clínicas da hialohifomicose causada por esse fungo, tendo em vista seu evidente tropismo pelas estruturas oculares e pele. Os olhos, assim como outros órgãos (cérebro, testículos, ovários), constituem um ambiente propício ao desenvolvimento do fenômeno denominado “privilegio imune”, suprimindo respostas inflamatórias locais, permitindo que as infecções se estabeleçam com mais facilidade (Mellor & Munn 2008). Os camundongos imunocompetentes, modelos em nosso estudo, provaram que, na ausência de quaisquer perturbações, o sistema imune promove uma resposta eficaz que impede o desenvolvimento da hialohifomicose provocada por *P. lilacinus* nesses sítios. Nesse trabalho, houve apenas uma exceção no grupo dos camundongos imunocompetentes, que desenvolveu ceratite no olho direito, porém, acreditamos que algum fator intrínseco a esse animal possa ter favorecido o curso da doença. Ao contrário do ocorrido com os camundongos imunocompetentes, os imunossuprimidos apresentaram lesões na base da cauda, lesões cutâneas e nódulo repletos de estruturas fúngicas. Esses dados são importantes para demonstrar que o funcionamento do sistema imunológico, com todos os seus mecanismos e engrenagens, é crucial para determinar o curso das interações entre parasito e hospedeiro.

Em nossa análise do perfil imunológico dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos determinamos, primeiramente, a quantificação do número de esplenócitos dos animais ao longo do período de observação (45 dias). De acordo com Diasio & LoBuglio (1996), os mecanismos de ação dos corticosteróides podem causar a inibição da proliferação de células T e, conseqüentemente, da imunidade humoral T

dependente (via células  $T_H$ ), e também a expressão dos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$ , que, juntas, são capazes de reverter a inibição da linfoproliferação provocada pelo fármaco. Nossos resultados comprovam claramente uma ação imunossupressora da dexametasona, uma vez que, os camundongos imunossuprimidos apresentaram um número significativamente muito baixo de esplenócitos, ainda menor naqueles inoculados com ambos os isolados fúngicos, especialmente na fase inicial da infecção, quando comparado aos animais dos grupos imunocompetentes. Esses dados corroboram os resultados obtidos por Brandão (1991), em que, estudando a associação da dexametasona à infecção experimental de *Candida albicans* em camundongos, observou-se que os efeitos imunossupressores do fármaco e da infecção sistêmica se somavam, e que os animais tratados com a dexametasona e infectados apresentaram acentuada depleção linfocitária. Ao final do período de observação, no nosso estudo, talvez em virtude da diminuição de células fúngicas no baço, e com a provável liberação de antígenos circulantes, nossos camundongos imunossuprimidos inoculados com o fungo apresentaram um número maior de esplenócitos, quando comparados ao seu controle, inoculado com PBS.

Alguns autores apontam a ação da dexametasona como capaz de interferir na expansão clonal e diferenciação tanto de células T CD4+, quanto de T CD8+ (Diasio & LoBuglio, 1996). A base para essa afirmação é a de que a inibição da expressão de IL-2 interferiria na proliferação das células T de uma maneira geral. No entanto, Zhang & Bevan (2011) afirmam que IL-12 é a citocina envolvida na diferenciação de células T CD8+, enquanto IL-2, mesmo definida como sendo um fator de crescimento de células T, predomina em

células T CD4+, sendo muito baixa a sua expressão nas T CD8+. Nesse contexto, comprovamos em nosso estudo a possível ação da dexametasona sobre a produção de IL-2, e assim seu papel na expansão clonal dos linfócitos, como sendo um fator restrito às células T CD4+. Nos camundongos imunossuprimidos inoculados com ambos os isolados de *P. lilacinus*, bem como nos controles inoculados com PBS, durante todo o período de experimentação, observamos um predomínio das células T CD8+ sobre as T CD4+. Nos grupos imunocompetentes, como descrito na literatura, a expressão de células T CD4+ foi maior que a T CD8+.

Ainda com relação ao fenótipo das células respondedoras, o predomínio de linfócitos T CD8+ em relação aos T CD4+ nos camundongos imunossuprimidos com dexametasona observado em nosso estudo, assemelha-se aos resultados de Miller & Schaefer (2007). Uma das possíveis explicações sugeridas pelos autores é a de que as populações de células T CD8+ sejam resistentes aos efeitos da dexametasona, e assim continuem a proliferar, enquanto os outros linfócitos entrariam em apoptose. Os autores concluem o estudo afirmando que a imunossupressão com dexametasona é um complexo que associa a depleção de linfócitos T CD4+ ao aumento exponencial do número de neutrófilos maduros e gradual aumento dos linfócitos T CD8+.

