

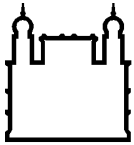
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ANÁLISE IN VITRO DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS  
MURINOS INOS-KO POR PURPUREOCILLIUM LILACINUM,  
AGENTE CAUSAL DA HIALOHIFOMICOSE

**CARLOS GERMANO GARRIDO DE PONTE**

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Carlos Germano Garrido de Ponte**

**Análise *in vitro* da infecção de macrófagos murinos iNOS-KO por *Purpureocillium lilacinum*, agente causal da hialohifomicose**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Medicina Tropical

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas

**RIO DE JANEIRO**

Fevereiro de 2017

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

P813 Ponte, Carlos Germano Garrido de

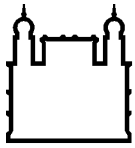
Análise in vitro da infecção de macrófagos murinos iNOS-KO por *Purpureocillium lilacinum*, agente causal da hialohifomicose / Carlos Germano Garrido de Ponte. – Rio de Janeiro, 2017.  
xvi, 97 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Bibliografia: f. 68-79

1. *Purpureocillium lilacinum*. 2. Hialohifomicose. 3. iNOS-KO. I.  
Título.

CDD 571.9685



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**AUTOR: CARLOS GERMANO GARRIDO DE PONTE**

**Análise *in vitro* da infecção de macrófagos murinos iNOS-KO por  
*Purpureocillium lilacinum*, agente causal da hialohifomicose**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas**

**Aprovada em: 09/ 02/ 2017**

**EXAMINADORES:**

<b>Profa. Dra. Paula Mello De Luca - Presidente</b>	<b>(IOC)</b>
<b>Profa. Dra. Cintia de Moraes Borba</b>	<b>(IOC)</b>
<b>Prof. Dr. Dayvison Francis Saraiva Freitas</b>	<b>(INI)</b>
<b>Profa. Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira</b>	<b>(IOC)</b>
<b>Profa. Dra. Marta de Almeida Santiago</b>	<b>(Bio - Manguinhos)</b>

## AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, obrigado a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Ao meu pai, Carlos Alberto, minha madrasta Sulene, meus tios José Carlos e Maria de Lourdes e minha prima Fátima Cristina que, mesmo de longe, estiveram sempre comigo, ensinando-me, apoiando-me, amando-me incondicionalmente e acreditando em meu potencial.

Aos meus irmãos, Henrique, Eugênio, Yuri e Yago e também as minhas cunhadas, pela amizade, carinho e companheirismo de sempre; por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicional, obrigado!

A todos os meus familiares, tios, primos, sobrinhos e amigos, sejam de Fortaleza ou do Rio de Janeiro.

A minha amiga e “irmã” Diana que, desde a época da faculdade, vem sempre me apoiando e incentivando o meu crescimento.

A todos meus amigos pelos momentos de descontração, pela preocupação, pelas palavras de apoio, pela torcida, por compartilharem momentos e vivências.

Um obrigado a uma pessoa muito especial que, sem o apoio dela, nada disso faria sentido.

Não poderia deixar de agradecer a Dra. Cíntia Borba, que foi a pessoa que abriu as portas do laboratório para que eu conhecesse esse mundo novo pelo qual eu me apaixonei, e por todo seu apoio e seus ensinamentos.

Meu muitíssimo obrigado ao meu orientador, Dr. Paulo Renato Zuquim Antas. Obrigado por acreditar em mim, me incentivando, me apoiando sempre que precisei.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Imunologia Clínica, em especial a chefe Dra. Rosa Pinho, e aos alunos, Matheus, Lucas, Rayane, Lawrence, Sandra, Ângelo, Juliana, Alana e Periela. Obrigado pela amizade, companheirismo e ajuda de todos.

Aos colegas Victor, Vitor e Thaize por toda ajuda.

Aos meus amigos da turma de mestrado. Obrigado pelos momentos divididos juntos, por dividir comigo as angústias e alegrias. Foi bom poder contar com vocês!

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IOC, em especial a coordenadora, Dra. Martha Mutis, e a secretária Livia.

As plataformas de Citometria de Fluxo e de Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura do IOC, e aos responsáveis pelo biotério do Pavilhão Leônidas Deane.

Aos animais que deram suas vidas pela ciência.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições pessoais.

A Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto Oswaldo Cruz, a FAPERJ e a CAPES pelo apoio financeiro.

# Agenda Científica

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

06 a 10  
FEVEREIRO  
2017

06 segunda-feira

## Especialização em Entomologia Médica

Diagnóstico situacional da malária no Haiti de 2009 a 2012: uma abordagem epidemiológica e entomológica

Autor: Jean Ricardo Jules

Orientadoras: Teresa Fernandes Silva do Nascimento e Nildimar Honório Rocha

Às 10h, na sala 4 do Pav. Arthur Neiva

07 terça-feira

## Doutorado em Biologia Parasitária

Mecanismos de regulação autofágica em pacientes com hanseníase e seu papel na imunopatogênese da reação reversa em pacientes multibaciares

Autor: Bruno Jorge de Andrade Silva

Orientadora: Roberta Olmo Pinheiro

Às 10h, no auditório Emmanuel Dias – Pav. Arthur Neiva

quinta-feira 09

## Doutorado em Biologia Parasitária

Mecanismos inatos associados à imunopatogênese da forma multibacilar e ao estabelecimento da reação reversa em pacientes com hanseníase

Autora: Mayara Garcia de Mattos Barbosa

Orientadora: Roberta Olmo Pinheiro

Às 10h, na sala A9 do Pav. Leônidas Deane

## Mestrado em Medicina Tropical

Análise *in vitro* da infecção de macrófagos murinos iNOS-KO por *Purpureocillium lilacinum*, agente causal da hialohifomicose

Autor: Carlos Germano Garrido de Ponte

Orientador: Paulo Renato Zuquim Antas

Às 10h, no auditório Emmanuel Dias – Pav. Arthur Neiva

## Doutorado em Biologia Celular e Molecular

Estudo dos mecanismos de ação do tetranortriterpenóide de origem natural, gedunina, na sinalização de tir e inflamassoma

Autora: Perla Villani Borges da Silva

Orientadora: Carmen Penido Monteiro

Às 14h, no auditório Emmanuel Dias – Pav. Arthur Neiva

## Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Avaliação do papel da adenosina na resposta fibrótica pulmonar em camundongos silicóticos

Autor: Yago Amigo Pinho Jannini de Sá

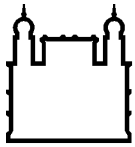
Orientadora: Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Às 14h, no auditório Maria Deane – Pav. Leônidas Deane

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”*

**(Martin Luther King).**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Análise *in vitro* da infecção de macrófagos murinos iNOS-KO por *Purpureocillium lilacinum*, agente causal da hialohifomicose.**

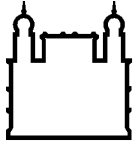
### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

**Carlos Germano Garrido de Ponte**

*Purpureocillium lilacinum* é um fungo filamentosso, assexuado e hialino. Sendo cosmopolita, é encontrado em solo como saprófita e patógeno de insetos e nematódeos. *P. lilacinum* é considerado um importante patógeno oportunista causador da hialohifomicose, que afeta crianças e adultos, sejam imunocompetentes ou imunocomprometidos. Os dados sobre os mecanismos imunológicos relacionados na interação patógeno-hospedeiro são escassos. Neste estudo, foram utilizados três isolados distintos de *P. lilacinum*, obtidos a partir de casos clínicos humanos, interagindo *in vitro* com macrófagos de camundongos selvagens e nocautes (iNOS-KO). Após 14h de incubação, foram visualizados tubos germinativos fúngicos, sugerindo metabolismo ativo do patógeno, bem como o desenvolvimento de hifas septadas, ramificadas dentro dos macrófagos. Em última análise às 24h, os macrófagos foram completamente destruídos. Diferentes resultados em relação à interação e velocidade de destruição dos macrófagos foram encontrados e confirmados entre as três isolados utilizadas. No entanto, foram observados níveis normais de MMP-9 e IFN- $\alpha$ . O *P. lilacinum* foi capaz de induzir modulações nos perfis de marcadores CD11b, CD14, CD18, CD38 e CD80 nos macrófagos peritoneais da linhagem iNOS-KO. Os resultados desse trabalho nos permitem sugerir que o fungo *P. lilacinum* é capaz de infectar, modular e destruir macrófagos, que são uma das primeiras células de defesa a interagir com o patógeno, em camundongos imunodeficientes.

Palavra chave: *Purpureocillium lilacinum*, hialohifomicose, iNOS-KO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION THESIS IN MEDICINA TROPICAL

**Carlos Germano Garrido de Ponte**

*Purpureocillium lilacinum* is a filamentous, asexual and hyaline fungus. As cosmopolitan, it is found in soil as saprophyte and pathogen of insects and nematodes. *P. lilacinum* is considered an important opportunistic pathogen causing hyalohyphomycosis, which affects children and adults, whether immunocompetent or immunocompromised. Data on immunological mechanisms related to host-pathogen interactions are unusual. In this study, three distinct isolates of *P. lilacinum*, obtained from human clinical cases, were put to interact in vitro with both wild-type and transgenic (iNOS-KO) mice macrophages. After 14h of incubation, fungal germ tubes were observed, suggesting active metabolism of the pathogen, as well as the development of septate, branched hyphae within the macrophages. Ultimately, at 24h, the macrophages were entirely destroyed. Different results regarding the interaction and macrophages destruction rate were found and corroborated among the three strains used. Nevertheless, similar levels of MMP-9 and IFN- $\alpha$  were observed. *P. lilacinum* was able to induce significant modulation of CD11b, CD14, CD18, CD38 and CD80 surface markers in the peritoneal macrophages of the iNOS-KO lineage. The results of this study allow us to conclude that *P. lilacinum* is able to infect, modulate and destroy macrophages in vitro, the first cells to interact with the pathogen in immunodeficient mice.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
<b>Figura 1.</b> Macromorfologia (A) e micromorfologia (B) do fungo <i>P. lilacinum</i> . Fonte <a href="http://organicsoiltechnology.com">http://organicsoiltechnology.com</a>	1
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da morfologia de <i>Purpureociliun lilacinum</i> . A- Conidióforo; B- Fiálide; C- Conídios (Samson, 1974).	1
<b>Figura 3.</b> Macromorfologia de cultura de <i>P. lilacinum</i> em meio BDA após 12 dias de crescimento. Isolado proveniente da região do seio nasal. Observa-se colônia de coloração rósea à violeta ( <b>A</b> ). Observa-se reverso da colônia de coloração amarelo-acinzentado ( <b>B</b> ).	27
<b>Figura 4.</b> Macromorfologia de cultura dos 3 isolados de <i>P. lilacinum</i> em meio BDA após 12 dias de crescimento, sendo os da esquerda o isolado proveniente do seio nasal, os do centro o isolado da região da tíbia e os da direita o isolado de biopsia de pele. Cultura em placa ( <b>A</b> ) e cultura em tubo ( <b>B</b> ).	28
<b>Figura 5.</b> Microcultura de <i>P. lilacinum</i> em MEA, à temperatura ambiente, após 14 dias de crescimento. Isolado proveniente de seio nasal. Observam-se hifas vegetativas hialinas, conidióforo, sustentando três fiálides em delicado pescoço e sobre elas, conídios elípticos à fusiformes. Coloração: lactofenol de Amann com azul de algodão. Aumento original: 1000x.	29
<b>Figura 6.</b> Microfotografia de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS <sup>-/-</sup> . Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x.	30

**Figura 7.** Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente da região nasal (**A**), isolado proveniente de biópsia de pele (**B**), isolado proveniente da região da tíbia (**C**). Tempo de incubação: 30 minutos. Notar pouca associação dos conídios com os macrófagos. Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x. 31

**Figura 8.** Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal (**A**), isolado proveniente de biópsia de pele (**B**), isolado proveniente da região da tíbia (**C**). Tempo de incubação: 4h. Notar conídios no interior dos macrófagos, provavelmente dentro de fagossomos. Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x. 32

**Figura 9.** Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal (**A**), isolado proveniente de biópsia de pele (**B**), isolado proveniente da região da tíbia (**C**). Tempo de incubação: 6h. Notar conídios dilatados no interior dos macrófagos, porém sem tubos germinativos. Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x. 33

**Figura 10.** Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal (**A**), isolado proveniente de biópsia de pele (**B**), isolado proveniente da região da tíbia (**C**). Tempo de incubação: 14h. Notar formação de tubos germinativos e hifas septadas. Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x. 34

**Figura 11.** Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal (**A**), isolado proveniente de biópsia de pele (**B**), isolado proveniente da região da tíbia (**C**). Tempo de incubação: 24h. Notar micélio fúngico sobre a cultura de células murinas destruídas. Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x. 35

**Figura 12.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem com conídios de *P. lilacinum*, onde observamos a diferença entre o isolado proveniente de seio nasal (**A**), o isolado proveniente de biópsia de pele (**B**), o isolado proveniente da região da tíbia (**C**). Tempo de incubação: 2h. Aumento original: 10000x. 37

**Figura 13.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 30 minutos. Notar adesão conidial e início da fagocitose (**A**). Aumento original: 25000x. Observar conídio internalizado (**B**). Aumento original: 15000x. 38

**Figura 14.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 1h. Observar conídio, com parede celular e cromatina bem evidente, internalizado. Aumento original: 150000x. 39

**Figura 15.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 14h. Notar formação de tubo germinativo (**A**). Aumento original: 8000x. Tempo de incubação: 24h. Observar formação de tubo germinativo, rompendo a membrana plasmática (**B**). Aumento original: 5000x. 40

**Figura 16.** Fotomicrografia eletrônica de varredura de macrófago peritoneal murino da linhagem selvagem, onde podemos observar a presença de filopódios e protruções dorsais (microvilos). Aumento original: 5000x 41

**Figura 17.** Fotomicrografia eletrônica de varredura de macrófago peritoneal murino da linhagem selvagem infectado com conídios de *P. lilacinum* de isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 30 minutos. Observar conídio próximo ao macrófago e outro, possivelmente, já sendo fagocitado. Aumento original: 10000x. 42

**Figura 18.** Fotomicrografia eletrônica de varredura de macrófago peritoneal murino da linhagem selvagem infectado com conídios de *P. lilacinum* de isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 2h. Notar os conídios sendo fagocitados pelo macrófago. Aumento original: 5500x. 43

**Figura 19.** Fotomicrografia eletrônica de varredura de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem infectados com conídios de *P. lilacinum* de isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 5h. Notar presença de conídios dilatados, possivelmente, no interior dos macrófagos. Aumento original: 5500x. 44

**Figura 20.** Fotomicrografia eletrônica de varredura de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem infectados com conídios de *P. lilacinum* de isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 24h. Observar apenas a presença de hifas. Aumento original: 5500x. 45

**Figura 21.** Gráfico representativo de tamanho (FS) e granulosidade (SS) onde se demonstra um gate específico após a interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de biópsia de pele. Observar diminuição da porcentagem entre as células controle não infectadas no tempo de 14h (A) e células infectadas no tempo de 24h (B). 47

**Figura 22.** Gráfico representativo da percentagem de marcação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com anticorpos monoclonais específicos para CD86 (FL-1) e CD11b (FL-4). Células obtidas a partir do *gate* morfológico de macrófagos. Células sem infecção no tempo de 14h (A). Células infectadas por 14h com conídios de *P. lilacinum* no isolado de biópsia de pele (B). Células sem infecção no tempo de 24h (C). Células infectadas por 24h com conídios de *P. lilacinum* no isolado de biópsia de pele (D). Os quadrantes Q1 à Q4 demonstram o percentual de marcação. 48

**Figura 23.** Gráfico representativo da percentagem de marcação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com anticorpos monoclonais específicos para CD18 (FL-2) e CD38 (FL-4). Células obtidas a partir do *gate* morfológico de macrófagos. Células sem infecção no tempo de 14h (A). Células infectadas por 14h com conídios de *P. lilacinum* no isolado de biópsia de pele (B). Células sem infecção no tempo de 24h (C). Células infectadas por 24h com conídios de *P. lilacinum* no isolado de biópsia de pele (D). Os quadrantes Q1 à Q4 demonstram o percentual de marcação 49

**Figura 24.** Gráfico representativo da percentagem de marcação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com anticorpos monoclonais específicos para CD80 (FL-8) e CD14 (FL-2). Células obtidas a partir do *gate* morfológico de macrófagos. Células sem infecção no tempo de 14h (A). Células infectadas por 14h com conídios de *P. lilacinum* no isolado de biópsia de pele (B). Células sem infecção tempo de 24h (C). Células infectadas por 24h com conídios de *P. lilacinum* no isolado de biópsia de pele (D). Os quadrantes Q1 à Q4 demonstram o percentual de marcação 50

**Figura 25.** Géis representativos da detecção de metaloproteinases em macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> nos distintos tempos de infecção com conídios de *P. lilacinum* no isolado proveniente de biópsia de pele (A), no isolado proveniente da região nasal (B) e no isolado proveniente da região da tibia (C). 55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Pagina</b>
<b>Tabela 1.</b> Casos de hialohifomicose cutânea no período de 1977 a 2012.	8
<b>Tabela 2.</b> Porcentagem de expressão de marcadores fenotípicos de um experimento representativo em macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS <sup>-/-</sup> após infecção com conídios de <i>P. lilacinum</i> .	51
<b>Tabela 3.</b> Níveis de IFN $\alpha$ das culturas de macrófagos peritoneais murinos das linhagens iNOS <sup>-/-</sup> (KO) e selvagem (WT), após cinética de infecção com conídios de <i>P. lilacinum</i> em isolado proveniente de biopsia de pele.	55



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCC - Citotoxicidade celular dependente de anticorpo  
AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida  
APC - Alofococianina  
BDA - Batata dextrose ágar  
BSA - Albumina sérica bovina  
CD - Grupamentos de diferenciação  
CEUA - Comissão de Ética para o Uso de Animais  
CGD - Doença granulomatosa crônica  
CLR - Receptor de lectina do tipo C  
CO<sub>2</sub> - Gás carbônico  
CQB - Certificado de Qualidade em Biossegurança  
ELISA - Ensaio imunoenzimático  
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial  
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz  
FITC - Isotiocianato de fluoresceína  
ICTB - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (antigo CECAL)  
IFN- $\alpha$  - Interferon do tipo alfa  
IFN- $\gamma$  - Interferon do tipo gama  
IL - Interleucina  
iNOS - Óxido nítrico sintase induzida  
IOC - Instituto Oswaldo Cruz  
ITS - Espaçador interno transcrito  
MEA - Extrato de malte ágar  
MET - Microscopia eletrônica de transmissão  
MEV - Microscopia eletrônica de varredura  
MO - Microscopia óptica  
MR - Receptor de manose  
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NBT - *Nitroblue tetrazolium*  
NK - *Natural killer*  
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal  
NO - Óxido nítrico  
O<sub>2</sub> - Ânion superóxido  
PAMP - Padrão molecular associado à patógeno  
PBS - Solução salina tamponada com fosfato  
PCR - Reação em cadeia de polimerase  
PE - Ficoeritrina  
PRR - Receptor de reconhecimento de padrão  
SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*  
SFB - Soro fetal bovino  
SUS - Sistema Único de Saúde  
TLR - Receptor do tipo *Toll*  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

## LISTA (PARA MARCA-PÁGINAS)

ADCC - Citotoxicidade celular dependente de anticorpo  
AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida  
APC - Alofococianina  
BDA - Batata dextrose ágar  
BSA - Albumina sérica bovina  
CD - Grupamentos de diferenciação  
CEUA - Comissão de Ética para o Uso de Animais  
CGD - Doença granulomatosa crônica  
CLR - Receptor de lectina do tipo C  
CO<sub>2</sub> - Gás carbônico  
CQB - Certificado de Qualidade em Biossegurança  
ELISA - Ensaio imunoenzimático  
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial  
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz  
FITC - Isotiocianato de fluoresceína  
ICTB - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (antigo CECAL)  
IFN- $\alpha$  - Interferon do tipo alfa  
IFN- $\gamma$  - Interferon do tipo gama  
IL - Interleucina  
iNOS - Óxido nítrico sintase induzida  
IOC - Instituto Oswaldo Cruz  
ITS - Espaçador interno transcrito  
MEA - Extrato de malte ágar  
MET - Microscopia eletrônica de transmissão  
MEV - Microscopia eletrônica de varredura  
MO - Microscopia óptica  
MR - Receptor de manose  
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NBT - *Nitroblue tetrazolium*  
NK - *Natural killer*  
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal  
NO - Óxido nítrico  
O<sub>2</sub> - Ânion superóxido  
PAMP - Padrão molecular associado à patógeno  
PBS - Solução salina tamponada com fosfato  
PCR - Reação em cadeia de polimerase  
PE - Ficoeritrina  
PRR - Receptor de reconhecimento de padrão  
SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*  
SFB - Soro fetal bovino  
SUS - Sistema Único de Saúde  
TLR - Receptor do tipo *Toll*  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa



# INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Classificação taxonômica .....	1
1.2	O fungo <i>Purpureocillium lilacinum</i> .....	1
1.3	A doença hialohifomicose .....	5
1.4	O diagnóstico da hialohifomicose causada por <i>P lilacinum</i> .....	9
1.5	O tratamento da hialohifomicose causada por <i>P lilacinum</i> .....	10
1.6	Resposta imune aos fungos .....	11
1.7	O modelo experimental. ....	16
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>20</b>
3.1	Objetivo Geral .....	20
	Analisar a resposta <i>in vitro</i> frente à infecção de macrófagos murinos nocaute para o gene <i>iNOS</i> por cepas de <i>Purpureocillium lilacinum</i> . ....	20
3.2	Objetivos Específicos .....	20
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
4.1	Isolados fúngicos .....	21
4.2	Análise morfológica .....	21
4.3	Obtenção dos conídios .....	21
4.4	Obtenção dos macrófagos murinos .....	22
4.5	Interação dos conídios de <i>P. lilacinum</i> com macrófagos peritoneais murinos KO (N = 3).....	22
4.6	Análise por microscopia eletrônica de transmissão e varredura.....	23
4.7	Fenotipagem e análise por citometria de fluxo (FACS) (N = 3).....	23
4.8	Detecção de IFN $\alpha$ por ELISA (N = 1) .....	24
4.9	Ensaio de zimografia (N = 2).....	24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
5.1	Avaliação morfológica .....	26
5.2	Avaliação quantitativa da interação dos conídeos de <i>P lilacinum</i> com o modelo nocaute .....	29
5.3	Avaliação da interação de conídeos de <i>P lilacinum</i> com macrófagos de murinos selvagens por microscopia eletrônica de transmissão .....	35

5.4	Avaliação da interação de conídeos de <i>P lilacinum</i> com macrófagos de murinos selvagens por microscopia eletrônica de varredura.....	40
5.5	Expressão de marcadores fenotípicos por citofluorimetria de fluxo (FACS) no modelo transgênico .....	44
5.6	Detecção de Metaloproteinases (MMPs) por zimografia no modelo nocaute .....	50
5.7	Detecção de IFN $\alpha$ por ELISA nos modelos nocaute e selvagem .....	52
6	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
7	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>64</b>
8	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>65</b>
9	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>
10	<b>APÊNDICES E/OU ANEXOS</b>	<b>78</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Esta dissertação visa como meta principal o estudo *in vitro* da interação do fungo *Purpureocillium lilacinum* com macrófagos peritoneais murinos, normais e nocautes, e suas consequências, avaliando com isso a ativação macrofágica, bem como a infectividade daquele patógeno, com o objetivo de entender a doença hialohifomicose. Esta abordagem pode ajudar na concepção de novas intervenções profiláticas, bem como terapêuticas, seguras contra a hialohifomicose. O Laboratório de Imunologia Clínica, juntamente com os Laboratórios de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de fungos e Imunoparasitologia do IOC/FIOCRUZ, vem ao longo dos últimos anos estudando a interação desse patógeno-hospedeiro em modelos experimentais. Antes, porém, torna-se interessante uma revisão de alguns aspectos da literatura científica relacionados aos objetivos do presente trabalho.

## 1.1 Classificação taxonômica

Reino: *Fungi*

Divisão: *Ascomycota*

Classe: *Sordariomycetes*

Ordem: *Hypocreales*

Família: *Ophiocordycipitaceae*

Gênero: *Purpureocillium*

Espécie: *Purpureocillium lilacinum*

## 1.2 O fungo *Purpureocillium lilacinum*

O fungo *Purpureocillium lilacinum* foi anteriormente chamado de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (1974) pois pertencia ao gênero *Paecilomyces*, sendo muito próximo ao gênero *Penicillium* (López-Medrano et al. 2015). Mais tarde, Inglis & Tigano (2006) sugeriram que a forma sexuada estaria dentro do gênero *Byssochlamys*, e que

este fungo poderia ser classificado como pertencente ao Filo *Ascomycota* da Ordem *Hypocreales*. Em 2011, estudos morfológicos e moleculares sugeriram que *P. lilacinum* não estaria relacionado ao gênero *Paecilomyces*, tendo como base a região do espaçador interno transcrito (ITS). Assim, foi proposto que o organismo fizesse parte de um novo gênero chamado *Purpureocillium*. Sendo assim, uma nova espécie foi proposta: *Purpureocillium lilacinum* (Luangsa-Ard et al. 2011).

*P. lilacinum* é um fungo filamentosos, assexuado e hialino. Ele é considerado um fungo oportunista e negligenciado, assim como outros fungos de interesse médico, como é o caso de *Sporothrix schenckii* relatado por Freitas e colaboradores (2014) em pacientes com HIV no estado do Rio de Janeiro. *P. lilacinum* está amplamente distribuído pelo mundo e é encontrado, principalmente, como saprófita no solo e em vegetais em decomposição, mas também é descrito como parasita de insetos e nematódeos (Blackwell et al. 2000, Garbino et al. 2002). Por ser conhecido como um parasita efetivo de nematódeos causadores de doenças em plantas, *P. lilacinum* já é utilizado atualmente como agente de biocontrole ao redor do mundo (Prabhu et al. 2008). No entanto, também tem sido relatado como parasita, ou causando infecções em outros animais, como felinos e quelônios (Westenfeld et al. 1996, Li et al. 2007, Pawloski et al. 2010).

Os nematódeos parasitas de plantas causam perdas econômicas significativas. O controle químico é uma opção amplamente utilizada para acabar com essas pragas que parasitam as plantas. No entanto, os nematicidas químicos estão sendo reavaliados em relação aos danos ambientais, custos elevados, disponibilidade limitada em muitos países em desenvolvimento e a sua baixa eficácia quanto a repetidas utilizações (Dong & Zhang, 2006).

No que diz respeito à infecção humana por *P. lilacinum*, com o passar dos anos tornou-se mais frequente o relato desse fungo como contaminante proveniente do ar em espécimes clínicos, bem como em soluções consideradas estéreis, por ser este organismo resistente à maioria das técnicas comerciais de esterilização (Castro et al. 1990, Tan et al. 1992, Walsh et al. 2004). *P. lilacinum* já foi isolado em cremes anti-sépticos, em soluções de bicarbonato de sódio utilizadas como agente de neutralização para um esterilizador de hidróxido de sódio usado em lentes artificiais e em materiais clínicos e cirúrgicos, tais como catéteres e implantes plásticos (Pettit et al. 1980; Orth et al. 1996; Itin et al. 1998). Um estudo de vigilância sanitária que durou cerca de três anos mostrou que *P. lilacinum* era frequentemente encontrado no sistema de

distribuição de água de uma unidade de transplante de medula óssea (Anaissie et al., 2003). O fungo foi capaz de crescer em superfícies molhadas e úmidas de sistemas de distribuição de água formando biofilme, em conjunto com outros gêneros, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Acremonium* sp. (Anaissie et al., 2003).

*P. lilacinum* é um fungo que cresce rapidamente em meio de extrato de malte ágar (MEA), com colônias atingindo um diâmetro de 25-33 mm, após 7 dias, a 25°C e nenhum ou apenas um crescimento restrito à temperatura de 37°C. As colônias se apresentam de aspecto aveludado a flocoso, com micélio aéreo, inicialmente branco e, após esporulação, assumindo a coloração rosada à violeta (Luangsa-Ard et al., 2011) (figura 1A). O reverso da colônia pode ser incolor ou, na maioria das vezes, se apresenta na cor púrpura. Microscopicamente, podem ser observadas estruturas de reprodução assexuada, como conidióforos de 4 a 6 µm de comprimento, ocasionalmente formando frouxos sinêmios de até 2 mm de altura. São vistas também pequenas hastes (*stalks*) de parede espessa e rugosa de 3 a 4 µm de extensão, consistindo de ramificações verticiladas, com 2 a 4 fiálides. Essas fiálides, de 6 a 9 por 2,5 a 3 µm de comprimento, possuem uma porção basal dilatada e um distinto pescoço curto de aproximadamente 1 µm de comprimento. Os conídios, dispostos em cadeias divergentes, são elípticos a fusiformes, de parede lisa ou ligeiramente rugosa, hialino ou, quando em massa, na cor púrpura, medindo de 2 a 3 por 2 a 4 µm. Os clamidosporos são ausentes (Luangsa-Ard et al., 2011) (figuras 1B e 2).

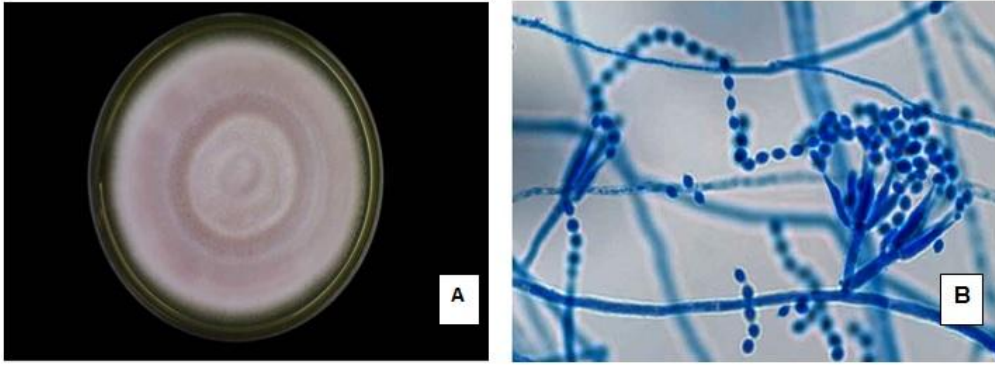


Figura 1. Macromorfologia (A) e micromorfologia (B) do fungo *P. lilacinum*.  
 Fonte <http://organicsoiltechnology.com>

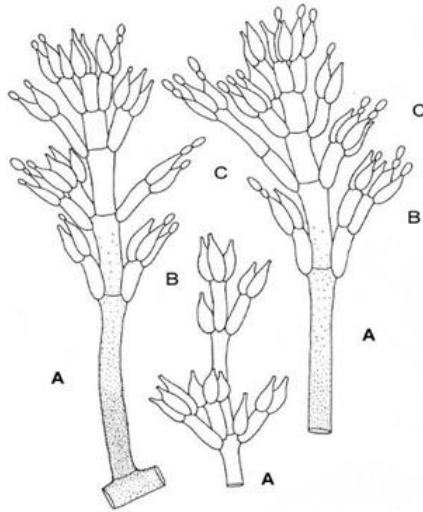


Figura 2. Representação esquemática da morfologia de *Purpureocillium lilacinum*. A- Conidióforo; B- Fiálide; C- Conídios (Samson, 1974).

### 1.3 A doença hialohifomicose

Hialohifomicose é um termo geral usado para reunir infecções humanas causadas por um grupo de fungos patogênicos que incluem, além do *P. lilacinum*, aqueles dos gêneros *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Beauveria*, *Fusarium* e *Scopulariopsis*. Esta micose se caracteriza pela presença no tecido do hospedeiro de um micélio hialino (não dematiáceo), em contraste com outros grupos cujo micélio apresenta pigmentação característica (Vartivarian et al. 1993).

Anteriormente, quando ainda pertencente ao gênero *Paecilomyces*, *P. lilacinum*, juntamente com o *Paecilomyces variotii*, eram as duas espécies de grande interesse médico responsáveis pelas infecções em humanos, sendo *P. lilacinum* o principal responsável pela maior parte dos casos diagnosticados (Williamson et al., 1992; Pintor et al., 2001; Kurzai et al., 2003; Walsh et al., 2004; Houbraken et al, 2010). No entanto, outras espécies do gênero *Paecilomyces* já foram descritas como agentes causais de hialohifomicoses, como *P. marquandii* e *P. javanicus* (Pastor & Guarro, 2006).

As principais manifestações clínicas das hialohifomicoses por *P. lilacinum* são lesões cutâneas e oculares bem como infecções subcutâneas, podendo apresentar até uma doença aguda invasiva (Antas et al. 2012). Os fatores predisponentes incluem prolongada neutropenia, especialmente em pacientes com leucemia ou aqueles transplantados, terapia com corticosteróides, quimioterapia citotóxica e em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, ou aids (Hall et al. 2004, Walsh et al. 2004). Por isso, este fungo tem sido descrito no homem como capaz de produzir doença, principalmente em pacientes imunodeprimidos (Martin et al. 2002, Hall et al. 2004). Já existem relatos desta infecção em indivíduos imunocompetentes que não teriam nenhum fator de risco predisponente identificado, como em casos de infecções cutâneas, vaginites, sinusites, onicomicoses e derrame pleural (Gucalp et al. 1996, Gutierrez et al. 1999, Carey et al. 2003, Kurzai et al. 2003, Hall et al. 2004, Gutierrez 2005, Evans et al, 2016). Pastor & Guarro (2006) revisaram que, de 119 infecções causadas por *P. lilacinum* no período de 1964 a 2004, a manifestação clínica mais frequente foi a ceratite, mas outros locais do corpo também foram afetados.



Por apresentar a possibilidade de infecção em indivíduos imunocompetentes, *P. lilacinum* é considerado um importante patógeno oportunista e emergente humano que vem afetando crianças e adultos (Tan et al. 1992, Perfect & Schell 1996, Walsh & Groll 1999, Walsh et al. 2004). O fungo penetra no organismo do hospedeiro pelo trato respiratório e pela pele, principalmente através de implantes de próteses cirúrgicas (Walsh et al. 2004). Naqueles pacientes imunocompetentes, podem causar infecções localizadas e infecções subcutâneas nodulares na pele, e nos pacientes imunodeprimidos, pode causar lesões disseminadas (Murciano et al. 1999, Gottlieb & Atkins 2001, Martin et al. 2002, Walsh et al. 2004). Porém, a maioria dos casos relatados em humanos está relacionada com infecções oculares e peritoneais em pacientes que passaram por diálise peritoneal (Gordon & Norton 1985, Walsh et al. 2004). A literatura científica tem citado casos de infecção causada por *P. lilacinum* em pacientes sem fatores predisponentes, fato este que o coloca atualmente como um fungo de grande significado médico (Gutiérrez Rodero et al. 1990, Saghrouni et al. 2013). Além disso, o relato de casos de infecção nosocomial por *P. lilacinum* em pacientes após uso de loção dermatológica aponta para o poder invasivo por via cutânea dessa espécie (Itin et al. 1998).

Grande parte dos casos de infecções causadas por *P. lilacinum* em pessoas sadias são a endoftalmite e a ceratite ocular (Mathon, 2000). As causas mais comuns dessas infecções são implantes de lente, trauma ocular, cirurgias oftálmicas e, principalmente, o uso de lentes de contatos. O caso mais recente notificado foi de um indivíduo do sexo masculino e de 56 anos, imunocompetente, com ceratomiose comprovada, onde *P. lilacinum* foi isolado por cultura do raspado córneo, e o paciente teve cura após o tratamento com cetaconazol (Sharma et al. 2015). Na verdade, esse foi o primeiro relato de ceratite por *P. lilacinum* na região do Himalaia.

As onicomicoses são definidas como infecções fúngicas ungueais de elevada frequência e representam cerca de 20% das onicopatias em todo o mundo (Ellis et al. 1997). Na Austrália, no Reino Unido e nos Estados Unidos, a prevalência é estimada em torno de 3% do total da população em geral, elevando-se para 5% com o aumento da idade após os 55 anos (Roberts 1992). Existe uma diversidade de formas clínicas de onicomicoses e seus agentes etiológicos, os quais podem ser dermatófitos, leveduras e fungos não dermatófitos. A maioria dos autores (Haneke 1991, Kenna & Elewaski, 1996, Perca et al. 2000) diagnostica como agentes mais frequentes os dermatófitos (80 a 90%), seguidos pelas leveduras (5 a 17%) e, por fim, os fungos

filamentosos não dermatófitos (2 a 12%). Estes últimos, quando isolados de unhas, constituem uma longa lista, mas apenas algumas espécies são causadoras de onicomicoses, as quais incluem *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Scytalidium* sp., *Onychocola canadensis* e *P. lilacinum* (Araújo et al. 2013). Porém, somente três são os relatos na literatura científica de onicomicoses causadas por *P. lilacinum* (Fletcher et al. 1998, Innocenti et al. 2011, Evans et al, 2016). Evans e colaboradores (2016) descreveram um interessante caso de uma senhora de 65 anos com uma infecção fúngica para a qual havia sido feita uma cultura do material extraído da unha, e posteriormente identificado como *P. lilacinum*.

A sinusite fúngica é uma infecção comum, que vem aumentando no decorrer dos anos, e que pode ser classificada como invasiva e não invasiva. Na forma invasiva, pode-se observar presença de hifas dentro da mucosa, submucosa, ossos, sangue e nos seios paranasais (American Academy of Otolaryngology, 2002). Os fungos do genero *Aspergillus* são os que mais ocasionam a sinusite fúngica, embora essa infecção já tenha sido descrita ter por etiologia uma grande variedade de fungos (Wong et al. 2012). Até o momento, já foram relatados cinco casos de sinusite fúngica devido a *P. lilacinum* (Rockhill & Klein 1980, Rowley & Strom 1982, Gucalp et al. 1996, Nayak et al. 2000, Van Shoonveld et al. 2008). O primeiro caso foi de uma mulher iraquiana de 20 anos, a qual viveu no Reino Unido durante 5 anos (Wong et al. 2012). Na admissão, a paciente apresentava rinorréia, hiposmia e obstrução nasal, porém se apresentava em boa forma física e não tinha histórico médico significativo. Ao exame radiológico, revelou-se uma infecção fúngica, que mais tarde foi identificada por exame citológico como sendo causada por *P. lilacinum* (Wong et al. 2012).

Interessantemente, o primeiro caso descrito de hialohifomicose cutânea relacionado ao *P. lilacinum* foi no final dos anos 70 (Takayasu et al. 1977) e, até 2012, apenas 8 casos adicionais haviam sido relatados em todo o mundo (Tabela 1). Naqueles estudos, as lesões cutâneas se apresentaram como eritemas, máculas, pápulas, vesículas e nódulos subcutâneos (Takayasu et al. 1997, Gutiérrez Rodero et al. 1999, Zendri et al. 2006, Bassiri Jahromi & Khaksarlra, 2007). Por não apresentarem uma resolução espontânea e, por ser necessário um tratamento específico e eficaz, essas lesões podem permanecer por longos períodos (Saghrouni et al. 2013).

Tabela 1. Casos de hialohifomicose cutânea causada por *P. lilacinum* no período de 1977 a 2012.