Após o reconhecimento de seu antígeno específico, os linfócitos T sofrem um processo de ativação e diferenciação relacionado com a queda ou o aumento de expressão de várias moléculas. Como exemplo podemos citar os 3 marcadores avaliados no presente trabalho, CD69, CD25 e CD62L ou L-selectina. O aumento da expressão de CD69 é um dos eventos iniciais da

ativação de linfócitos após a estimulação pela presença do patógeno (Caruso *et al.*, 1997; Starska *et al.*, 2011). Apesar de seu ligante ser ainda desconhecido, sabe-se que a molécula CD69 é uma glicoproteína homodimérica de membrana, de aproximadamente 35kDa e que possui um grande domínio citoplasmático envolvido na transdução de sinais de ativação. Mais tardiamente, a ativação dos linfócitos pode ser também sinalizada pela expressão do marcador CD25, uma glicoproteína de membrana de 55kDa, também conhecida como a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2. Esse marcador é expresso nos timócitos e progenitores das linhagens T e B, e em linfócitos maduros ativados (Caruso *et al.*, 1997).

A molécula CD62L ou L-selectina, é expressa na superfície de linfócitos T imaturos. Após o reconhecimento antigênico e ativação as células perdem a expressão deste marcador, permitindo assim que as mesmas circulem pelo organismo a fim de exercer suas funções efetoras no sítio da infecção (Grailer *et al.*, 2009). Por outro lado, sua expressão não só está relacionada ao tráfego e *homing* de linfócitos para os órgãos linfóides, como também com a memória celular. Trabalhos pioneiros do grupo de Antônio Lanzavechia (Rivino *et al.*, 2004; Lanzavecchia & Salusto, 2005) inicialmente mostraram que a perda gradativa desse marcador seria um indicativo da geração de células de memória efetora ( $T_{EM}$ ), que residem em órgãos não linfóides e circulam pelo organismo. Nesse contexto, devemos considerar que, baseados na expressão *high* e *low* de CD62L, associada à expressão do receptor de quimiocina CCR7, as células de memória são subdivididas em memória central ( $T_{CM}$  - CD62L<sup>hi</sup>CCR7<sup>+</sup>), circulantes entre os órgãos linfóides e de longa duração, e memória efetora ( $T_{EM}$  - CD62L<sup>lo</sup>CCR7<sup>-</sup>), residentes dos tecidos periféricos e de

curta duração após a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Kedzierska *et al.*, 2006; Lefrançois, 2006). As células T<sub>EM</sub> podem ainda ser classificadas em terminalmente diferenciadas, efêmeras e residentes nos tecidos periféricos (Lefrançois, 2006). Unsoerd & Pircher (2005) propõem ainda, uma terceira população de células de memória, denominada “memória intermediária”, constituídas por linfócitos que expressam CCR7 na ausência de CD62L (CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), e concluem seu trabalho apontando a maior frequência desse fenótipo também em linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Contudo, como nosso estudo baseou-se apenas na expressão do marcador CD62L, sem associá-lo à expressão de CCR7, nos permitindo apenas avaliar o grau de diferenciação dessas células em função do tempo e de sua capacidade de migrar ou não para órgãos linfóides secundários como o baço e linfonodos.

Avaliando conjuntamente a expressão desses marcadores nos animais imunocompetentes inoculados com dois diferentes isolados de *P. lilacinus* fomos capazes de observar padrões distintos no que se refere à ativação celular.

As células CD4<sup>+</sup> dos animais inoculados com o isolado PL.T apresentaram uma diminuição na expressão da molécula CD62L, acompanhado de um aumento na expressão de CD25 no 7º dia após o inóculo, quando comparados aos grupos controles, inoculados com PBS, sendo que esse perfil se inverteu nos dias 21 e 45. Por outro lado, não fomos capazes de detectar aumento na expressão de CD69 em nenhum dos pontos de estudo. Tomando como fundamento que a expressão de CD69 é um evento precoce da ativação celular e unindo esse dado as alterações já citadas na expressão de CD25 e CD62L podemos inferir que, durante a infecção com esse isolado, a

ativação celular ocorre precocemente, em até 7 dias após o inóculo. É possível, que nos dias 21 e 45, as células estejam retornando ao baço como células de memória central, já que aumentam a expressão de CD62L e perdem a expressão de CD25.

Por outro lado, diminuição da expressão de CD62L só pôde ser observada nas células CD4+ dos animais imunocompetentes inoculados com o isolado PL.P, a partir do 21° dia, permanecendo inferior aos valores encontrados no grupo controle ainda do 45° dia após a infecção. Paralelamente, a expressão de CD25 também só aumenta a partir do dia 21, quando atinge 17,98 pontos percentuais acima do controle, sofrendo uma pequena queda na expressão no dia 45, mas ainda assim com percentuais superiores ao grupo controle. A expressão de CD69 aumenta a partir do 21° dia de infecção, apresentando o maior aumento de expressão com relação ao grupo controle no 45° dia. Esses dados apontam para uma ativação mais tardia das células CD4+ dos animais inoculados com o isolado PL.P, em comparação com o isolado PL.T. Essa ativação mais tardia das células CD4+ pode ser um dos mecanismos responsáveis pela maior virulência do isolado PL.P, observada nos dados clínicos já descritos anteriormente, como a maior recuperação de células fúngicas e maior mortalidade.

Nos animais imunossuprimidos com dexametasona inoculados com o isolado PL.T, a expressão de CD62L permaneceu abaixo do grupo controle durante todo o período de estudo. A expressão de CD25 exibe um pico no 21° dia, quando apresenta 38,36 pontos percentuais acima do controle inoculado com PBS, porém cai no 45° dia, permanecendo próximo ao percentual de expressão do grupo controle. A cinética de CD69 também apresentou

expressão máxima no 21° de experimento. Esses dados sugerem que, apesar do número pequeno de células CD4 presentes no baço desses animais (como demonstrado na figura 16), essas células parecem estar em um grau de ativação extremamente elevado. No caso dos animais inoculados com o isolado PL.P essa estimulação parece ocorrer mais tardiamente, levando a uma proliferação ainda maior do fungo, como foi por nós demonstrado na figura 13. Apesar da cinética mais tardia de ativação apresentada por todos os marcadores nos animais imunossuprimidos inoculados com PL.P, o grau de ativação parece ser ainda maior do que aquele observado nos animais inoculados com o isolado PL.T no 45° dia de infecção, já que a queda na expressão de CD62L é muito mais acentuada com relação ao grupo PBS, acompanhada de um aumento marcante na expressão de CD25 e CD69. É sabido na literatura que um dos fatores relacionados com o desenvolvimento de um número elevado de células T CD4+ efetoras ou de memória efetora, seria a intensidade do estímulo, diretamente relacionada com a sua concentração (Lanzavecchia, & Salusto 2005). Neste caso, nosso resultado demonstrando uma maior carga fúngica nos camundongos imunossuprimidos, quando comparados aos imunocompetentes, poderia ser um indicativo de que, as poucas células CD4+ encontradas nesses animais, estariam sofrendo um processo de ativação intenso, levando ao desenvolvimento de células efetoras, que possuem tempo de vida curto, e não seriam capazes de controlar a infecção, levando os animais a morte mais precocemente, quando comparados ao grupo controle.

A expressão desses marcadores de ativação e migração celular nos linfócitos CD8+ dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos



inoculados com ambos os isolados fúngicos, em comparação aos seus respectivos controles, foi semelhante àquela observada nos linfócitos CD4+ dos camundongos desses mesmos grupos.

Um ponto interessante a ser considerado em relação à expressão de CD69 é o seu predomínio em linfócitos T CD8+. Trabalhos publicados por Santamaría *et al.* (1992) e Antas *et al.* (2002) já relataram uma expressão seletiva de CD69 em linfócitos CD8+, quando comparada às células CD4+. Em nosso estudo, os resultados obtidos corroboram essa afirmação, uma vez que, excetuando-se o grupo dos camundongos imunossuprimidos inoculados com o isolado PL.T no 21º dia pós-inóculo, os demais grupos também apresentaram percentuais de expressão de CD69 maiores nas células CD8+, do que nas CD4+, em todos os pontos de observação.

A despeito da resposta imune celular ter sido, por muito tempo, considerada o mecanismo de defesa mais importante, contra patógenos intracelulares, o papel da imunidade humoral não pode ser descartado, a partir do entendimento de que certos tipos de anticorpos também poderiam desempenhar funções protetoras (Blanco & Garcia, 2008). Alves *et al.* (2009), em um estudo de paracoccidiodomicose experimental em camundongos, sugeriram que esses anticorpos teriam a função de auxiliar a ativação do sistema imune, opsonizando o fungo, facilitando a fagocitose e ativando o sistema complemento.

De acordo com Rocha *et al.* (2002), a avaliação da resposta imune humoral é feita quase que exclusivamente através de testes sorológicos *in vitro*, a partir de antígenos solúveis ou preparações antigênicas de parasitas fixados, como o emprego da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Segundo esses mesmos autores, a análise de anticorpos através da sorologia convencional, além de apresentar reatividade cruzada, chama a atenção para os baixos títulos de anticorpos. A citometria de fluxo surge como uma alternativa de alta sensibilidade para análise sorológica, tendo sido utilizada de forma satisfatória na detecção de anticorpos anti-tripomastigotas vivo de *Trypanosoma cruzi* (Martins-Filho *et al.*, 1995) e como método alternativo para se avaliar os níveis de anticorpos contra promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Santiago *et al.*, 2008). Em nosso estudo, objetivando fornecer dados inéditos acerca da resposta imune humoral contra *P. lilacinus*, aliamos a simplicidade e rapidez da RIFI, à alta sensibilidade e especificidade da citometria de fluxo. Sendo assim, nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que a infecção experimental com esse fungo foi capaz de estimular, nos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos inoculados com o fungo, a produção de anticorpos IgG anti-*P.lilacinus*.

Ao longo dos anos, os testes sorológicos têm sido importantes ferramentas para o diagnóstico de doenças fúngicas. Warnock (1974) mostrou a grande importância da RIFI no diagnóstico das formas alérgicas e micetomais de aspergilose pulmonar, utilizando micélio aderido às lâminas. Nossos dados corroboram os estudos que mostram essa técnica como rápida e simples na detecção de anticorpos da classe IgG contra epítopos de *P. lilacinus*.