Ano	País	Idade (y) / sexo	Trauma	Manifestação clínica	Localização	Tratamento	Resultado
1977	Japão	20 / F	N / D	Placas escamosas eritematosas	Face	Criseofulvina	Cura parcial
1984	Coreia	19 / F	N / D	Placa escamosa eritematosa	Face	Criseofulvin Ketoconazole	Cura
1997	EUA	86 / M	N / D	Eritema - Pústulas	Dedo	Itraconazol	Cura
1999	Espanha	36 / M	Nenhum	Placa escamosa eritematosa	Perna	Itraconazol	Cura
2001	Austrália	59 / F	Trauma secundário	Eritema - Nódulo - Secreção purulenta	Perna	Itraconazol	Cura
2004	EUA	65 / M	Nenhum	Placa eritematosa - Pápulas com crostas	Antebraço	Fluconazol / Excisão	N / D
2006	Itália	59 / M	Mordida de cachorro	Placas eritematosas	Perna	Itraconazol	Cura
2007	Irã	30 / F	Nenhum	Placa escamosa eritematosa	Antebraço	Cetoconazol	Cura
2012	Tunísia	8 / F	Nenhum	Placa escamosa eritematosa	Face	Voriconazol	Cura

F = feminino, M = Masculino, N/D = Sem dados

Fonte: Saghrouni et al. 2013.

No Brasil, há poucos relatos de infecções causadas por este fungo, não por estarem ausentes da microbiota do país, mas pelo desconhecimento do agente etiológico e sua dificuldade de isolamento (Castro et al. 1990, Hofling-Lima et al. 2005). Associa-se também o fato desta doença não ser de notificação compulsória pelo SUS (Portaria Nº 1.271, de 6 de junho de 2014). Interessantemente, um estudo analisou a frequência e a etiologia das doenças oculares micóticas diagnosticadas por cultura e os fatores associados às ceratites fúngicas, onde foi demonstrado o predomínio de infecções por fungos filamentosos, dentre eles *P. lilacinum*, sobre as leveduras (Hofling-Lima et al 2005). Entretanto, a literatura científica vem destacando casos de infecções por *P. lilacinum* ocorridos ao longo dos anos (Minogue et al. 1984, Castro et al. 1990, Silliman et al. 1992, Tan et al. 1992, Itin et al. 1998, Garbino et al. 2002, Martin et al. 2002, Carey et al. 2003, Hall et al. 2004). Carey e colaboradores (2003) demonstraram um aumento no número de casos de infecções por *P. lilacinum* em pacientes imunocompetentes, chegando a registrar mais de um caso por ano entre 1996 e 2002.

#### **1.4 O diagnóstico da hialohifomicose causada por *P. lilacinum***

A detecção da infecção por *P. lilacinum* é realizada por características morfológicas do agente etiológico isolado em cultura, e também pelo aspecto característico na histologia das lesões (Liu et al. 1998; Pastor & Guarro, 2006). É uma identificação de certa forma bem complicada, pois se fazem necessários profissionais que tenham conhecimento acerca dos fungos causadores da hialohifomicose, já que a análise é feita pelas características morfológicas fúngicas associadas à histopatologia das lesões. O padrão-ouro para a identificação do fungo é a cultura positiva, mas o diagnóstico presuntivo baseado nas características histológicas é considerado de grande valor, já que os resultados histopatológicos podem ser obtidos mais rápido que o cultivo do fungo (Liu et al. 1998).

Métodos moleculares podem ser utilizados para obter resultados mais rápidos e precisos, como o sequenciamento utilizando alvos ITS, PCR em tempo real e outros alvos espécie-específicos (Atkins et al. 2005; Houbraken et al. 2010). Essas técnicas chegaram para auxiliar a difícil identificação desse fungo, que em alguns casos crescem de forma atípica, como naquele primeiro caso relatado de doença pulmonar

cavitária causada por *P. lilacinum* em uma senhora de 80 anos, onde o isolado fúngico apresentou características microscópicas semelhantes a *Acremonium* spp. e a *Fusarium* spp. (Khan et al. 2014).

### **1.5 O tratamento da hialohifomicose causada por *P. lilacinum***

Como já foi foco de um extenso levantamento bibliográfico feito também pelo autor desta dissertação, o manejo desta enfermidade fúngica ainda é bastante discutido e por isso muito controverso (Antas et al. 2012). Infelizmente, ainda não se preconiza um tratamento considerado ideal para as infecções causadas por *P. lilacinum*. Em alguns casos, há uma real necessidade de intervenção cirúrgica, associada ao uso de anti-fúngicos (Kurzai et al. 2003; Pastor & Guarro, 2006; Permi et al. 2011; Antas et al. 2012). Alguns fármacos, como a anfotericina B, a flucitosina, o fluconazol, o miconazol e o itraconazol, apresentam baixa efetividade em casos de hialohifomicose cutânea, sub-cutânea e ocular. Porém, os novos azólicos, como o voriconazol e o posaconazol, apresentam melhores resultados com maiores índices de cura, mas seus custos elevados, associado à dificuldade de se encontrar essas farmacos, inviabilizam o tratamento para muitos pacientes (Deng et al. 2009; Wu et al. 2010; Antas et al. 2012). Huang e colaboradores (2011) relataram um caso de infecção cutânea por *P. lilacinum* que respondeu positivamente ao tratamento com voriconazol associado à aplicação tópica de nistatina. Já Evans e colaboradores (2016) relataram o sucesso no tratamento de onicomicose utilizando efinaconazol com a ajuda de aplicação tópica de tavabolrole por 2 semanas.

Em pacientes com aids, o tratamento se torna ainda mais complicado, pois alguns azólicos, como o voriconazol, podem interferir no resultado esperado de qual que seja o esquema de antirretroviral empregado. Essa dificuldade foi demonstrada no relato de caso *P. lilacinum* A resistência adquirida por *P. lilacinum* a muitos anti-fúngicos já é bastante conhecida, e nesse caso, tratamentos mais radicais, como intervenções cirúrgicas se fazem necessárias (Ding et al. 2014). Malecha e colaboradores (2006) descreveram um caso de ceratite em um paciente de 62 anos, no qual foi necessário realizar uma ceratoplastia. Em sequência, injeções de anfotericina B intravitreal, miconazol tópico e fluconazol sistêmico foram utilizados para a completa erradicação

do fungo. Outro caso de ceratite foi mais tarde relatado por Maier e colaboradores (2011), novamente apontando a premente necessidade de tratamento com o anti-fúngico voriconazol, associado a ceratoplastia.

Em síntese, muitos casos clínicos relatados de hialohifomicose por *P. lilacinum* responderam bem à terapia azólica sistêmica apenas, ou em associação com drenagem cirúrgica e/ou remoção de próteses (Wessollosky et al. 2008). No geral, o tratamento com agentes anti-fúngicos orais, mas sem intervenção cirúrgica, tem sido eficiente somente para indivíduos imunocompetentes (Gottlieb & Atkins, 2001).

## **1.6 Resposta imune aos fungos**

Os últimos avanços da medicina têm melhorado a prevenção, o diagnóstico e as terapias para uma variedade de doenças. No entanto, certas intervenções que envolvem, principalmente, o uso de procedimentos cirúrgicos invasivos, próteses ou agentes quimioterápicos estão associados a medicamentos que induzem a imunossupressão, tornando assim o hospedeiro vulnerável a um grande grupo de fungos oportunistas (Perfect & Schell 1996). Diante do exposto, os fungos oportunistas têm emergido com grande frequência como causa importante de morbidade e mortalidade. Possuem virulência baixa e, sendo assim, para invadir um hospedeiro necessitam que o mesmo esteja com suas defesas imunológicas diminuídas para que se estabeleça uma infecção. O aumento destas micoses emergentes está em associação com o aumento do número de pacientes imunodeprimidos por enfermidades ou certas condições (Montiel 2004). Pela verificação da relação entre imunocomprometimento e doença, pode-se especular a importância da resposta imune no controle da infecção. Neste contexto, estudos já demonstraram a infecção por *P. lilacinum* em crianças portadoras de doença granulomatosa crônica (CGD) (Silliman et al. 1992, Williamson et al. 1992). Esta desordem de origem genética, e, portanto, de caráter hereditário, produz um defeito na capacidade de fagocitose e destruição de patógenos intracelulares por células das linhagens granulo e monocítica. Em consequência, os processos de fagocitose e atividade microbicida são deficientes, e o paciente tem predisposição a infecções de repetição.

A resposta imune à invasão fúngica pode variar entre aqueles mecanismos naturais de proteção que estavam presentes no início da evolução dos organismos multicelulares (imunidade inata), e aos demais mecanismos adaptativos que são induzidos especificamente durante a infecção (imunidade adquirida) (Romani, 2004).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra os organismos invasores. Nos últimos anos, uma atenção maior está sendo dada a esse mecanismo, pois além de distinguir o que é auto-imune ou não, ela ativa os sinais específicos (Medzhitov & Janeway 1997, Romani, 2004). As barreiras físicas que separam os organismos superiores do meio ambiente, como a pele e as membranas mucosas dos trato respiratório, gastrointestinal e gênito-urinário, são consideradas os primeiros mecanismos de defesa da resposta imune inata (Romani, 2004). Quando o fungo consegue passar por estas barreiras físicas, os mesmos encontram uma série de mecanismos de defesa, incluindo as membranas celulares, receptores celulares e vários fatores humorais. Os fungos são reconhecidos pelas células do sistema imune inato (neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células NK) que vão se ligar aos componentes da parede celular fúngica, a qual utiliza os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) na sua superfície (Ibrahim-Granet et al. 2003). Outras células, como os linfócitos B e T e células endoteliais, também participam do processo. Os receptores de lectina do tipo C (CLRs) são PRRs particularmente importantes na imunidade anti-fúngica, embora também estejam envolvidos vários outros PRRs, incluindo os receptores de manose (MRs) e os receptores do tipo *Toll* (TLRs), que são receptores celulares que auxiliam no reconhecimento de microrganismos patogênicos, e subsequentemente, na resposta inflamatória em vertebrados (Janeway & Medzhitov, 2002, Roeder et al. 2004 e Romani, 2004). TLRs, bem como outros PRRs, conferem reconhecimento dos PAMPs e sua sinalização provoca a síntese e liberação das citocinas pró e anti-inflamatórias, como a produção de IL-10 mediada por TLR2, assim como indução da expressão de moléculas co-estimulatórias, promovendo a ativação da imunidade adquirida durante a apresentação do antígeno. A ativação simultânea de múltiplos PRRs por um patógeno fúngico faz com que o sistema imune apresente uma maior variedade de possibilidades de uma resposta imune específica e eficaz (Roeder et al. 2004). De fato, os PAMPs estão presentes em diferentes células invasoras.

Infecções bacterianas e virais têm sido o foco principal da grande maioria das pesquisas básica e clínica, mas pouco ainda se sabe sobre a função dos TLRs contra a

ação de fungos patogênicos, embora a sua participação na defesa contra *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis* spp. e *Coccidioides* spp. venha sendo relatada (Wang et al. 2001, Netea et al. 2002, Meier et al. 2003, Netea et al. 2006). Em contraste, vários estudos demonstraram que os agentes patogênicos são capazes de manipular ou escapar ao reconhecimento imune inato. Uma dessas formas, resultando em um forte perfil de citocinas anti-inflamatórias, pode ser um mecanismo de escape à defesa do hospedeiro (Netea et al. 2006).

Também vale ressaltar a grande importância das defensinas ou peptídeos catiônicos antimicrobianos na defesa do hospedeiro. As defensinas são moléculas efetoras do sistema imune inato, e possuem ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e -negativas, e também contra fungos (Steinstraesser et al. 2008). Além disso, elas desempenham provavelmente um papel chave na ativação e mediação da resposta imune inata, bem como na resposta imune adquirida. (Aerts et al. 2008; Steinstraesser et al. 2008). Defensinas são importantes, pois têm uma influência direta sobre as respostas imunes adquiridas por ativar diferentes fatores imunes, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina (IL)-1, e o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (Ganz, 2003). Além disso, durante a fagocitose dos fungos pelas células do hospedeiro, estas proteínas induzem a geração de superóxido, de radicais intermediários de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), e outras substâncias relacionadas que podem ser letais para os patógenos.

Após o reconhecimento dos fungos por PRRs, sua internalização, sua apresentação antigênica e recrutamento de células efetoras, o ápice resulta na geração de respostas imunes adquiridas dos tipos Th1 e Th17, e na ativação de células efetoras inatas. Sendo assim, os macrófagos constituem um dos mecanismos celulares primários contra a invasão de um parasito no tecido do hospedeiro, pois fagocitam o microrganismo invasor, isolando-o num fagossoma, para posterior digestão intracelular pelos lisossomos (Ibrahim-Granet et al. 2003). No entanto, alguns patógenos são conhecidos por serem capazes de escapar da destruição pelas hidrolases (Ibrahim-Granet et al. 2003). As propriedades fagocíticas e microbicidas dos macrófagos podem ser moduladas por receptores específicos de membrana envolvidos na interação entre a célula do hospedeiro e o microrganismo (Popi Af et al. 2002, Alvarez & Casadevall 2007). Além disso, células efetoras adicionais, incluindo neutrófilos e monócitos, são recrutadas para sítios de infecção pela ação de sinais inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e componentes do sistema complemento (Sholam & Levitz



2005). As quimiocinas têm a função de regular uma variedade de atividades biológicas para além da quimiotaxia, como a hematopoiese, angiogênese, indução de outras citocinas, a apresentação de antígenos e a diferenciação de células (O'Garra et al., 1998, Murphy et al., 2000, Rossi & Zlotnik, 2000, Zlotnik & Yoshie, 2000; Traynor & Huffnagle, 2001). Todas estas atividades são importantes em infecções fúngicas agudas.

O mecanismo de defesa do hospedeiro pode adaptar-se a diferentes tipos de infecções fúngicas. De fato, os macrófagos são as principais células envolvidas na morte dos fungos durante a infecção por *Cryptococcus* spp. e *Pneumocystis* spp., enquanto que os neutrófilos são as células efetoras principais na prevenção da infecção por *C. albicans* e *A. fumigatus* (Traynor & Huffnagle, 2001). Com isso, desordens quantitativas e qualitativas na função fagocítica do hospedeiro o predispõem ao desenvolvimento de aspergilose e candidíase invasivas (Netea et al. 2002). Problemas na imunidade mediada por células predispõem os pacientes a criptococose, histoplasmose, coccidioidomicose e candidíase mucocutânea. Uma resposta inflamatória exacerbada aos antígenos fúngicos pode resultar em morbidade e mortalidade devido aos danos ao tecido do hospedeiro (Levitz 1992).

*C. albicans* induz imunossupressão via produção de IL-10 mediada por TLR2, e isto conduz à geração de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, sendo estas células T reguladoras com potencial imunossupressor (Netea et al. 2006). Este mecanismo desloca, assim, o equilíbrio imune no sentido de um perfil do tipo Th2. Já *A. fumigatus* escapa do reconhecimento imunológico por germinação de hifas, com perda subsequente do reconhecimento de TLR4 (Netea et al., 2002).

As respostas imunes humoral e celular, ambas importantes para defesa do hospedeiro contra infecções, têm sido motivo de controvérsia no campo da micologia médica. Por um longo tempo, foi considerado que a imunidade mediada por células conseguiria proteger o hospedeiro contra certos fungos, enquanto que a imunidade humoral não apresentava nenhum tipo de proteção (Casadevall, 1995, Polonelli et al. 2000). No entanto, durante as últimas décadas, tem sido demonstrado que a imunidade humoral também pode proteger contra a infecção fúngica, se certos tipos de anticorpos estão disponíveis em quantidade suficiente. As principais funções reconhecidas de anticorpos em infecções fúngicas incluem a prevenção da aderência, a neutralização de toxinas, a opsonização por meio de fragmentos do complemento na superfície fúngica, permitindo assim a fagocitose, e citotoxicidade celular dependente de

anticorpo (ADCC) (Polonelli et al. 2000). Um estudo demonstrou a identificação de anticorpos protetores e não protetores, tanto para *C. neoformans*, como para *C. albicans*, indicando que a resposta humoral para esses fungos era capaz de induzir anticorpos de eficácia variável (Casadevall, 1995).

De um modo geral, a resposta celular tipo Th1 é necessária contra uma infecção fúngica, enquanto a resposta imune tipo Th2 geralmente resulta em susceptibilidade a infecções ou alergias (Traynor & Huffnagle, 2001). Células com perfil Th1 produzem predominantemente citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN- $\gamma$ , promovem a imunidade mediada por células, a indução de anticorpos do tipo IgG2a em camundongos e a ativação dos fagócitos frente a infecções fúngicas. Em contraste, as células com perfil Th2 produzem majoritariamente citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-5 e IL-13, e induzem a produção de anticorpos anti-fúngicos (Traynor & Huffnagle, 2001, Cramer & Blaser, 2002; Bellocchio et al. 2005).

Os mecanismos de defesa contra infecções relacionadas a *P. lilacinum*, tanto no que diz respeito à produção de NO, como os mecanismos envolvidos na fagocitose deste fungo, são pouco relatados. No entanto, um estudo de nosso grupo demonstrou que três isolados clínicos de *P. lilacinum* foram capazes de sobreviver dentro de fagócitos, e que macrófagos peritoneais murinos foram mais sensíveis ao fungo, do que as células da linhagem murina J774 (Peixoto et al. 2010). A literatura descreve que as características clínicas e morfológicas, bem como a resposta à terapia antifúngica, em um caso descrito de um paciente com aids com infecção disseminada por este fungo, foram similares aos casos registrados de infecção devido a *Penicillium marneffe*, outro fungo oportunista (Lovell et al. 2002).

Neste mesmo contexto, dois estudos já demonstraram a infecção por *P. lilacinum* em crianças portadoras de CGD (Silliman et al. 1992, Williamson et al. 1992). O primeiro deles, relatado em 1992 por Silliman e colaboradores descreve uma criança com 4 anos de idade, em quem a CGD foi diagnosticada aos 7 meses de idade por um teste normal de *Nitroblue tetrazolium* (NBT). Ela apresentou ao decorrer dos meses várias infecções sendo isolado tanto *A. fumigatus* quanto o gênero *Penicillium*. O paciente foi tratado com Anfotericina B. Após meses de tratamento o paciente veio a falecer devido a uma complicação por aspergilose. Após a morte a cultura foi encaminhada ao Centro de Controle de Doenças para determinação da espécie e lá foi identificada como *Paecilomyces lilacinus* (Thorn) Samson, 1974 (*Penicillium lilacinus*). Já Williamson também em 1992, relatou o caso de um menino de 8 anos de idade que

desenvolveu uma infecção dos tecidos moles do calcanhar direito após andar de moto (*scooter*). A cultura da biópsia do tecido mole mostrou elementos e hifa identificado como sendo *Paecilomyces varioti*. A infecção foi tratada com anfotericina B durante sete semanas seguida de um ano de tratamento com itraconazol. O paciente apresentou cura completa após 10 meses do tratamento (Silliman et al. 1992, Williamson et al. 1992).