Os resultados aqui obtidos através da citometria de fluxo foram similares aos da RIFI. Foi possível detectar anticorpos IgG ligados aos conídios de *P. lilacinus*, e os percentuais de fluorescência dos grupos controle não foram considerados significantes, sugerindo uma produção de anticorpos espécie-específicos contra esse fungo. Nesse sentido, dados na literatura indicam que

a dexametasona, como outros corticosteróides, podem inibir a resposta imunológica T dependente (Diasio & LoBuglio, 1996). Em nosso estudo, a reatividade observada no soro dos camundongos imunossuprimidos foi similar ao grupo imunocompetente, sugerindo que, neste caso, a imunossupressão provocada pela dexametasona não interferiu no compartimento humoral, apontando para uma possível resposta T independente, desencadeada por antígenos polissacarídicos, lipídicos e outros antígenos não protéicos que são reconhecidos pelo linfócito B sem o envolvimento de células T *helper* (Abbas & Lichtman, 2008).

A importância de dados acerca da interação entre parasito e hospedeiro, especialmente no ambiente da imunossupressão, é de suma importância no atual cenário das doenças infecciosas, uma vez que o número de indivíduos imunossuprimidos tende a aumentar gradativamente devido a diversos fatores, como regimes imunossupressores mais agressivos, aumento na expectativa de vida, administração prolongada de corticóides em portadores de doenças metabólicas e AIDS. Esses fatores, aliados a uma maior sobrevivência na terapia intensiva, alta frequência de instrumentalização e inserção de cateteres e a administração indiscriminada de antibióticos de largo espectro (Antas *et al.*, 2012) têm contribuído para um aumento substancial de infecções fúngicas sistêmicas.

Em síntese, a partir dos resultados demonstrados nesse estudo a capacidade invasiva e patogênica de *P. lilacinus* não deve ser subestimada apesar dos relatos de vários autores conferindo a esse fungo baixa virulência (Pastor & Guarro, 2006), pois, ao analisarmos dois isolados provenientes de casos de hialohifomicose humana, infectamos, com baixos inóculos,

camundongos C57BL/6 imunocompetentes e estabelecemos a doença nos animais imunossuprimidos. Além disso, sugerimos que o modelo experimental utilizado é menos susceptível a esse fungo, quando comparado ao estudo do nosso grupo utilizando modelo murino BALB/c. Adicionalmente, foi possível reproduzir, para um dos isolados estudados, a manifestação clínica (lesão dermatológica) encontrada no paciente humano da qual o isolado foi proveniente, fazendo dessa linhagem, em nossa opinião, um bom modelo para estudos de virulência.

A análise do perfil imunológico dos animais aqui infectados por *P. lilacinus* demonstrou uma resposta imune celular nos imunocompetentes com predomínio de células T CD4+ sobre T CD8+, invertendo-se nos animais imunossuprimidos, devido à ação da dexametasona sobre os linfócitos T CD4+. Ademais, foi verificado a partir da análise dos marcadores de superfície celular, que os linfócitos dos animais inoculados com o isolado PL.T são ativados primariamente nos estágios iniciais da infecção com o fungo, enquanto que, na infecção pelo isolado PL.P, essa ativação parece ser mais tardia. Verificamos também a produção de anticorpos IgG espécie-específicos contra *P. lilacinus*. Todos esses dados reunidos, sem dúvida, ampliam os conhecimentos sobre essa espécie fúngica, de modo a contribuir para o entendimento da relação fungo-hospedeiro e seus mecanismos de resistência e susceptibilidade.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados da análise da resposta à infecção, *in vivo*, de camundongos C57BL/6, imunocompetentes e imunossuprimidos, frente a isolados de origem humana de *Paecilomyces lilacinus* permitem concluir:

- Entre os isolados de *P. lilacinus*, provenientes de lesões de pele e tibia, observou-se pequenas diferenças fenotípicas, porém características morfológicas compatíveis com a espécie foram visualizadas;

- A inoculação dos isolados fúngicos no modelo murino imunocompetente e imunossuprimido permitiu verificar a virulência dos isolados:

- ❖ O modelo imunocompetente foi infectado por ambos os isolados, porém os animais não desenvolveram a doença, exceto um camundongo que apresentou a forma ocular da hialohifomicose. Diante disso, consideramos a susceptibilidade do animal devido a fatores intrínsecos ao mesmo;

- ❖ Diferentemente, no modelo imunossuprimido os camundongos apresentaram sinais clínicos da doença como, lesões dermatológicas e nódulos repletos de estruturas fúngicas, compatíveis com a descrição na literatura dos casos clínicos de hialohifomicose;

- ❖ O isolado proveniente de lesão cutânea (PL.P) foi considerado o mais virulento porque provocou alterações histológicas nos tecidos com a presença de estruturas fúngicas e maior quantidade de células do

fungo foram recuperadas do baço. Além disso, os animais imunossuprimidos apresentaram lesões dermatológicas e nódulo subcutâneo rico em células fúngicas viáveis;

- A utilização do fosfato dissódico de dexametasona foi eficiente na imunossupressão celular dos camundongos utilizados como modelo imunossuprimido, e nos forneceu dados acerca da depleção celular provocada por esse fármaco, aparentemente mais seletiva para linfócitos T CD4+.