### 1.7 O modelo experimental.

A CGD é uma doença grave causada por um defeito congênito no fagócito, que se traduz na produção reduzida da NADPH oxidase, e assim de ânions superóxidos e de espécies reativas (Jackson et al. 1995). A enfermidade é caracterizada por infecções graves e fatais, e também pela formação periódica de granulomas de origem bacteriana e fúngica no tecido do hospedeiro. Desde 1995, vem sendo utilizado um modelo de camundongo que simula a CGD humana, via deleção do gene *p47phox*, um dos responsáveis pelas mutações que causam a CGD nos pacientes afetados (Jackson et al. 1995). Idênticos ao caso em CGD humano, os leucócitos dos animais *p47phox*<sup>-/-</sup> não produziram qualquer espécie de superóxido, e por conseguinte, mostraram ser ineficazes contra *Staphylococcus* sp. (Bradfield et al. 1993, Pollock et al. 1995). Os camundongos *p47phox*<sup>-/-</sup> desenvolveram infecções letais e inflamação granulomatosa similar àquela encontrada em pacientes sofrendo de CGD. Assim, este modelo corrobora o papel crítico da NADPH na defesa do hospedeiro (Jackson et al. 1995). Como o camundongo *p47phox*<sup>-/-</sup> exibe um fenótipo similar àquele da CGD, o mesmo parece ser um modelo excelente para o estudo de infecções fúngicas. Isto foi comprovado quando camundongos *p47phox*<sup>-/-</sup> mostraram ser altamente susceptíveis ao desafio intra-traqueal com *A. fumigatus*, visto que os animais selvagens foram bem mais resistentes (Dennis et al. 2006). Lesões pio-granulomatosas mostraram na histopatologia do pulmão hifas invasivas, com necrose coagulativa. A avaliação da carga fúngica no pulmão por PCR quantitativo não mostrou nenhuma diferença significativa entre grupos testados durante o tratamento com fungicida (Dennis et al. 2006). Assim, aqueles resultados também mostraram a eficácia superior de anfotericina

B após o desafio de *A. fumigatus*, e igualmente demonstraram características originais de camundongos p47phox<sup>-/-</sup> como um modelo para aspergilose experimental.

Sabe-se que muitas células do hospedeiro são capazes de sintetizar o NO através de hemeoproteínas chamadas de óxido nítrico sintases (NOS). Estas enzimas são dependentes de O<sub>2</sub>, NADPH, flavinas e biopterinas para se tornarem ativas. O NO desempenha importante papel na função vascular durante as respostas inflamatórias, reduzindo a agregação e aderência plaquetárias, inibindo características da inflamação induzida por mastócitos, e servindo como regulador do recrutamento de leucócitos (Robbins, 2000). O NO também atua na resposta imune do indivíduo frente às infecções, apresentando atividade antimicrobiana e aumentando sua produção durante a defesa do hospedeiro. Interessantemente, a inativação genética da variante induzida (iNOS) aumenta a replicação microbiana em animais de laboratório. Níveis altos de produção de NO parecem limitar a replicação de helmintos, bactérias, protozoários, vírus e fungos, bem como células tumorais, sob risco de lesão inflamatória intensa das células e tecidos do hospedeiro (Robbins 2000). São conhecidos até o momento três tipos funcionais de enzimas NOS: as constitutivas, representadas pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou Isoforma III) e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou Isoforma I), e a induzida, esta representada pela óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou Isoforma II) (Nathan & Xie, 1994). No ser humano, as três variantes apresentam estruturas semelhantes, mas são reguladas de modos diversos por genes localizados nos cromossomos 7 (nNOS ou Isoforma I), 12 (iNOS ou Isoforma II) e 17 (eNOS ou Isoforma III) (Flora & Zilberstein, 2000). As duas primeiras são dependentes de Ca<sup>2+</sup> e agem por curtos períodos de tempo em diferentes tipos celulares, como o endotélio e neurônio (Flora & Zilberstein, 2000). A iNOS produz NO por longos períodos, sugerindo que assim venha a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Essa enzima tem atividade independente de Ca<sup>2+</sup>, e é expressa em resposta a estímulos apropriados sobre macrófagos, neutrófilos, células musculares lisas vasculares, cardiomiócitos e células de Schwann (Nathan, 1992). A ativação da iNOS induz a produção de NO pelos macrófagos, importante mecanismo de destruição de parasitos intracelulares (Silva et al, 1995). Ainda se considerando o papel de citocinas pró-inflamatórias na regulação da síntese de nitrito por células da resposta imunológica, seria possível que os níveis de nitrito em culturas de macrófagos possam ser atribuídos à capacidade destas células expressarem iNOS (Silva et al, 1995).

Nosso interesse em conhecer a interação fungo-hospedeiro *in vitro* utilizando o modelo murino nocaute do gene iNOS é justificado pela escassez de estudos sobre a virulência e o papel da resposta imune do hospedeiro frente a isolados de *P. lilacinum*. No Brasil, nosso grupo é um dos pioneiros em pesquisas com esse fungo, e trabalhos anteriores utilizando os modelos murinos das linhagens *inbred* C57BL/6 e BALB/c imunocompetente e imunossuprimido, forneceram importantes dados acerca da virulência de dois isolados desse fungo (Brito et al. 2011, Sequeira 2012). Complementando esses estudos, também foram realizados testes *in vitro* da interação de macrófagos de camundongos C57BL/6 com conídios de *P. lilacinum* provenientes de três diferentes casos clínicos de hialohifomicose (Peixoto et al. 2010), os quais forneceram dados importantes sobre a dinâmica da célula fúngica no interior dos fagócitos.

Assim, este estudo *in vitro* adicional, agora utilizando um modelo murino deficiente da produção de NO com o mesmo *background* genético do estudo de Peixoto e colaboradores (2010) e também frente aos três diferentes isolados de *P. lilacinum* oriundos de casos humanos com distintas formas clínicas de hialohifomicose, ampliará o conhecimento da relação parasita-hospedeiro e seus mecanismos de resistência e susceptibilidade, para que sejam usados a fim de aperfeiçoar o entendimento clínico, no intuito de tentar identificar os mecanismos específicos que podem conferir proteção contra esta infecção e/ou doença.

## 2 JUSTIFICATIVA

Não há muitos dados na literatura científica sobre a virulência e a infectividade de diferentes isolados humanos desse fungo. Também é de pouco conhecimento o tamanho do inóculo envolvido nas formas clínicas da infecção, a resposta imune do hospedeiro, entre outros, o que justifica por si só o interesse por esses estudos com intuito de entender melhor o mecanismo de invasão e a resposta imunológica.

A investigação de patógenos de grande importância na imunidade celular utilizando animais imunocomprometidos pode vir a colaborar na descoberta de novas intervenções profiláticas, terapêuticas e fins de diagnóstico mais seguro, mais preciso e principalmente mais rápido. Essa investigação pode beneficiar não só os indivíduos imunodeprimidos, mas também aqueles imunocompetentes.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo Geral

**Analisar a resposta *in vitro* frente à infecção de macrófagos murinos nocaute para o gene *iNOS* por cepas de *Purpureocillium lilacinum*.**

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Reproduzir a metodologia de isolamento e obtenção de conídios de *Purpureocillium lilacinum* em três isolados clínicos;
- Padronizar a técnica de obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos nocaute para o gene *iNOS*;
- Analisar a infecção de macrófagos murinos nocaute para o gene *iNOS* por três isolados de *Purpureocillium lilacinum* por microscopia óptica e por técnicas imunológicas;
- Analisar a interação *in vitro* fungo-macrófago de animais selvagens pela técnica de microscopia eletrônica.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Isolados fúngicos**

Os três isolados utilizados neste estudo foram provenientes de casos clínicos humanos comprovados de hialohifomicose por *Purpureocillium lilacinum*: (a) isolado subcutâneo de lesão na área da tíbia (Kurzai et al, 2003), (b) isolado do seio nasal, e (c) isolado de biopsia de pele. Os isolados b e c foram gentilmente cedidos pela Dra. Annette W. Fothergill (*Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, EUA*). Todas as culturas foram mantidas em meio batata dextrose ágar (BDA, Difco, MI, EUA) no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos – IOC, Fiocruz e estão depositados na coleção de cultura de fungos do referido instituto.

### **4.2 Análise morfológica**

A análise das características morfológicas dos isolados foi realizada por meio da observação macroscópica do crescimento das colônias em placas de Petri, contendo meio BDA, por 14 dias a temperatura ambiente. Após esse período de crescimento, foi realizado o microcultivo em extrato de malte ágar (MEA), com o propósito de fazer uma análise minuciosa da micromorfologia (Riddell, 1950). As lâminas foram coradas com Lactonefol de Amann, acrescido de azul de algodão, e foram observadas em microscópio óptico (Zeiss, modelo Axiophot, Alemanha) no aumento de 1000x.

### **4.3 Obtenção dos conídios**

Os conídios de *P. lilacinum* foram obtidos pelo crescimento dos isolados em meio BDA, à temperatura ambiente, por sete dias. Aos conídios produzidos, foram adicionados 5 mL de salina tamponada com fosfato (PBS 50mM, pH 7,2). Em seguida, o tubo foi homogeneizado com pipeta de 1 mL, colocado em gelo por 5 minutos, agitado em vórtex por 3 minutos, colocado em água morna na estufa à 37°C, centrifugado por 1 minuto a 500 rpm. O sobrenadante foi coletado, os conídios foram contados em hemocitômetro (câmara de Neubauer).



#### **4.4 Obtenção dos macrófagos murinos**

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 recém-desmamados (21 dias), selvagens (WT) ou deficientes da enzima iNOS (KO), pesando entre 11 e 15 g. Esses camundongos foram obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB / Fiocruz), mantidos em gaiolas individuais, em condições padronizadas de temperatura e luminosidade. Os camundongos foram submetidos à eutanásia por inalação de CO<sub>2</sub>. Após, a pele abdominal dos animais foi rompida com a ajuda de pinças dente de rato, no interior de cabine de segurança biológica, e em seguida foi injetado no interior do peritônio, 3 mL de meio RPMI-1640 estéril (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA). Cuidadosamente, o peritônio foi massageado para, em seguida, todo o material ser aspirado e transferido para tubo estéril, contendo meio completo (RPMI-1640 + 10% de soro fetal bovino), em banho de gelo. As células foram contadas em hemocítômetro. Esse experimento foi licenciado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA / Fiocruz), sob o número de licença LW-4/10, e pela Comissão de Ética para Uso de Animais de Laboratórios do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA / IOC), sob o número de licença L-014/2016. Adicionalmente, e como o trabalho envolve a utilização de camundongos geneticamente modificados (AnGM), o mesmo foi encaminhado para a Comissão Interna de Biossegurança do Instituto Oswaldo Cruz, e licenciado sob o número de CQB 105/99.

#### **4.5 Interação dos conídios de *P. lilacinum* com macrófagos peritoneais murinos KO (N = 3)**

Os conídios de *P. lilacinum* recém isolados foram incubados com macrófagos murinos em câmaras do tipo LabTek (Nalge Nunc International, Rochester, NY, EUA) de 8 poços, contendo meio completo, na proporção de 2:1 (Peixoto et al. 2010) (conídios:macrófago), em diferentes tempos de infecção (30min, 1h, 2h, 4h, 6h 14h, 24h e 48h). As câmaras após a infecção foram mantidas a 37°C, sob atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final do tempo de infecção, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem de citocinas e detecção de metaloptoteinase (MMP). As câmaras contendo o resultado da interação foram lavadas com PBS (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD, EUA) à temperatura ambiente,

fixadas com metanol (v/v) por 3 minutos, coradas com Wright-Giemsa (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) durante 8 minutos de acordo com Vieira (2008), e posteriormente, analisadas em microscópio óptico no aumento de 1000x.

#### **4.6 Análise por microscopia eletrônica de transmissão e varredura**

Os macrófagos murinos WT interagindo com os conídios de *P. lilacinum* em garrafas de cultura de células de poliestireno com 25 cm<sup>2</sup> com tampa sem filtro (Corning, NY, EUA), nos tempos de 30 min, 1h e 5h, bem como o grupo controle (macrófagos sem infecção), foram fixados por 1h a 4°C com 2,5% de glutaraldeído em tampão MET (cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 com 3,5% de sacarose). Em seguida, as células foram lavadas em tampão MET e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão MET a 0,1M. Após estes procedimentos, foram lavadas em tampão MET e o material desidratado por 10 minutos em concentrações crescentes de 30, 50, 70, 90 e 100% de acetona, para logo após ser infiltrado e incluído em resina PolyBed 812 (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA) e polimerizado a 60°C por 3 dias. Os blocos foram cortados em ultramicrótomo, a contrastação foi feita com acetato de uranila e citrato de chumbo, e as análises realizadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo JEM-1011 (JEOL Inc., Peabody, MA, EUA) e microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-6390LV (JEOL Inc., Peabody, MA, EUA), disponíveis na Plataforma Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz.

#### **4.7 Fenotipagem e análise por citometria de fluxo (FACS) (N = 3)**

Os macrófagos murinos KO foram infectados em tubos de poliestireno (Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) contendo meio completo nos tempos de 14h e 24h de incubação, foram submetidos a marcação de superfície para as moléculas constitutivas CD14<sup>+</sup> e CD38<sup>+</sup> (marcadores de macrófagos), para as integrinas CD11b e CD18, e para os perfis de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86. As colorações seguiram a seguinte estratégia: duplas marcações de CD11b e CD86, duplas marcações de CD18 e CD38, e duplas marcações de CD14 e CD80. Após esse período, foi adicionado um tampão de coloração gelado (tampão FACS: PBS, 1% SFB, 0,01% azida sódica), os tubos foram centrifugados em 2000 rpm a 4°C por 10 minutos, e foi descartado o

sobrenadante. As células foram coradas para os marcadores de superfície pela adição de 3 µL/amostra de anticorpos monoclonais conjugados (anti-mCD14-PE, anti-mCD38-PE-Cy5, anti-mCD11b-PE-Cy5, anti-mCD18-PE, anti-mCD80-APC ou anti-mCD86-FITC, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), suspensas em 50 µL de tampão FACS, homogeneizadas e incubadas a 4°C por 30 minutos no escuro. Após duas lavagens com tampão FACS as células foram fixadas por incubação com 200 µL de paraformaldeído 1% durante 10 minutos em temperatura ambiente protegidas da luz e com leve agitação. A leitura foi feita através de citofluorímetro de fluxo modelo Cyan (Beckman Coulter, CO, EUA) disponível na Plataforma Multiusuário de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz. Nos controles para as marcações inespecíficas, foram descontadas aquelas colorações espontâneas das células não infectadas (*Background*). Utilizamos o *gate* morfológico de macrófagos, onde foram adquiridos 10.000 eventos, e a análise do resultado foi feita no programa Flowjo.

#### **4.8 Detecção de IFN $\alpha$ por ELISA (N = 1)**

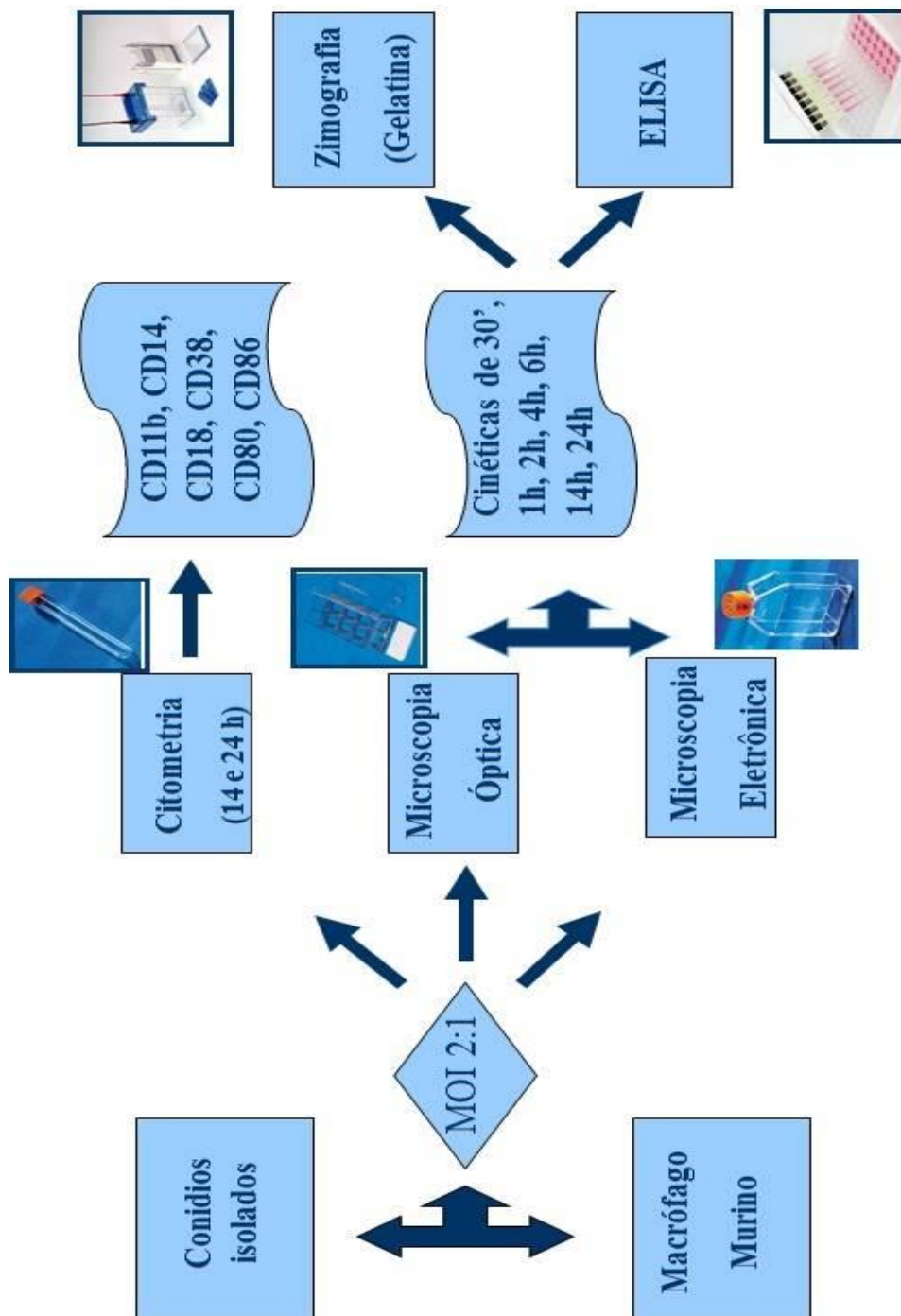
A secreção de IFN $\alpha$  por macrófagos murinos KO e selvagem nos diferentes tempos de infecção com os 3 isolados de *P. lilacinum* foi detectada pelo método de ELISA com um kit comercial (PBL Assay Science, Piscataway, NJ, EUA) utilizando os sobrenadantes das culturas nos tempos de 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 14h, 24h e 48h. O limite de detecção do ensaio foi de 12.5 - 400 pg/ml.

#### **4.9 Ensaio de zimografia (N = 2)**

A atividade de metaloproteinases MMP-9 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos murinos KO nos diferentes tempos de infecção (30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 14h, 24h e 48h) com *P. lilacinum*, foram analisadas em gel de substrato *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), usando a gelatina. Foi inicialmente realizada uma dosagem de proteínas dos sobrenadantes utilizando um kit comercial (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Os géis de concentração e de separação SDS-PAGE foram preparados, as amostras foram diluídas a 8 µg de proteínas totais em um tampão específico, e as mesmas foram aplicadas nos géis para, em seguida, sofrerem uma corrida por 2 horas, a 100V. Ao final, os géis foram corados com

Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,5% Coomassie Blue em 30% metanol e 10% ácido acético, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) e revelados quanto à propriedade de gelatinase das enzimas.

### Esquema Resumido da metodologia



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação morfológica

Na análise da macromorfologia, os isolados de *P. lilacinum* estudados apresentaram colônias, inicialmente brancas, tornando-se de coloração rósea à violeta (figura 3A). O reverso destas colônias apresentou coloração amarelo-acinzentado (figura 3B).

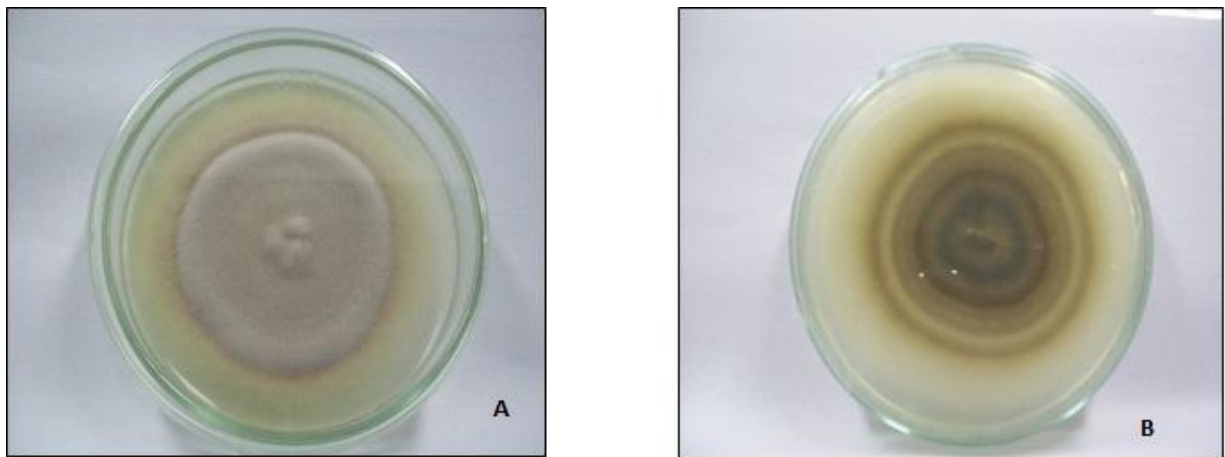
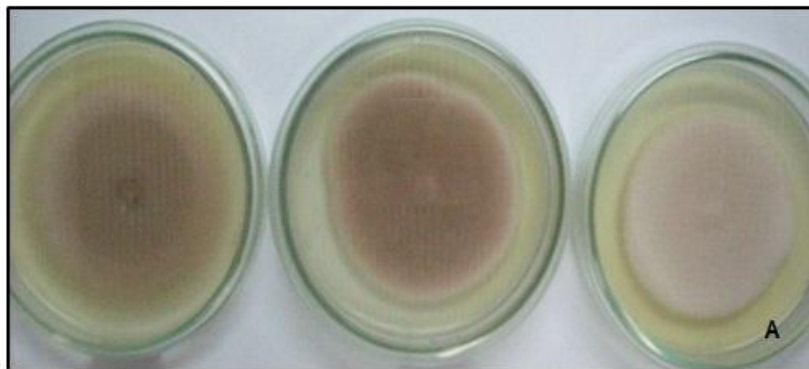


Figura 3. Macromorfologia de cultura de *P. lilacinum* em meio BDA após 14 dias de crescimento. Isolado proveniente da região do seio nasal. Observa-se colônia de coloração rósea à violeta (A). Observa-se reverso da colônia de coloração amarelo-acinzentado (B).

As características dos três isolados são compatíveis com a descrição da espécie, seja ela em placa (figura 4A) ou em tubo (figura 4B).



Isolado da região  
seio nasal

Isolado de biópsia  
de pele

Isolado da região  
da tibia



Figura 4. Macromorfologia de cultura dos 3 isolados de *P. lilacinum* em meio BDA após 14 dias de crescimento, sendo os da esquerda o isolado proveniente do seio nasal, os do centro o isolado da região da tibia e os da direita o isolado de biópsia de pele. Cultura em placa (A) e cultura em tubo (B).

No estudo da micromorfologia, observaram-se hifas vegetativas de parede lisa e conidióforos sustentando fiálides em forma de garrafa com delicado pescoço em número de 2 a 4. Sobre as fiálides foram visualizados conídios elípticos a fusiformes, hialinos. Clamidoporos ausentes (figura 5).

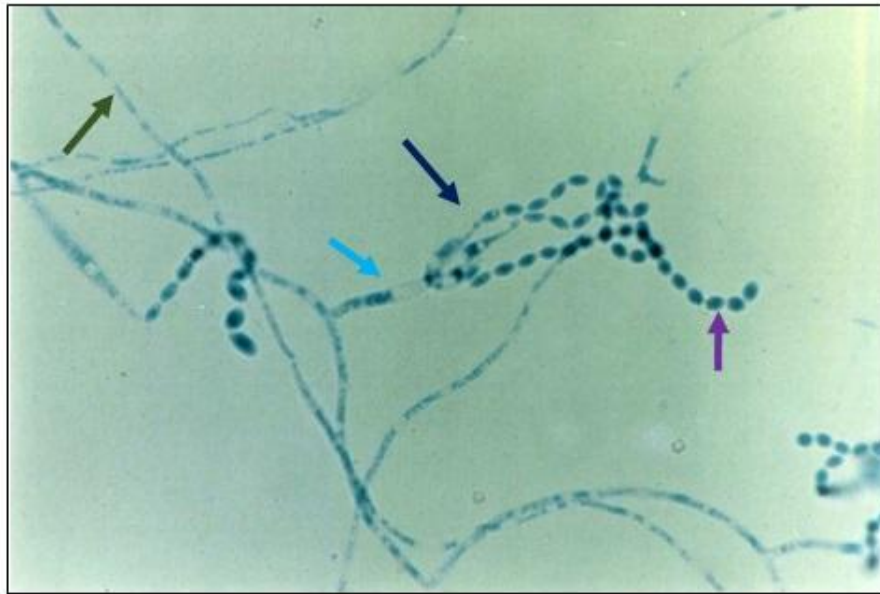


Figura 5. Microcultura de *P. lilacinum* em MEA, à temperatura ambiente, após 14 dias de crescimento. Isolado proveniente de seio nasal. Observam-se hifas vegetativas hialinas ( → ), conidióforo ( → ), sustentando três fiáldes em delicado pescoço ( → ) e sobre elas, conídios elípticos à fusiformes ( → ) Coloração: lactofenol de Amann com azul de algodão. Aumento original: 1000x.

## 5.2 Avaliação quantitativa da interação dos conídeos de *P lilacinum* com o modelo nocaute

As células macrofágicas murinas provenientes do peritônio de animais KO e plaqueadas em câmaras foram deixadas em incubadora para se obter um cultivo homogêneo antes da infecção (figura 6).

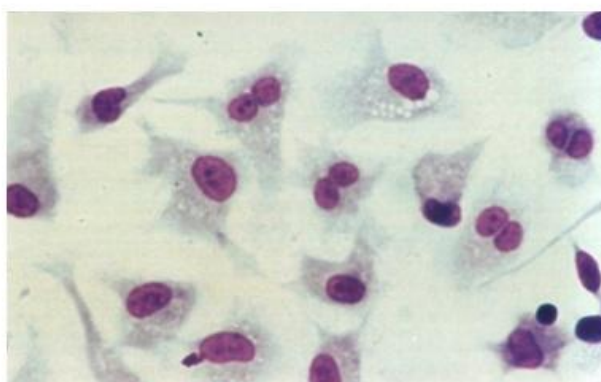


Figura 6. Microfotografia de macrófagos peritoneais murinos da linhagem *iNOS*<sup>-/-</sup>. Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x.

Para se avaliar a infectividade *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos KO ao longo do tempo, foi realizada uma cinética de interação macrófago-conídio por microscopia óptica, nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 14 e 24 horas. Observou-se que em 30 minutos de interação, os macrófagos peritoneais já se encontravam associados aos conídios (figura 7). Não foi possível distinguir adesão de internalização neste tempo.



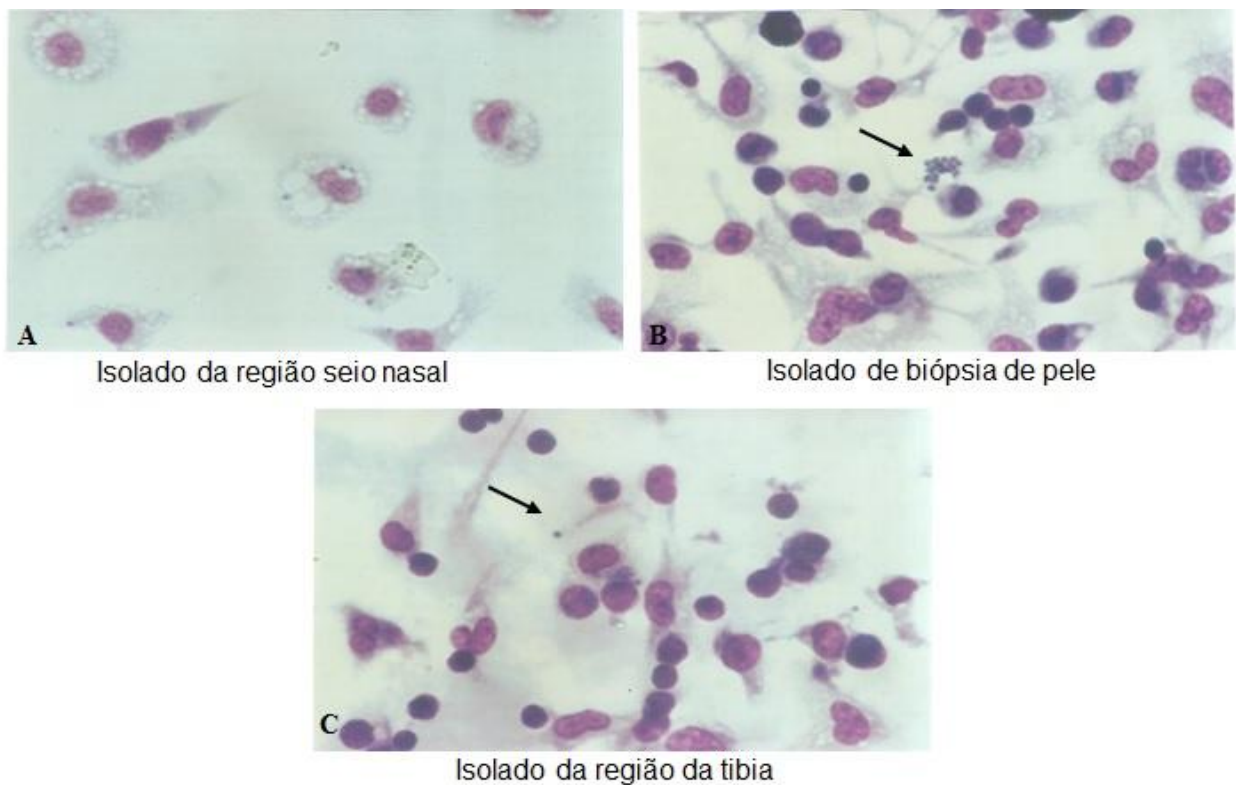
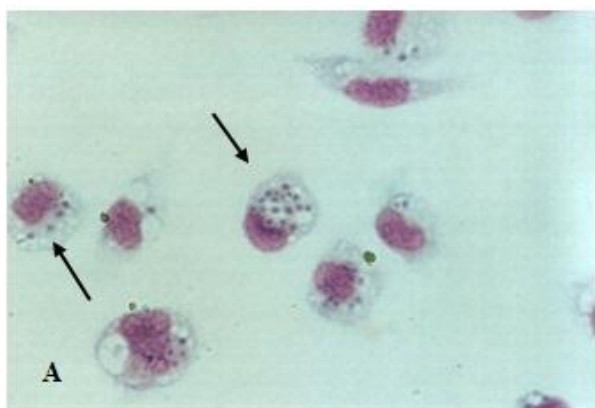
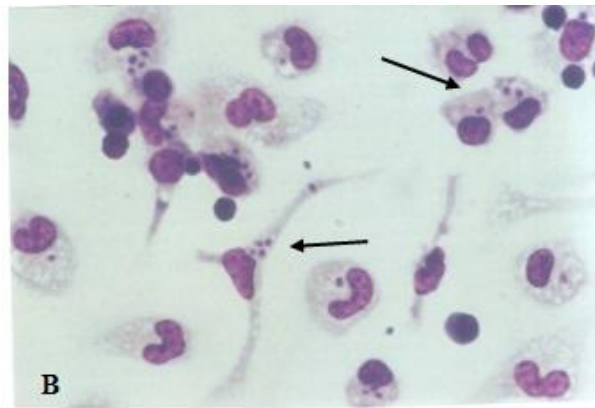


Figura 7. Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente da região nasal (**A**), isolado proveniente de biópsia de pele (**B**), isolado proveniente da região da tibia (**C**). Tempo de incubação: 30 minutos. Notar que já tem associação dos conídios ( → ) com os macrófagos. Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x.

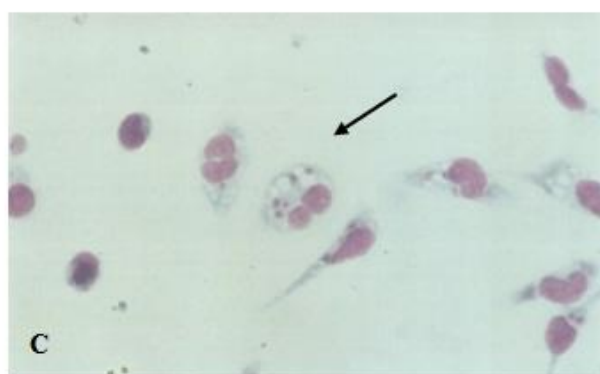
Entre 1 e 6 horas de interação, a internalização dos conídios aumentou gradualmente (figuras 8 e 9), e foi confirmada pela presença de estruturas semelhantes a fagossomos contendo conídios.



Isolado da região seio nasal

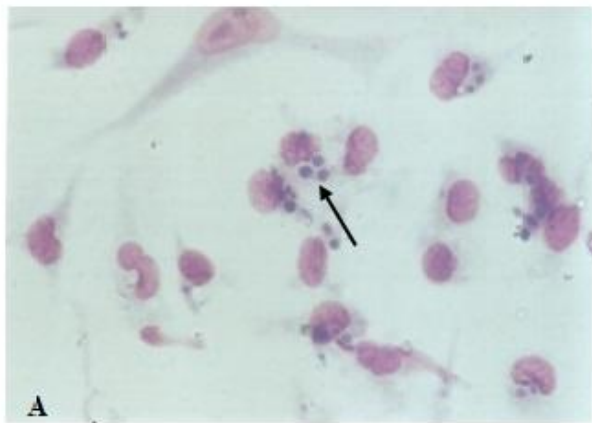


Isolado de biópsia de pele

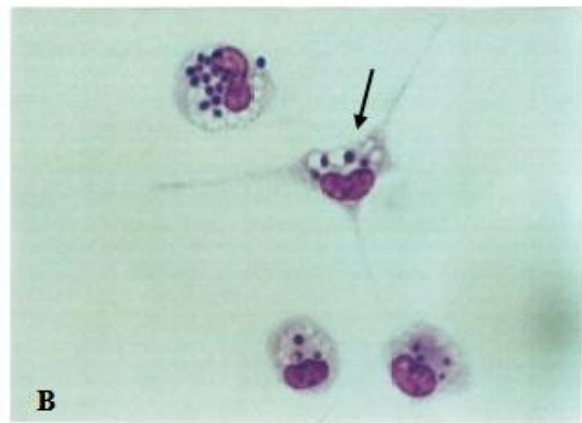


Isolado da região da tibia

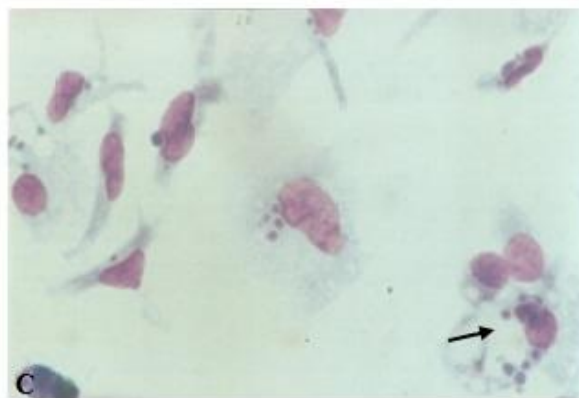
Figura 8. Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem *iNOS<sup>-/-</sup>* com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal (**A**), isolado proveniente de biópsia de pele (**B**), isolado proveniente da região da tibia (**C**). Tempo de incubação: 4h. Notar conídios no interior dos macrófagos (—→), provavelmente dentro de fagossomos. Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x.



**A** Isolado da região seio nasal



**B** Isolado de biópsia de pele



**C** Isolado da região da tibia

Figura 9. Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS-/- com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal (**A**), isolado proveniente de biópsia de pele (**B**), isolado proveniente da região da tibia (**C**). Tempo de incubação: 6h. Notar conídios dilatados ( → ) no interior dos macrófagos, porém sem tubos germinativos. Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x.

Após 14 horas, houve um aumento perceptível do volume conidial, com a formação de tubos germinativos e hifas septadas, que provavelmente resultou no rompimento das membranas dos macrófagos (figura 10).

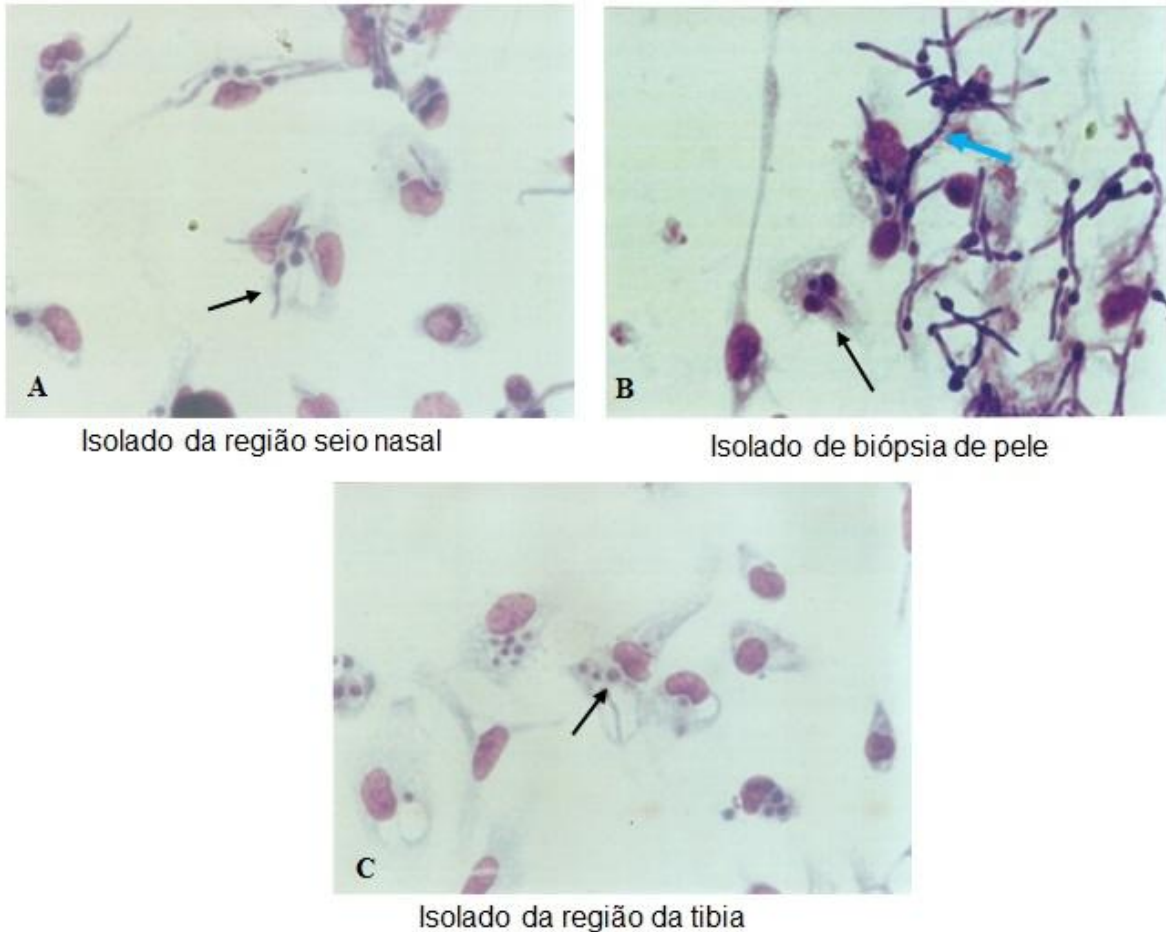


Figura 10. Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS-/- com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal (A), isolado proveniente de biópsia de pele (B), isolado proveniente da região da tibia (C). Tempo de incubação: 14h. Notar formação de tubos germinativos ( —→ ) e hifas septadas ( —→ ). Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x.