- A avaliação da expressão de marcadores de ativação e migração celular demonstrou que as células CD4 e CD8 dos animais inoculados com o isolado PL.T sofrem uma ativação celular precoce/intermediária, enquanto que, nos animais inoculados com o isolado PL.P essa ativação é mais tardia, o que poderia ser um dos mecanismos relacionados com a maior virulência por nós observada para este isolado.

- A imunossupressão não alterou a cinética de expressão dos marcadores de ativação e migração nas células CD4 e CD8 quando comparadas aos obtidos nos animais imunocompetentes, porém o grau de ativação celular parece ser mais acentuado nos animais imunossuprimidos.

- A imunossupressão realizada com dexametasona não exerceu influência quantitativa na resposta imune humoral, uma vez que os camundongos imunossuprimidos, assim como os imunocompetentes, inoculados com o fungo apresentaram os mesmos títulos de anticorpos IgG específicos anti-*P.lilacinus*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman, AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed. 2008. Elsevier.
- Agrawal PK, Lal B, Wahab S, Srivastava OP, Misra SC. Orbital paecilomycosis due to *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Sabouraudia* 1979; 17: 363-370.
- Ajello, L. Hyalohyphomycosis. A disease entity whose time has come. *in* Porto, E & Lacaz, CS. Hialo-Hifomicose. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 1987; 62 (supl. nº 1) 242-247.
- Alves CCS, Azevedo ALS, Rodrigues MF, Machado RP, Souza MA, Machado MA, Teixeira HC & Ferreira AP. Cellular and humoral immune responses during intrathoracic paracoccidioidomycosis in BALB/c mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2009; 32:6, 513-525.
- Antachopoulos C, Roilides E. Cytokines and fungal infection. *British Journal of Haematology*. 2005; 129: 583-596
- Antas PRZ, Brito MMS, Peixoto E, Ponte CGG, Borba CM. Neglected and emerging fungal infections: review of hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* focusing in disease burden, in vitro antifungal susceptibility and management. *Microbes and Infection*. 2012; 14(1): 1-8.

Antas PRZ, Oliveira EB, Milagres AS, Franken, KC, Ottenhoff THM, Klatser P, Sarno EZ, Sampaio EP. Kinetics of T cell-activation molecules in response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. 2002. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 97(8): 1097-1099.

Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2008; 125: 47–70.

Bonants PJM, Fitters HT, Belder E, Waalwijk C, Henflings JDDM. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. Microbiology. 1995; 141: 775-784

Brandão AAH. Imunossupressão experimental em camundongos. Aspectos histológicos dos órgãos linfóides após tratamento com dexametasona e inoculação de *Candida albicans*. Revista de Odontologia da UNESP. 1991; 20: 9-16.

Brito MMS, Conceição-Silva F, Morgado FN, Raibolt P, Schubach A, Schubach TP, Schäffer GMV, Borba CM. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. Medical Mycology. 2007; 45: 721-729.



Brito MMS, Lima MS, Morgado FN, Raibolt P, Menezes RC, Conceição-Silva F, Borba CM. Characteristics of *Paecilomyces lilacinus* infection comparing immunocompetent and immunosuppressed murine model. *Mycoses*. 2011; 54: e513-e521.

Carey J, D'Amico R, Sutton DA & Rinaldi MG. *Paecilomyces lilacinus* vaginitis in an immunocompetent patient. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9:1155-1158.

Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A, Turano A. Flow cytometry analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*. 1997; 27:71-76.

Casadevall A & Pirofski LA. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalisms, colonization, infection and disease. *Infection and Immunity*. 2000; 68(12): 6511-6518

Casadevall A, Feldmesser M, Pirofski L. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Current Opinion in Microbiology*. 2002; 5:386-391.

- Castro LGM, Salebian A, Sotto MN. Hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* in renal transplant patient and a review of human *Paecilomyces* species infections. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1990; 28: 15-26.
- Cenci E, Perito S, Enssle KH, Mosci P, Latgé JP, Romani L, Bistoni F. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infection and Immunity*. 1997; 65(2): 564-570.
- Chang BP, Sun PL, Huang FY, Tsai TC, Lin CC, Lee MD, Chen YC, Sheu JC, Tsai JD. *Paecilomyces lilacinus* peritonitis complicating peritoneal dialysis cured by oral voriconazole and terbinafine combination therapy. *Journal of Medicine and Microbiology*. 2008; 57 (pt12): 1581-1584.
- Chung PC, Lin HC, Hwang YS, Tsal YJ; Ngan KW, Huang SC, Hslao CH. *Paecilomyces lilacinus* scleritis with secondary keratitis. *Cornea* 2007; 26(2): 232-234.
- Das, S, Saha, R, Dar, SA, Ramachandran, VG. *Acremonium* Species: A review of the etiological agents of emerging hyalohyphomycosis. *Mycopathologia*. 2010; 170:361-375
- Diasio RB & LoBuglio AF. Immunomodulators: Immunossuppressive agents and immunostimulants. *in* Goodman & Gilman, editors. *The Pharmacological basis of therapeutics*. 9 ed. New York McGraw-Hill. 1996. p.1291-1308.

Egorova AS, Gessler NN, Belozerskaya TA. Melanin pigments in the fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. Doklady Biochemistry and Biophysics. 2011; 437: 84-86.

Espinosa V, Rivera A. Cytokines and regulation of fungus-specific CD4 Tcells differentiation. Cytokine. 2011; Doi: 10.1016/j.cyto.2011.11.005.

Ezzedine K, Belin E, Guillet S, D'Almeida M, Droitcourt C, Accocebery I, Milpied B, Jouary T, Malvy D, Taieb A. Cutaneous hyalohyphomycosis due to *Paecilomyces lilacinus*. Acta Dermato Venereologica. 2011; DOI10.2340/00015555-1179.

Fernandes KSS, Mathews HL, Lopes Bezerra LM. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. Journal of Medical Microbiology. 1999; 48 (2): 195-203.

Ford JG, Agee S, Greenhaw ST. Successful medical treatment of a case of *Paecilomyces lilacinus* keratitis. Cornea. 2008; 27 (9): 1077-1079.

Garbino J, Ondrusova A, Baligvo E, Lew D, Bouchuiguir-Wafa K & Rohner P. Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* endophthalmitis with voriconazole. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2002; 34:9, 701-703

Goihman-Yahr M, Pine L, Albornoz MC, Yarzabal L, De Gomez MH, San Martin B, Ocanto A, Milina T, Convit J. Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Mycopathologia*. 1980; 71:73-83.

Gordon MA & Norton SW. Corneal transplant infection by *Paecilomyces lilacinus*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1985; 23: 295-301.

Gordon MA. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, from systemic infection in an armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1984; 22:109-116.

Gottlieb T & Atkins BL. Case report. Successful treatment of cutaneous *Paecilomyces lilacinus* infection with oral itraconazole in an immune competent host. *Mycoses*. 2001; 44: 513-515.

Grailer JJ, Koder M, Steeber DA. L-selectin: Role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *Journal of Dermatological Science*. 2009; 56:141–147.

Gunasekera TS, Holland RJ, Gillings MR, Briscoe DA, Neethling DC, Williams KL, Nevalainen KMH. Phenotypic and genetic characterization of *Paecilomyces lilacinus* strains with biocontrol activity root-knot nematodes. *Canadian Journal of Microbiology*. 2000; 46: 775-783.

Gutierrez-Rodero F, Moragón M, Ortiz de la Tabla V, Mayol MJ, Martín C.

Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host successfully treated with itraconazole: Case Report and Review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1999; 18:814–818

Hall VC, Goyal S, Davis MDP, Walsh JS. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*: report of three cases and review of literature. *International Journal of Dermatology*. 2004; 43: 648-653.

Hofling-Lima AL, Forseto A, Duprat JP, Andrade A, Souza LB, Godoy P, Freitas D. Laboratory study of the mycotic infectious eye diseases and factors associated with keratitis. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2005; 68: 21-27.

Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd edn. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2000; 794-809.

Huang C, Sun P, Tseng H. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* successfully treated by oral voriconazole and nystatin packing. *Mycopathology*. 2011; 172 (2): 141-145.

Hubálek Z & Hornich M. Experimental infection of white mouse with *Chrysosporium* and *Paecilomyces*. *Mycopathology* 1977; 62: 173-178.

Inglis PW, Tigano MS. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp.(Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. *Genetics and Molecular Biology*. 2006; 29, 1, 132-136.

Innocenti P, Pagani E, Vigi D, Hopfl R, Huemer HP, Larcher C. Persisting *Paecilomyces lilacinus* nail infection following pregnancy. *Mycoses*. 2011; 54(6): e880-882.

Itin PH, Frei R, Lautenschlager S, Buechner SA, Surber C, Gratwohl A, Widmer AF. Cutaneous manifestations of *Paecilomyces lilacinus* infection induced by a contaminated skin lotion in patients who are severely immunosuppressed. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1998; 39(3): 401-409.

Jharomi BS, Khaksar, AA. Cutaneous hyalohyphomycosis in a woman with normal immune system. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2007; 3(1): 51-53.

Kamei K, Miyaji M. Animal models in mycology. *Contributions to Microbiology*. Basel, Karger 2001; 9: 45-57.

Kedzierska K, La Gruta NL, Turner SJ, Doherty PC. Establishment and recall of CD8+ T-cell memory in a model of localized transient infection. *Immunological Reviews*. 2006; 211:133-145.