Em 24 horas, houve formação de micélio nas culturas de macrófagos peritoneais murinos KO infectados com *P. lilacinum*, sendo que ainda eram vistos muitos conídios formando tubo germinativo em 2 isolados (figura 11A e C), e no isolado proveniente da pele, observamos muitas hifas e quase nenhum macrófago (figura 11B).

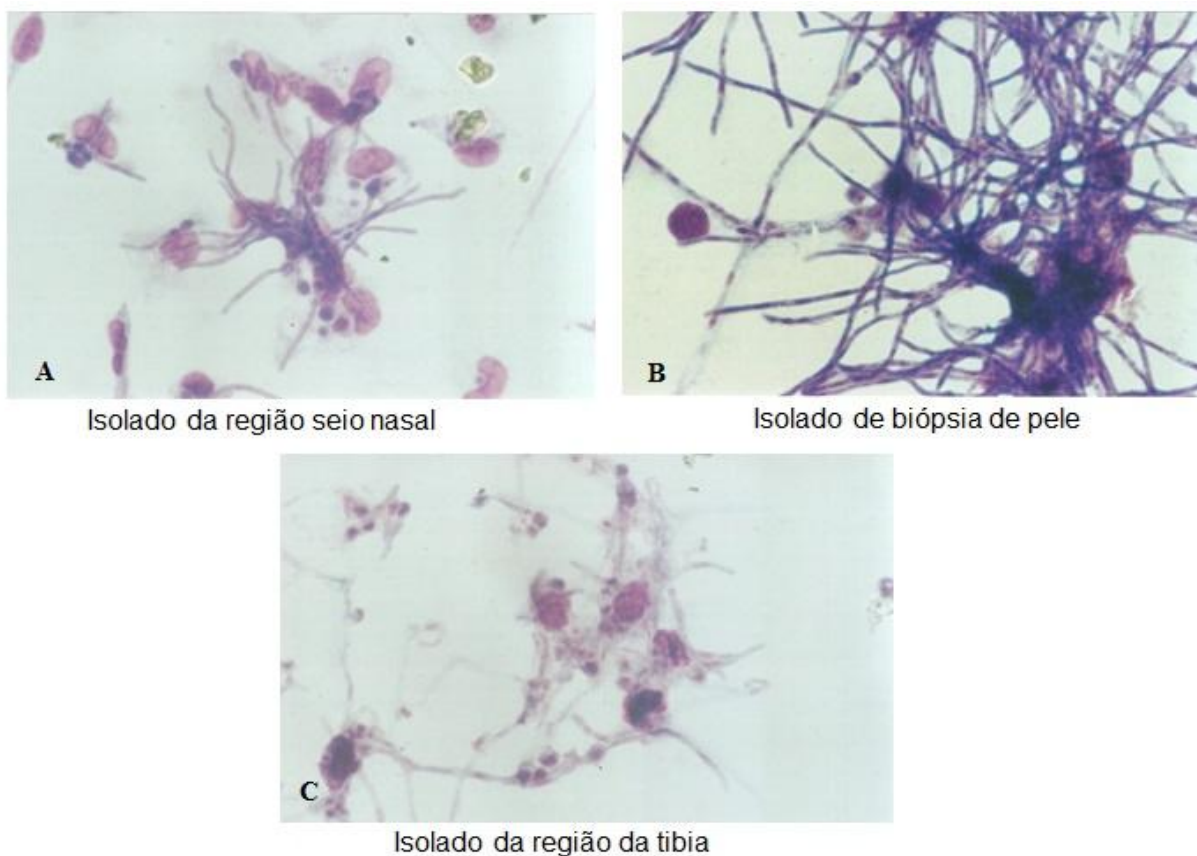


Figura 11. Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS-/- com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal (**A**), isolado proveniente de biópsia de pele (**B**), isolado proveniente da região da tibia (**C**). Tempo de incubação: 24h. Notar micélio fúngico sobre a cultura de células murinas destruídas ( → ). Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x.

Todos os três isolados de *P. lilacinum* apresentaram comportamento diferente frente aos fagócitos. Esta observação foi mais evidente já no tempo de 14 horas entre os 3 isolados. Na cepa extraída de biópsia de pele, principalmente no intervalo de tempo de 14 horas, o aspecto microscópico está bem distinto das demais cepas. Neste, isolado podemos ver que em macrófagos de peritônio dos animais KO possuem muitos conídios de *P. lilacinum* dilatados em seu interior, inclusive com abundante formação de tubos germinativos e presença de hifas, ao contrário das outras cepas.

### **5.3 Avaliação da interação de conídeos de *P. lilacinum* com macrófagos de murinos selvagens por microscopia eletrônica de transmissão**

Com a finalidade de uma melhor compreensão sobre a interação do macrófago com o fungo, realizamos um experimento piloto usando macrófagos de camundongos WT infectados com conídeos de *P. lilacinum*.

No que tange a formação de estruturas internas, as quais a microscopia óptica deixa a desejar quanto à resolução devido à limitação intrínseca do método, observamos e confirmamos as suspeitas, em estudo desenvolvido em paralelo com animais WT realizado em microscópio eletrônico de transmissão, que tais estruturas se tratavam de organelas fúngicas, bem como outras induzidas pelo patógeno na célula hospedeira. Incrivelmente, e da mesma forma como encontrado no modelo nocaute, todos os três isolados de *P. lilacinum* exibiram diferenças. Na cepa proveniente de biopsia de pele, sobretudo no tempo de 2 horas, os macrófagos de peritônio dos animais WT já possuem conídios de *P. lilacinum* aparentemente mais dilatados em seu interior quando comparado a outras cepas (figura 12).

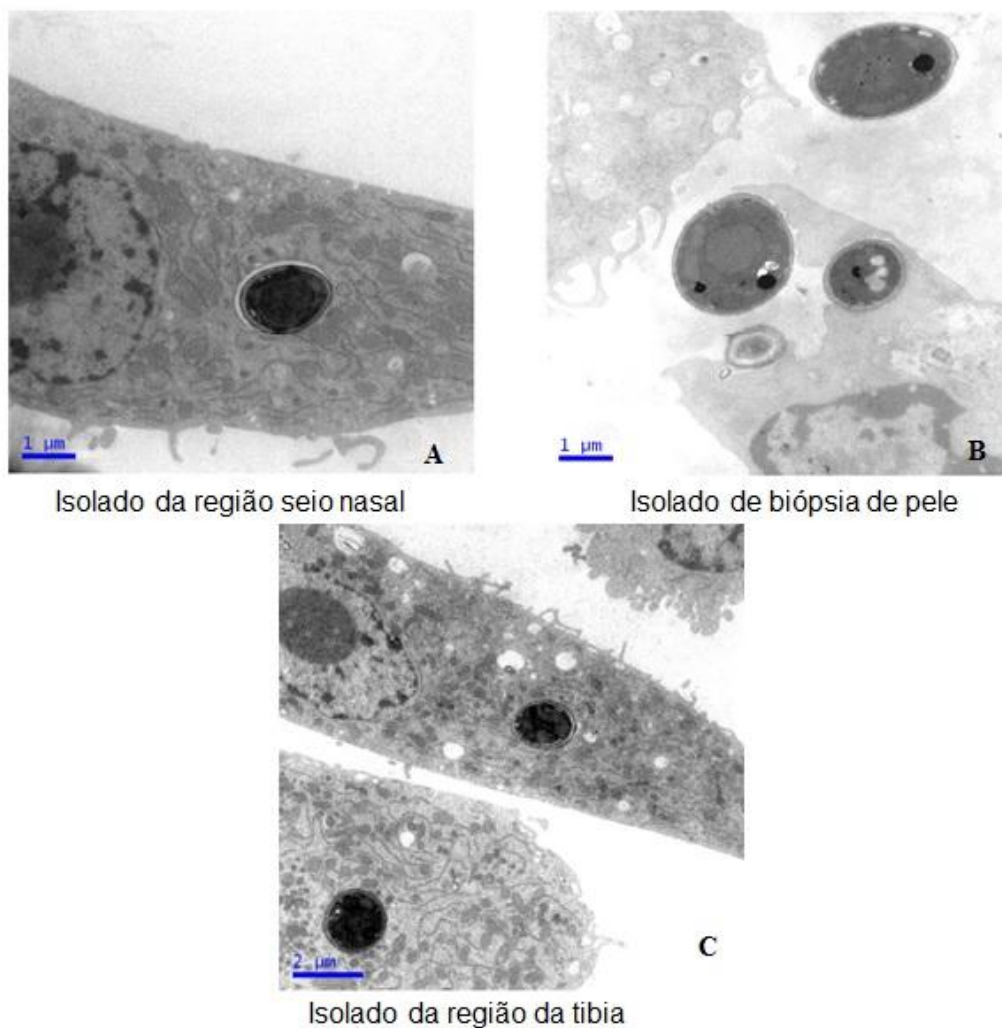


Figura 12. Fotomicrografia eletrônica de transmissão da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem com conídios de *P. lilacinum*, onde observamos a diferença entre o isolado proveniente de seio nasal (A), o isolado proveniente de biópsia de pele (B), o isolado proveniente da região da tibia (C). Tempo de incubação: 2h. Aumento original: 10000x.

Assim, em 30 minutos de interação, os macrófagos peritoneais de camundongos WT já apresentavam conídios internalizados e firmemente associados ao fagossomo. Porém, ainda havia vários conídios aderidos à superfície dos fagócitos (figura 13).

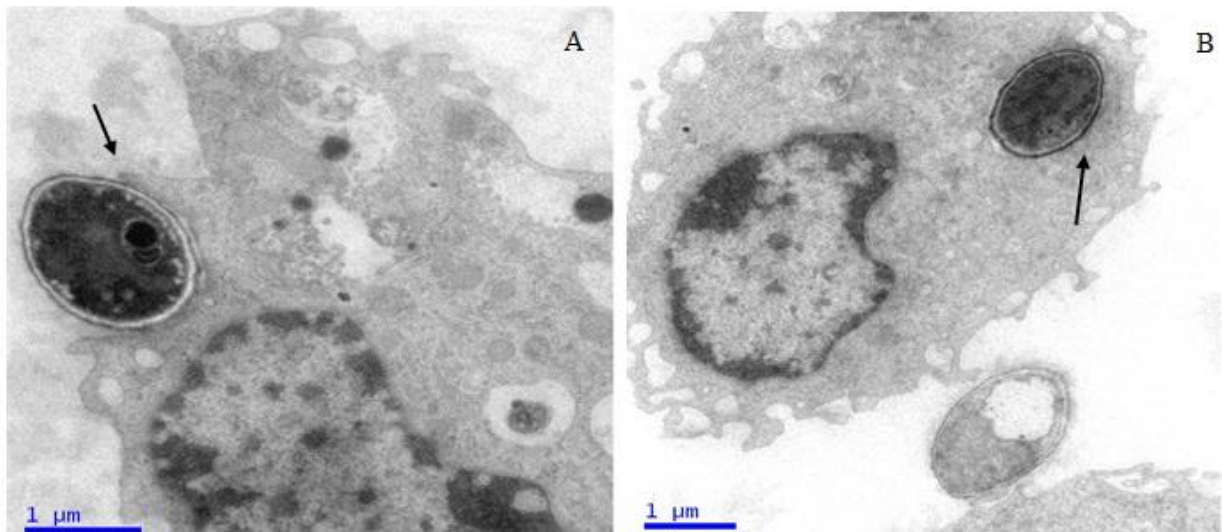


Figura 13. Fotomicrografia eletrônica de transmissão da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 30 minutos. Notar adesão conidial e início da fagocitose (→) (A). Aumento original: 25000x. Observar conídio internalizado (→) (B). Aumento original: 15000x.



Em 1 hora de interação, somente conídios internalizados foram visualizados (figura 14).

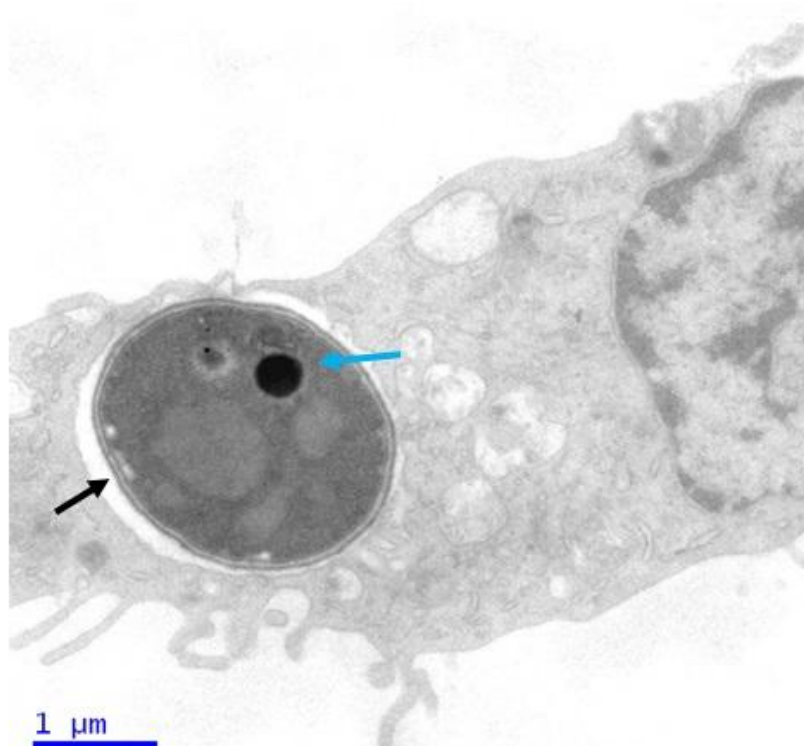


Figura 14. Fotomicrografia eletrônica de transmissão da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 1h. Observar conídio, com parede celular ( → ) e cromatina ( → ) bem evidente, internalizado. Aumento original: 150000x.

No período de 14 horas de interação dos macrófagos peritoneais de camundongos WT e os isolados, os conídeos com o volume aumentado apresentou tubos germinativos com presença ou não de septo (figura 15).

Como já relatado, todos os três isolados fúngicos apresentaram comportamento diferente frente aos fagócitos (figura 12). Sob a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, os conídios de *P. lilacinum* da cepa extraída da pele mostraram-se mais dilatados, quando comparados aos outros dois isolados (figura 12B). Esta observação foi mais evidente no tempo de 14 horas entre as cepas extraídas da pele. Nesta ocasião, os conídios de *P. lilacinum* se apresentam bastante dilatados, com formação de tubo germinativo. cepas (figura 15A). E em 24 horas com o mesmo isolado observa-se o rompimento da membrana plasmática (figura 15B).

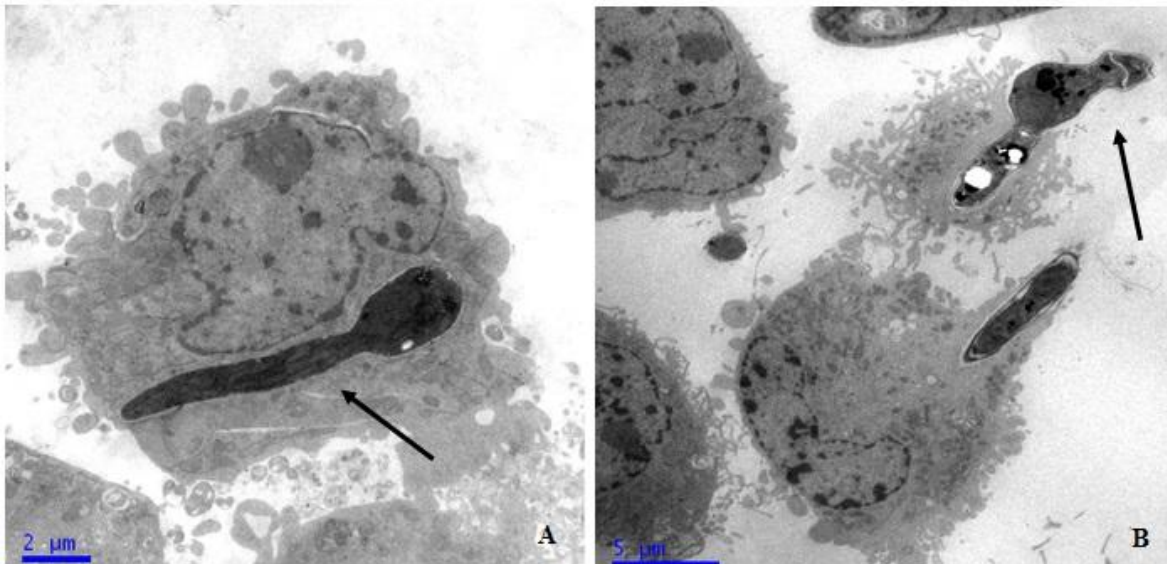


Figura 15. Fotomicrografia eletrônica de transmissão da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 14h. Notar formação de tubo germinativo (→) (A). Aumento original: 8000x. Tempo de incubação: 24h. Observar formação de tubo germinativo, rompendo a membrana plasmática (→) (B). Aumento original: 5000x.

#### 5.4 Avaliação da interação de conídeos de *P lilacinum* com macrófagos de murinos selvagens por microscopia eletrônica de varredura

Fundamentalmente, o microscópio eletrônico de varredura é um aparelho que utiliza elétrons em vez de luz para formar imagens tridimensionais da superfície. A maior resolução conseguida por este método fica entre o microscópio óptico e o microscópio eletrônico de transmissão, também utilizados neste estudo. A grande vantagem do microscópio eletrônico de varredura em relação aos demais é seu limite de resolução e perfil de profundidade, na ordem de 2 a 5 nm. A versatilidade desta técnica se encontra na possibilidade da captação e medida das diversas radiações provenientes das interações elétron-amostra. Estas interações podem revelar informações da natureza da amostra incluindo composição, topografia e morfologia (Lima, 2010).

A análise da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura revelou que os macrófagos peritoneais WT apresentavam-se arredondados ou estrelados alongados, com filopódios e protrusões dorsais (microvilos). Com o decorrer da infecção, o fungo parece reduzir a capacidade dos macrófagos de emitir os filopódios, o que leva a formação do *ruffling* na membrana celular (figura 16).