- Khan A, Williams K, Molloy MP, Nevalainen H. Testing the nematophagous biological control strain *Paecilomyces lilacinus* 251 for paecilotoxin production. *FEMS Microbiology Letters*. 2003; 227:107-111.
- Kurzai O, Vaeth T, Hamelmann W, Müller FMC, Klinker H, Langmann P, Frosch M, Mühlischlegel F. Combined surgical and antifungal treatment of a subcutaneous infection due to *Paecilomyces lilacinus*. *Medical Mycology*. 2003; 41: 253-258.
- Langfelder K, Streibel A, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 2003; 38: 143-158.
- Lanzavecchia A, Salusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Current Opinion in Immunology*. 2005; 17:326–332
- Lefrançois L. Development, trafficking, and function of memory T-cell subsets. *Immunological Reviews*. 2006; 211: 93–103.
- Li X, Zhang C, Fang C, Lin F. White-spot disease of Chinese soft-shelled turtles (*Trionyx sinens*) caused by *Paecilomyces lilacinus*. *Journal of Zhejiang University*. 2008; 9(7):578-581.

- Lin WL, Lin Wc, Chiu CS. *Paecilomyces lilacinus* cutaneous infection associated with peripherally inserted catheter insertion. Journal of European Academy of Dermatology and Venereology. 2008; 22(10): 1267-1268.
- Littman MP & Goldschmidt MH. Systemic paecilomycosis in dog. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1987; 191: 445-447.
- Liu K, Howell DN, Perfect JR, Schell WA. Morphologic criteria for the preliminary identification of *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Acremonium* species by histopathology. Microbiology and Infectious Diseases. 1998; 109(1): 45-54.
- Luangsa-ard JJ, Houbraken J, van Doorn T, Hong SB, Borman AM, Hywel-Jones NL, Samsom RA. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiology Letters. 2011; 321(2): 141-149.
- Marti GA, Lastra CL, Pelizza AS & Garcia J. Isolation of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (Ascomycota: Hypocreales) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area in Argentina. Mycopathologia. 2006; 162: 369–372.



Martin CA, Roberts S & Greenberg RN. Voriconazole treatment of disseminated *Paecilomyces* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. 2002; 5: e78-e81.

Martins-Filho OA, Pereira MES, Carvalho JF, Cançado J, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas's disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1995, 2(5): 569-573.

Maslen M, Whitehead J, Forsyth WM, McCracken H, Hocking AD. Systemic mycotic disease of captive crocodile hatchling (*Crocodylus porosus*) caused by *Paecilomyces lilacinus*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1988; 26: 219-225.

Mellor AL & Munn DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nature Reviews Immunology*. 2008; 8(1): 74-80.

Mikami Y, Yazawa K, Fukurshima K, Arai T, Udagawa S, Samson RA. Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains. *Mycopathology* 1989; 108: 195-199.

Miller TA, Schaefer FW. Changes in mouse circulating leucocyte numbers in C57BL/6 mice immunosuppressed with dexamethasone for *Cryptosporidium parvum* oocyst production. *Veterinary Parasitology*. 2007, 147-157.

Motswaledi HM, Mathekga K, Sein P, Nmutavhanani DL. *Paecilomyces lilacinus* eumicetoma. *International Journal of Dermatology*. 2009; 48: 858-861.

Muller H, Cikirikcioglu M, Lerch R. Subaortic aneurysm caused by *Paecilomyces lilacinus* endocarditis. *Archives of Cardiovascular Diseases*. 2008; 101(11-12): 803-804.

Orth B, Frei R, Itin PH, Rinaldi MG, Speck B, Gratwohl A, Widmer AF. Outbreak of invasive mycoses caused by *Paecilomyces lilacinus* from a contaminated skin lotion. *Annals of Internal Medicine*. 1996; 125(10): 799-806.

Ounissi M, Abderrahim E, Trabelsi S, Khaled S, Bezzine H, Ben Hamida F, Hedri H, Ben Abdallah T, Ben Maïz T, Kheder A. Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* after kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2009; 41:7. 2917-2919.

Pastor FJ & Guarro J. Clinical manifestation, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infection. *Clinical Microbiology and Infections*. 2006; 12: 948-960.

Pawloski DR, Brunner JD, Singh K, Sutton DA. Pulmonary *Paecilomyces lilacinus* infection in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 2010; 46: 197-202.

Peixoto E, Oliveira JC, Antas PRZ, Borba CM. *In vitro* study of the host-parasite interactions between mouse macrophages and the opportunistic fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2010; 104: 529-534.

Perfect JR & Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clinical Infectious Diseases*. 1996; 22(Suppl 2): S112-8.

Pintor E, Martin M, Garcia P, Gonzalez M. Endophthalmitis due to *Paecilomyces lilacinus* after non-surgical penetrating trauma. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2001; 19: 347-348.

Pujol I, Aguilar C, Ortoneda M, Pastor J, Mayayo E, Guarro J. Experimental pathogenicity of three opportunist *Paecilomyces* species in murine model. *Journal de Mycologie Médicale*. 2002; 12: 86-89.

Riddell RW. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*. 1950; 42: 265-70.