A alta resolução mostrou que as células geraram extensões superficiais que

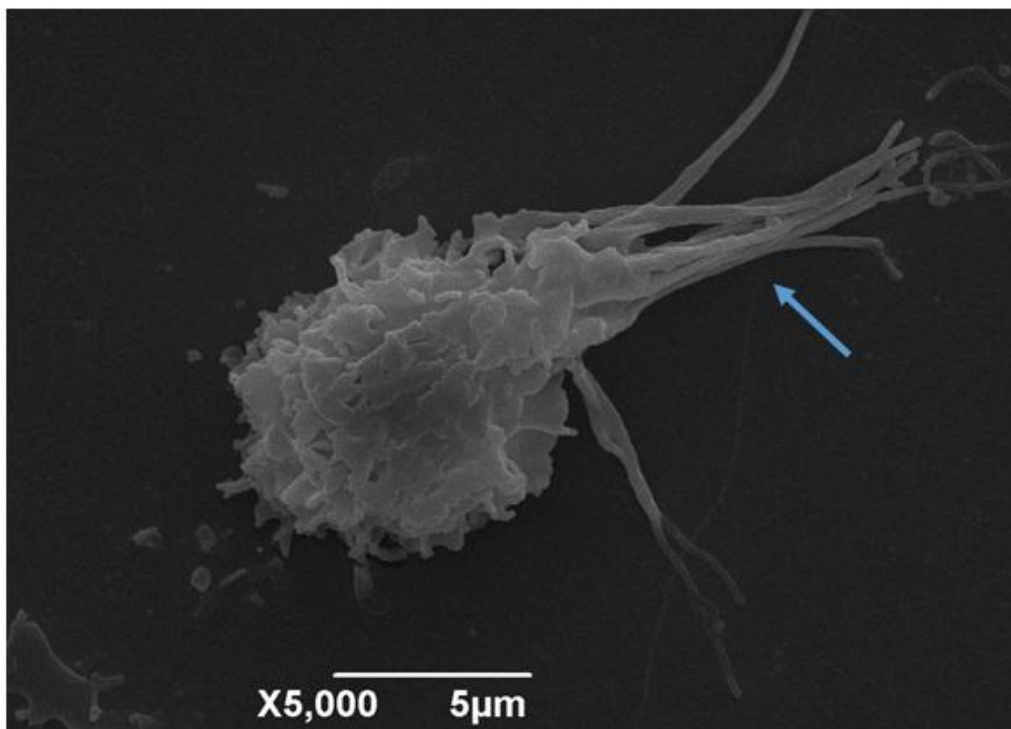


Figura 16. Fotomicrografia eletrônica de varredura de macrófago peritoneal murino da linhagem selvagem, onde podemos observar a presença de filopódios ( → ) e protrusões dorsais (microvilos). Aumento original: 5000x.

lembrassem copos fagocíticos para conídios individuais, enquanto outros conídios na mesma célula estavam simplesmente ligados à superfície celular sem a indução de protrusões de membrana (figuras 17 e 18).

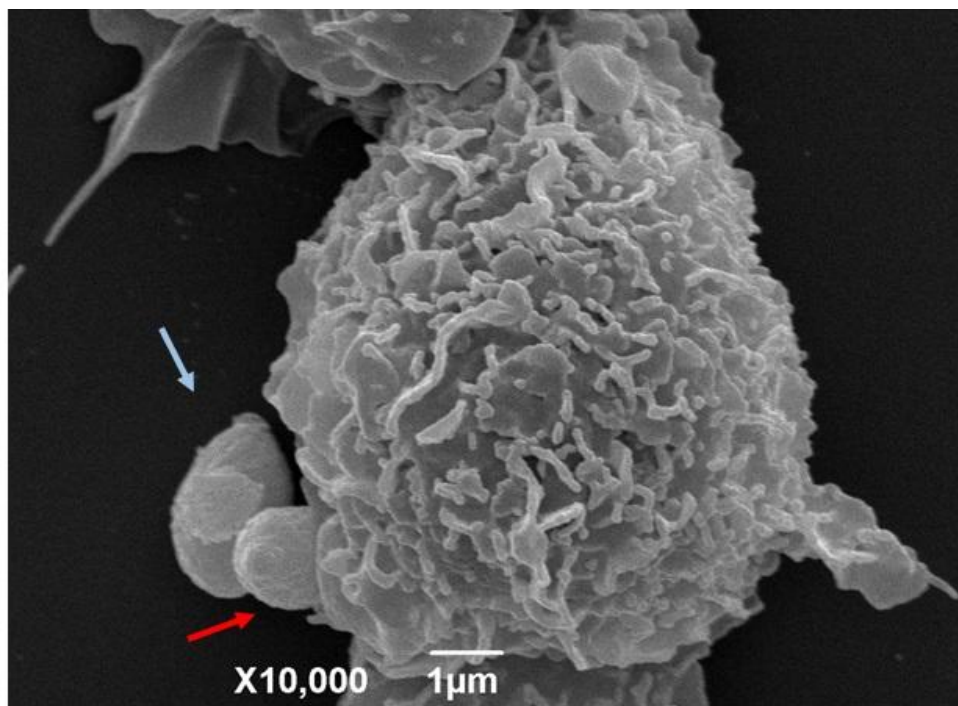


Figura 17. Fotomicrografia eletrônica de varredura de macrófago peritoneal murino da linhagem selvagem infectado com conídios de *P. lilacinum* de isolamento proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 30 minutos. Observar conídio próximo ao macrófago ( → ) e outro, possivelmente, já sendo fagocitado ( → ). Aumento original: 10000x. -

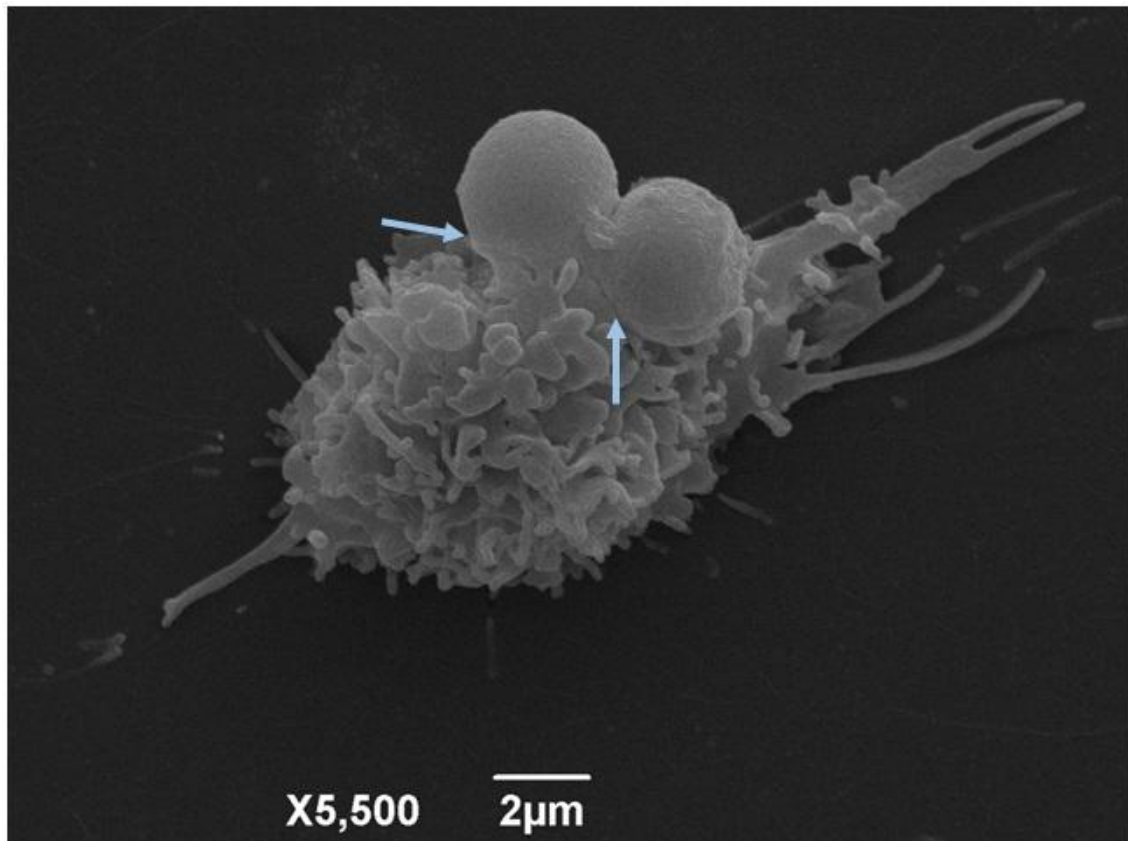


Figura 18. Fotomicrografia eletrônica de varredura de macrófago peritoneal murino da linhagem selvagem infectado com conídios de *P. lilacinum* de isolamento proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 2h. Notar os conídios sendo fagocitados pelo macrófago ( → ). Aumento original: 5500x.

Esta análise da superfície celular confirmou que a infecção por *P. lilacinum* leva à supressão das protrusões dos macrófagos de camundongos WT, ao arredondamento celular e ao intenso *ruffling* da membrana plasmática dorsal. As mudanças morfológicas observadas sugerem não apenas que a extensão de novos filopódios foi anulada.

Podemos observar um grande número de protusões na superfície do macrófago de camundongos WT infectado com *P. lilacinum* (figura 19). Com 24 horas só foi possível observar um emaranhado de hifas (figura 20). Esse mesmo resultado foi encontrado pela microscopia óptica.

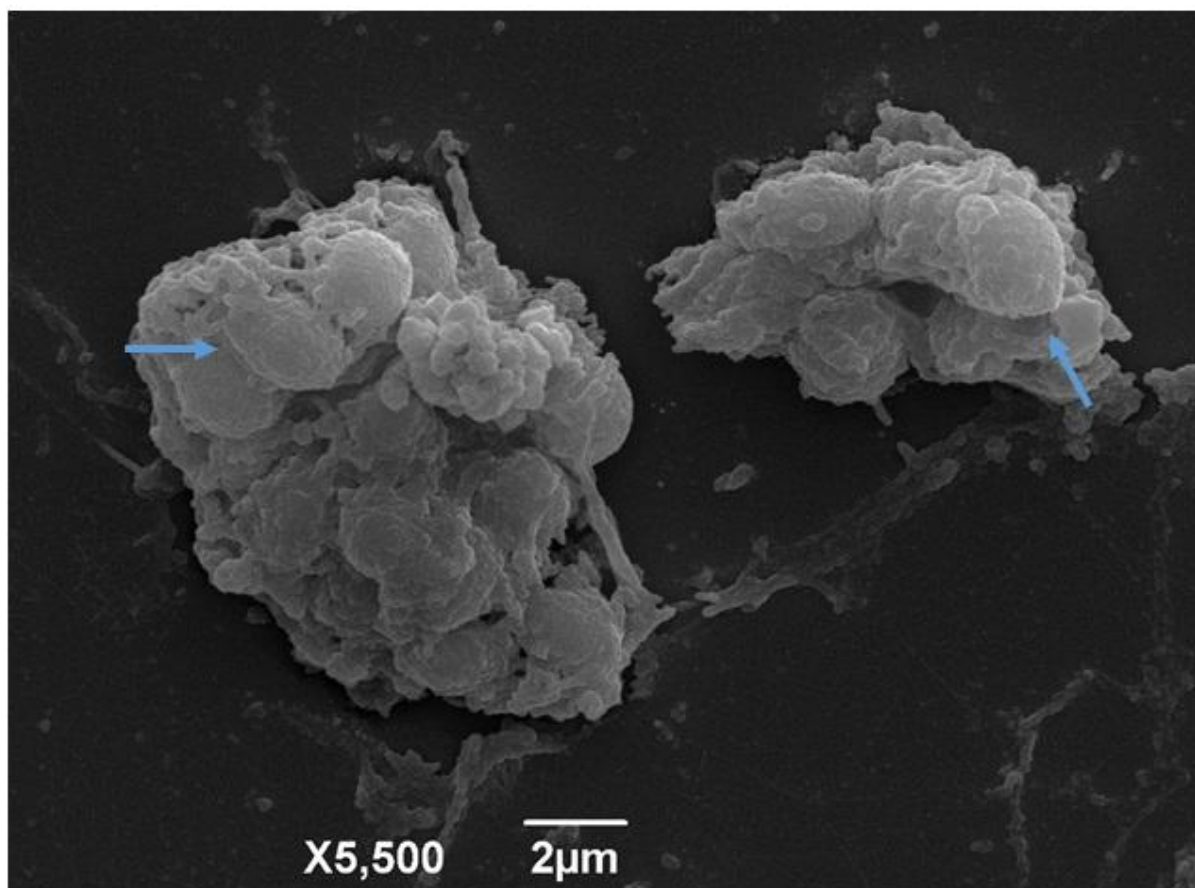


Figura 19. Fotomicrografia eletrônica de varredura de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem infectados com conídios de *P. lilacinum* de isolamento proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 5h. Notar presença de conídios dilatados, possivelmente, no interior dos macrófagos (→). Aumento original: 5500x.

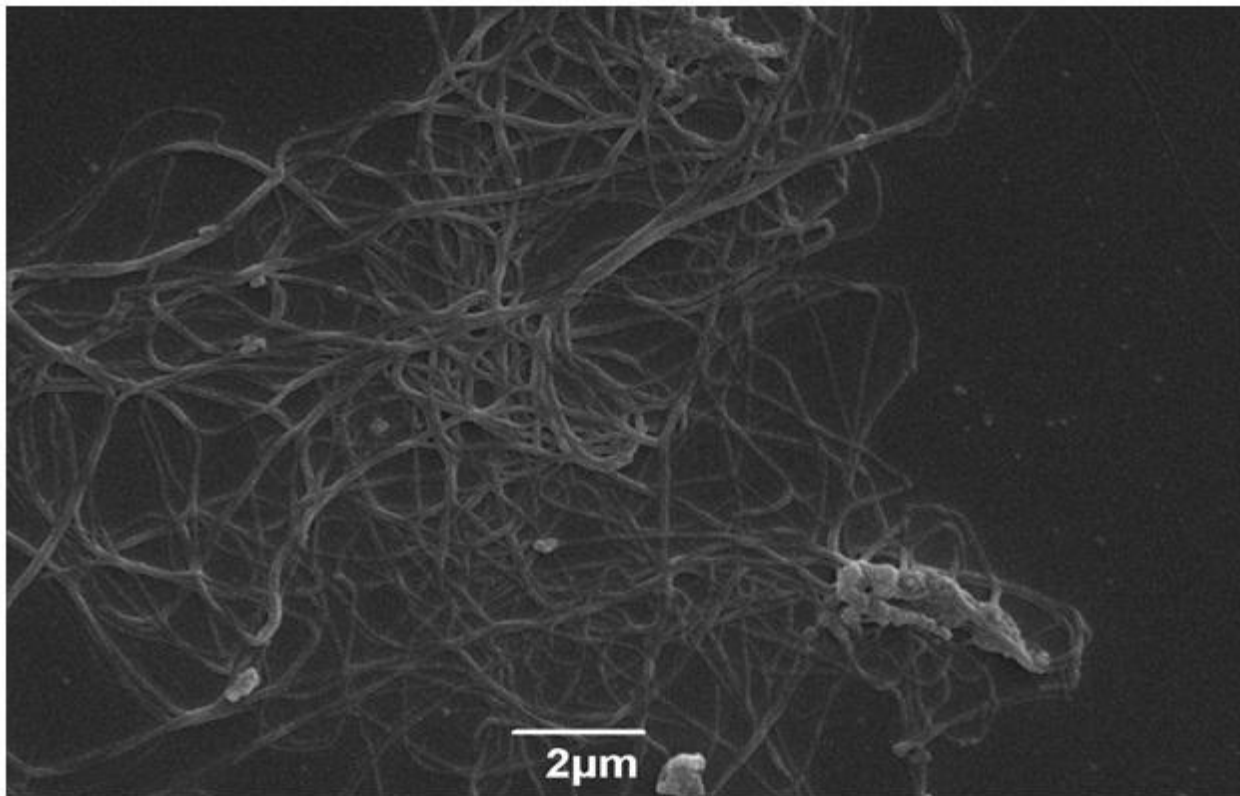


Figura 20. Fotomicrografia eletrônica de varredura de macrófagos peritoneais murinos da linhagem selvagem infectados com conídios de *P. lilacinum* de isolamento proveniente de seio nasal. Tempo de incubação: 24h. Observar apenas a presença de hifas. Aumento original: 5500x.

### **5.5 Expressão de marcadores fenotípicos por citofluorimetria de fluxo (FACS) no modelo transgênico**

Por esse método, foi possível avaliar (1) mudanças morfológicas (figura 21) e (2) o padrão de expressão de moléculas de superfície em macrófagos peritoneais murinos KO (figuras 22-24), induzidas pela infecção com conídeo de *P. lilacinum* proveniente de biópsia de pele. As marcações simples ou individuais com CD11b e CD86 adquiridas no gate de macrófagos, nos mostram uma diminuição de cada padrão de expressão destas moléculas após a infecção com o fungo, e um pequeno aumento após a interação por 14 horas na dupla marcação, quando comparadas às células controle não infectadas (figura 22). Para os experimentos, foram utilizadas amostras do grupo controle e amostras do grupo infectado com 14 e 24 horas de interação.

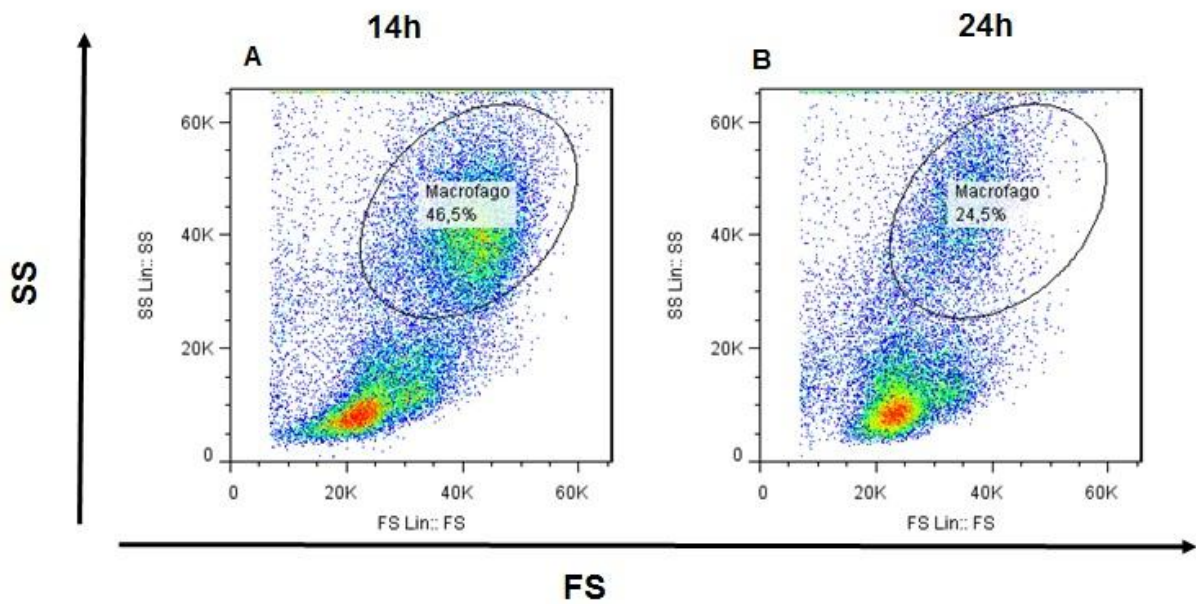


Figura 21. Gráfico representativo de tamanho (FS) e granulosidade (SS) onde se demonstra um *gate* específico após a interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com conídios de *P. lilacinum* do isolado proveniente de biópsia de pele. Observar diminuição da porcentagem entre as células controle não infectadas no tempo de 14h (A) e células infectadas no tempo de 24h (B).