Rivino L, Messi M, Jarossay D, Lanzavecchia A, Salusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+central memory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2004; 200(6): 725–735.

Rocha RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Carvalho, AT, Corrêa-Oliveira R, Genaro, JMO, Mayrink W, Martins-Filho AO. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. (2002). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35(6): 551-562.

Rodriguez MM, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. Efficacy of voriconazole in a murine model of invasive paecilomycosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010; 35: 362-365.

Rodríguez MM, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. Posaconazole efficacy in a murine disseminated infection caused by *Paecilomyces lilacinus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009; 63: 361-364.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*. 2011; 11: 275-288.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2: 845–858.

Santamaria M, Marubayashi M, Arizon JM, Montero A, Concha M, Valles F, Lopes A, Lopez F, Peña J. The activation antigen CD69 is selectively expressed on CD8+ endomyocardium infiltrating T lymphocytes in human rejecting heart allografts. *Humam Immunology*. 1992; 33:1-4.

Santiago MAS, Ribeiro FC, Mouta-Confort E, Nascimento LD, Schubach AO, Madeira MF, Bertho AL. *Veterinary Parasitology*. 2008; 154: 341-346.

Schlub TE, Badovunac VP, Sabel JT Harty JT, Davenport MP. Predicting CD62L expression during the CD8+ T cell response *in vivo*. *Immunology and Cell Biology*. 2010; 88(2): 157–164.

Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology*. 2005; 129, 569–582.

Sponsel W, Chen N, Dang D, Paris G, Graybill J, Najvar LK, Zhou L, Lam KW, Glickman R, Scribbick F. Topical voriconazole as a novel treatment for fungal keratitis. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 2006; 50(1):262-8.

Starska K, Głowacka E, Kulig A, Lewy-Trenda I, Bryś M, Lewkowicz P. The role of tumor cells in the modification of T lymphocytes activity — the expression of the early CD69+, CD71+ and the late CD25+, CD26+, HLA/DR+ activation markers on T CD4+ and CD8+ cells in squamous cell laryngeal carcinoma. Part I. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2011; 49 (4): 579–592.

Stephan ZA & Al-Din SS. Influence of temperature and culture media on the growth of the fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Revue de Nématologie*. 1987; 10(4): 494.

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

Tan TQ, Ogden AK, Tillman J, Demmler GJ & Rinaldi MG. *Paecilomyces lilacinus* catheter-related fungemia in an immunocompromised pediatric patient. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30: 2479-2483.

- Unsoerd H, Pircher H. Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7. *Journal of Virology*. 2005; 79(7): 4510-4513.
- Van Schooneveld T, Freifeld A, Lesiak B, Kalil A, Sutton DA, Iwen PC. *Paecilomyces lilacinus* infection in a liver transplant patient: case report and review of the literature. *Transplant Infectious Diseases*. 2008; 0:117-122.
- Vecchiarelli A, Mencacci A, Bistoni F. Lymphocytes. *in* Brown GD & Netea MG, Editors. *Immunology of fungal infections*. USA: Springer. 2007.
- Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E & Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology Infectious*. 2004; 10(Suppl. 1): 48-66.
- Warnock DW. Indirect immunofluorescence test for the detections of *Aspergillus fumigatus* antibodies. *Journal of Clinical Pathology*. 1974; 27: 911-912.
- Wessolossky M, Haran JP, Bagchi K. *Paecilomyces lilacinus* olecranon bursitis in an immunocompromised host: case report and review. *Diagnostic Microbiology and Infectious diseases*. 2008; 61: 354-357.

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. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; 34: 1559-1562.

Yuan X, Wilhelmus KR, Matoba A, Alexandrakis G, Miller D, Huang AJW. Pathogenesis and outcome of *Paecilomyces* keratitis. *American Journal of Ophthalmology*. 2009; 147: 691-696.

Zhang N, Bevan MJ. CD8+ T cells: Foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 2011; 35(2)161-8.



**ANEXO****Procedência das principais substâncias químicas e meios de cultura utilizados**

- Albumina do soro bovino (BSA) – Sigma, USA, USA
- Anticorpos monoclonais: CD4 – FITC, CD8 – PE, CD25 – APC.Cy 7, CD 62L – APC, CD69 – PerCP Cy5.5 – Beckton Dicson, USA
- Azida sódica – Sigma, USA, USA
- Azul de Evans – Sigma, USA
- Batata dextrose Agar - Difco
- Cloridrato de quetamina – Syntec, Brasil
- Cloridrato de proximetacaína – Alcon, Brasil
- Cloridrato de tetraciclina – Teuto, Brasil
- Cloridrato de xilazina - Syntec, Brasil
- Extrato de malte agar – Difco
- Fosfato dissódico de dexametasona – Hypofarma, Brasil
- Lactofenol de Amann com azul de algodão – Merck, E. Merck, Germany
- Mycosel - Difco
- RPMI 1640 – Sigma, USA
- Soro fetal bovino - Hyclone, USA
- Tiopental sódico – Abbott laboratories, Abbott Park, USA.