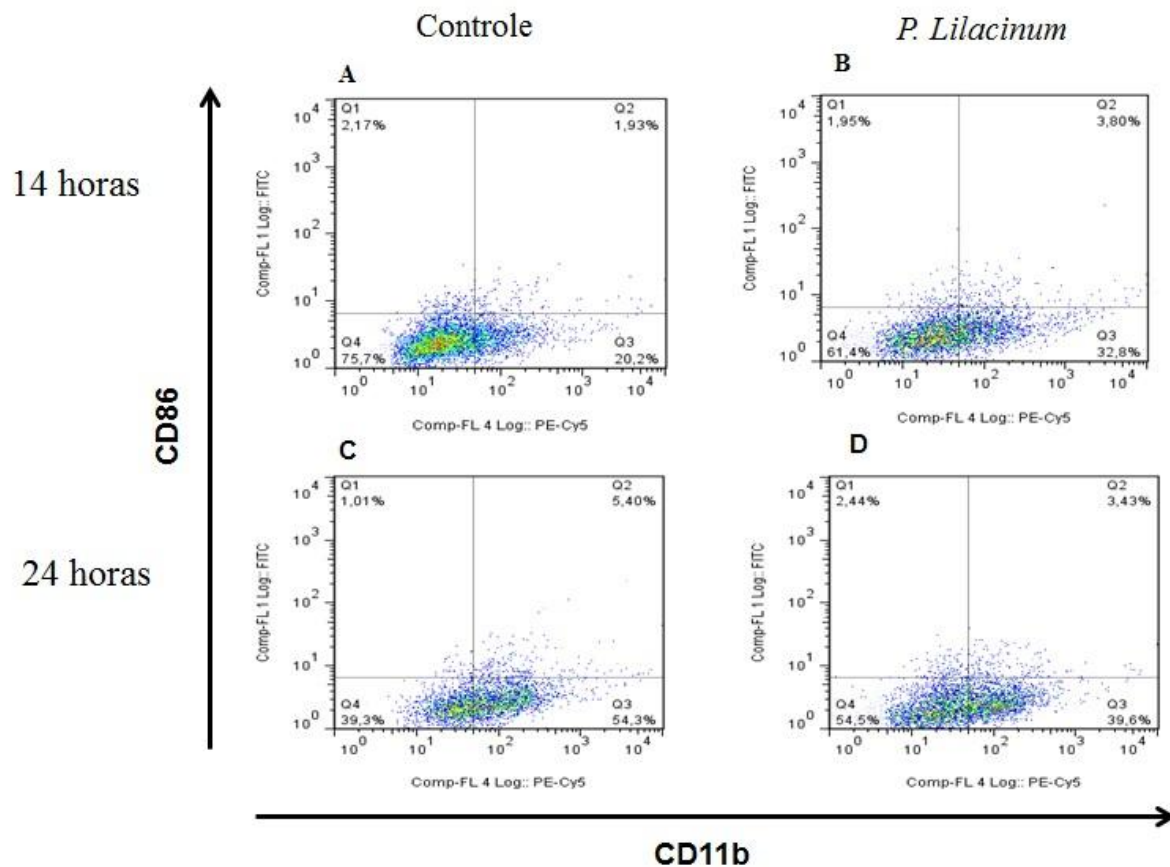


Figura 22. Gráfico representativo da porcentagem de marcação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem *iNOS*<sup>-/-</sup> com anticorpos monoclonais específicos para CD86 (FL-1) e CD11b (FL-4). Células obtidas a partir do *gate* morfológico de macrófagos. Células sem infecção no tempo de 14h (A). Células infectadas por 14h com conídios de *P. lilacinum* proveniente de biópsia de pele (B). Células sem infecção no tempo de 24h (C). Células infectadas por 24h com conídios de *P. lilacinum* proveniente de biópsia de pele (D). Os quadrantes Q1 à Q4 demonstram o percentual de marcação.

Já com relação às células com marcação dupla e concomitante para CD18 e CD38, um padrão de expressão elevada também foi observado após a infecção, em comparação ao controle não infectado (figura 23). Novamente, foram utilizadas amostras do grupo controle e amostras do grupo infectado a 14 e 24 horas após a interação.

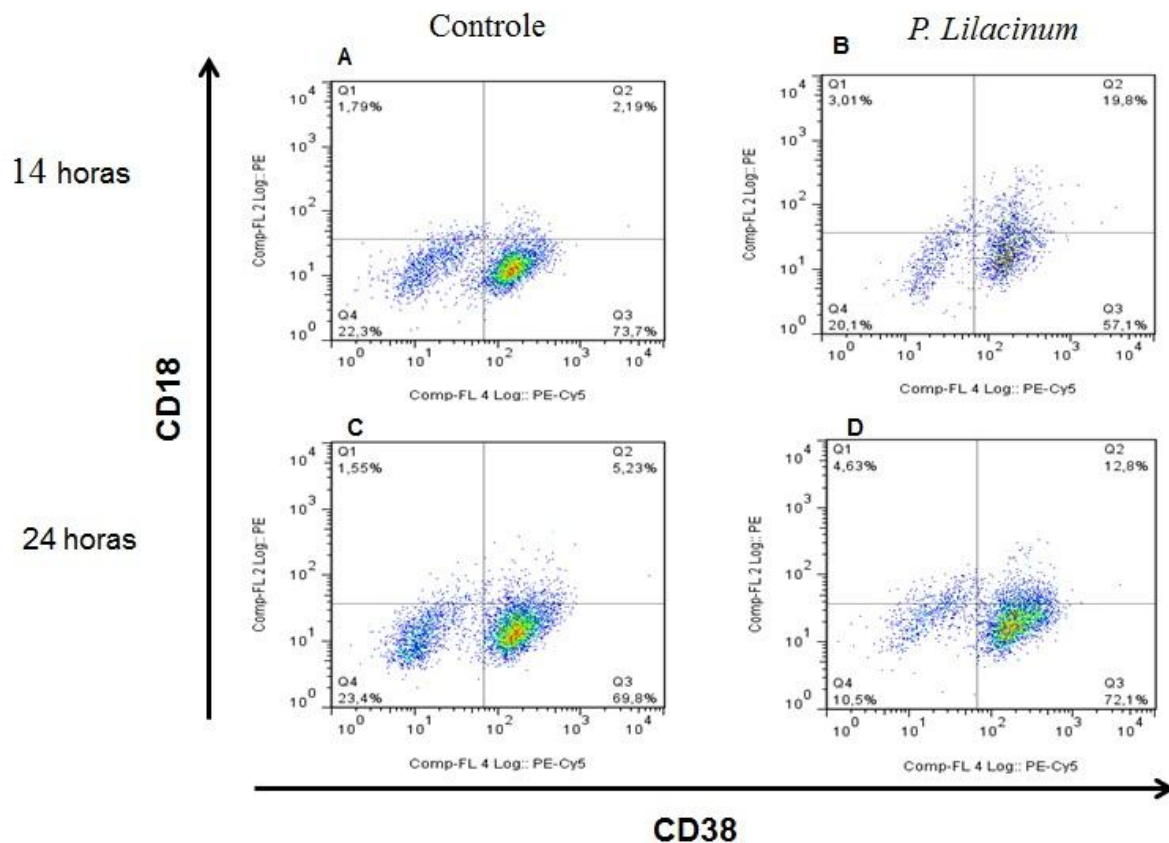


Figura 23. Gráfico representativo da porcentagem de marcação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com anticorpos monoclonais específicos para CD18 (FL-2) e CD38 (FL-4). Células obtidas a partir do *gate* morfológico de macrófagos. Células sem infecção no tempo de 14h (A). Células infectadas por 14h com conídios de *P. lilacinum* no proveniente de biópsia de pele (B). Células sem infecção no tempo de 24h (C). Células infectadas por 24h com conídios de *P. lilacinum* proveniente de biópsia de pele (D). Os quadrantes Q1 à Q4 demonstram o percentual de marcação.

Finalmente, com relação às células dupla positiva para CD14 e CD80, observamos um padrão de expressão diminuída nas primeiras 14 horas de infecção e um aumento na dupla marcação com 24 horas de infecção (figura 24). Foram utilizadas amostras do grupo controle e amostras do grupo infectado com 14 e 24 horas de interação.

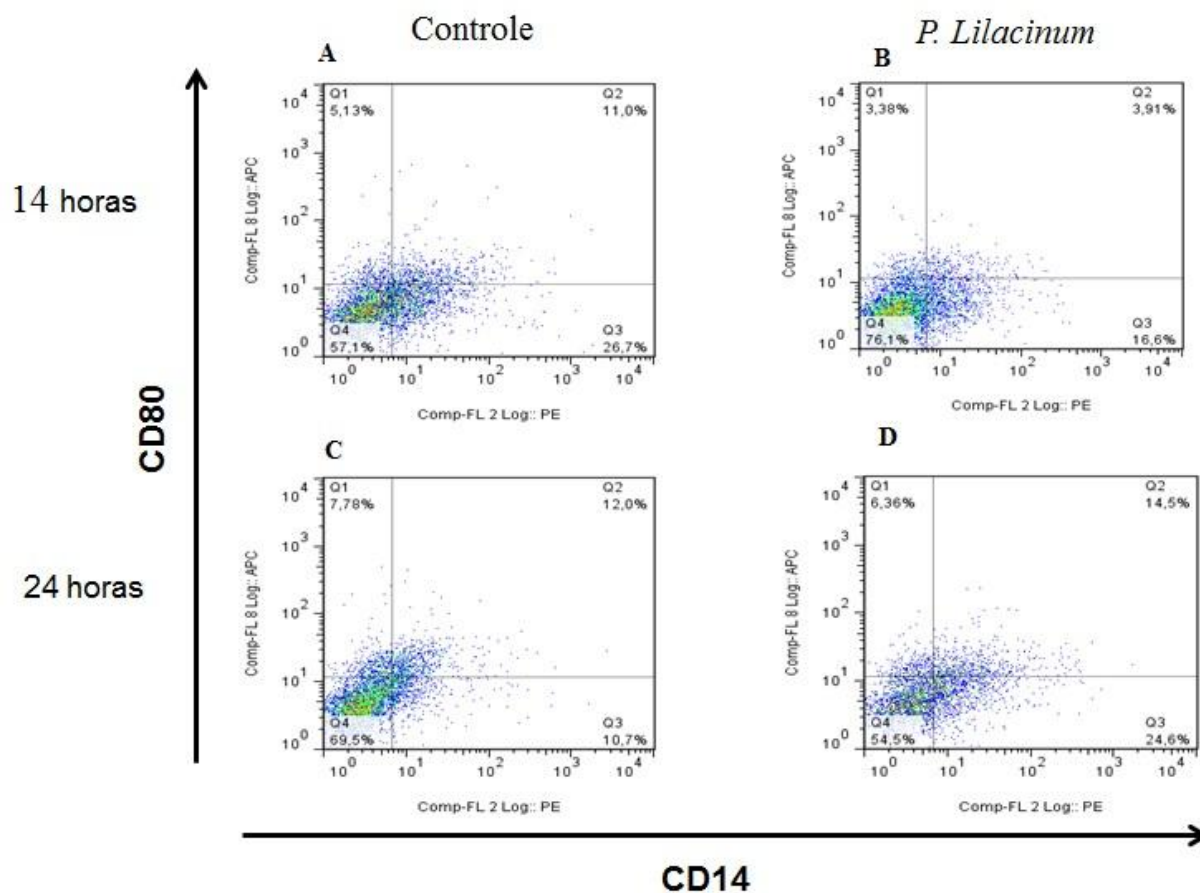


Figura 24. Gráfico representativo da porcentagem de marcação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem *iNOS<sup>-/-</sup>* com anticorpos monoclonais específicos para CD80 (FL-8) e CD14 (FL-2). Células obtidas a partir do *gate* morfológico de macrófagos. Células sem infecção no tempo de 14h (A). Células infectadas por 14h com conídios de *P. lilacinum* proveniente de biópsia de pele (B). Células sem infecção tempo de 24h (C). Células infectadas por 24h com conídios de *P. lilacinum* proveniente de biópsia de pele (D). Os quadrantes Q1 à Q4 demonstram o percentual de marcação.

Na avaliação resumida dos dados obtidos (tabela 2), pode-se observar que a infecção por *P. lilacinum*, tanto 14 quanto 24 horas, proporcionou um aumento significativo da dupla expressão das moléculas CD18 e CD38. Por outro lado, determinados marcadores sofreram redução, como seria o caso da dupla expressão de CD14 e CD80, nas 14 horas iniciais de interação. Os marcadores CD11b e CD86 podemos observar uma modulação na marcação simples para CD11b tanto em 14 como em 24 horas.

Tabela 2. Porcentagem de expressão de marcadores fenotípicos de um experimento representativo em macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> após infecção com conídios de *P. lilacinum* proveniente da biópsia de pele.

Marcador	14 horas		24 horas	
	Controle	<i>P. lilacinum</i>	Controle	<i>P. lilacinum</i>
CD11b	20,2	32,8	54,3	39,6
CD86	2,2	2,0	1,0	2,4
CD11b/CD86	1,9	3,8	5,4	3,4
CD18	1,8	3,0	1,6	4,6
CD38	73,7	57,1	69,8	72,1
CD18/CD38	2,2	19,8	5,2	12,8
CD14	26,7	16,6	10,7	24,6
CD80	5,1	3,4	7,8	6,4
CD14/CD80	11,0	3,9	12,0	14,5

## 5.6 Detecção de Metallo-proteinases (MMPs) por zimografia no modelo nocaute

As MMPs são uma família de endopeptidases dependentes de Zn, que promovem a degradação da matriz extracelular. Todos os membros dessa família são secretados como proenzimas. Essas proenzimas são liberadas por monócitos e macrófagos em resposta a uma variedade de estímulos.

Para estes experimentos, foram processadas amostras das cinéticas de infecção com os 3 isolados de *P. lilacinum* nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 14, 24 e 48 horas, além do controle sem infecção.

Com o isolado de biópsia de pele, não observamos uma mudança expressiva de padrão no decorrer da infecção por *P. lilacinum*. Tanto para a banda maior que representa pró-MMP-9, quanto para a banda menor inferior que representa a forma ativa de MMP-9 (92 Kda), não há alteração significativa (figura 25A).

Com o isolado de seio nasal, novamente não houve uma mudança significativa no padrão desta enzima no decorrer da infecção por *P. lilacinum* (figura 25B).

Com o isolado de lesão da área tibial, foi observado o mesmo comportamento das cepas anteriores quanto ao padrão da expressão da enzima no decorrer da infecção por *P. lilacinum* (figura 25C).

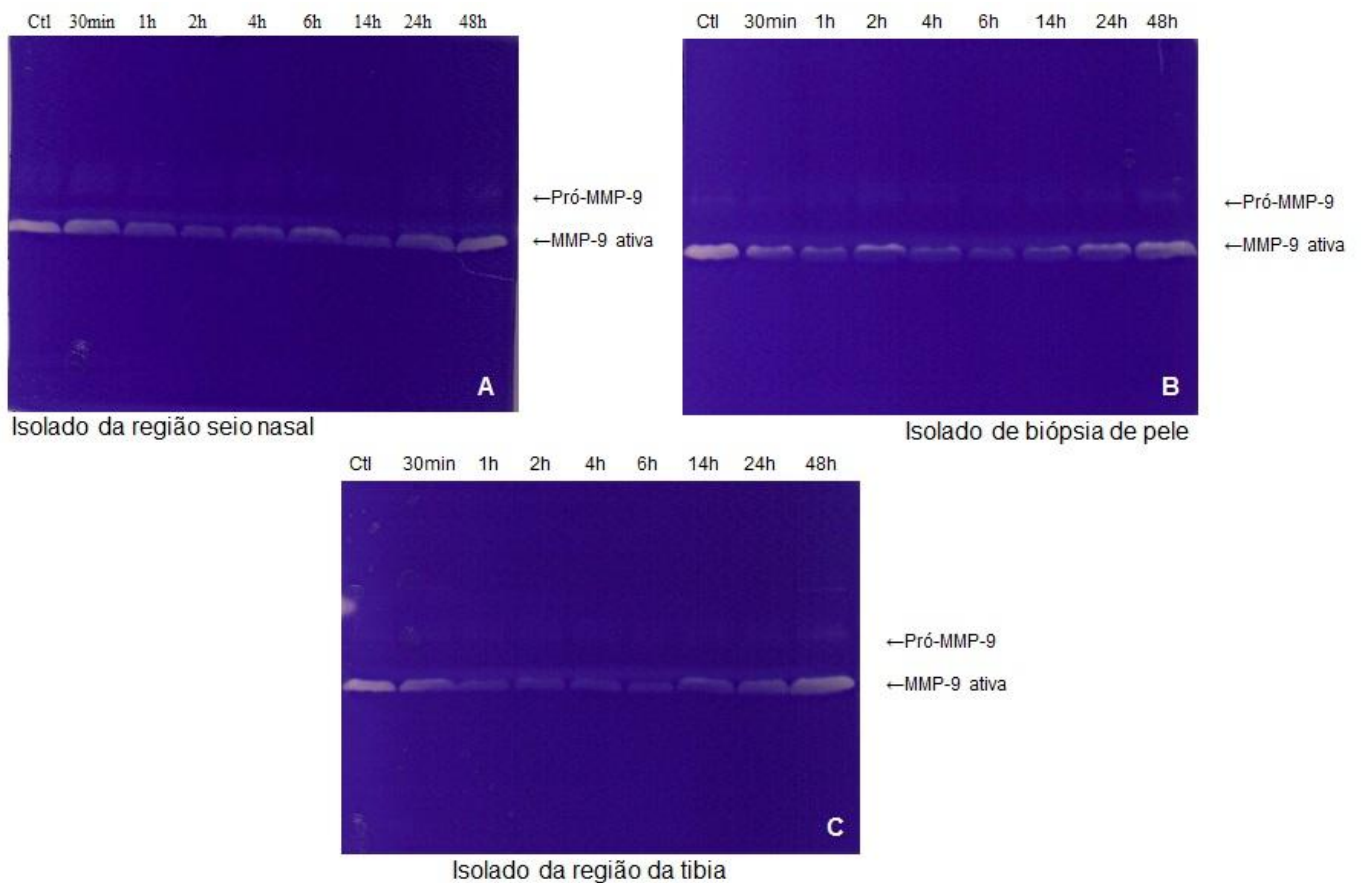


Figura 25. Géis representativos da detecção de metaloproteinases em sobrenadantes provenientes da interação de macrófagos peritoneais murinos da linhagem *iNOS<sup>-/-</sup>* em distintos tempos de incubação com conídios de *P. lilacinum* proveniente de biópsia de pele (A), proveniente da região nasal (B) proveniente da região da tibia (C).

## 5.7 Detecção de IFN $\alpha$ por ELISA nos modelos nocaute e selvagem

A citocina IFN $\alpha$  pode ser produzida por leucócitos para interferir na replicação de fungos e estimular a atividade de defesa de outras células. Ela induz a própria célula infectada e células próximas a produzirem proteínas que condicionam as mesmas a um estado de alerta.

Para o experimento de determinação dos níveis de IFN- $\alpha$ , foram utilizados sobrenadantes das amostras de culturas de macrófagos de peritônio dos animais das linhagens selvagem e iNOS $^{-/-}$ , ambos infectados com *P. lilacinum*.

Ao analisar os dados obtidos, não foi evidente qualquer grande alteração dos níveis de IFN- $\alpha$ , os quais não foram proporcionais ao tempo de infecção, exceto em 30 minutos de interação macrófago peritoneal murino e conídios de *P. lilacinum* (tabela 3). Da mesma forma, no grupo de animais WT, os níveis de IFN- $\alpha$  também não variaram em relação ao tempo de infecção com *P. lilacinum*, e se mantiveram semelhantes aos níveis dos animais KO.

Tabela 3. Níveis de IFN $\alpha$  das culturas de macrófagos peritoneais murinos das linhagens iNOS $^{-/-}$  (KO) e selvagem (WT), após cinética de infecção com conídios de *P. lilacinum* em isolado proveniente de biopsia de pele.

Marcador	KO	WT
Controle	56,1 $\pm$ 1,0 <sup>a,b</sup>	89,5 $\pm$ 5,5
30 minutos	113,0 $\pm$ 20,0	n.a.
1 hora	61,5 $\pm$ 0,1	n.a.
2 horas	67,5 $\pm$ 5,4	n.a.
4 horas	69,0 $\pm$ 4,0	n.a.
6 horas	65,3 $\pm$ 1,7	87,9 $\pm$ 5,8
14 horas	67,6 $\pm$ 4,2	64,0 $\pm$ 0,8
24 horas	64,6 $\pm$ 3,8	62,0 $\pm$ 1,7
48 horas	83,9 $\pm$ 3,4	n.a.

N = 3. a. pg/ml; b. média  $\pm$  erro padrão; n.a. = não disponível.



## 6 DISCUSSÃO

*Purpureocillium lilacinum* é um fungo saprofítico, assexuado e filamentosos considerado um importante patógeno emergente que pode causar diferentes manifestações clínicas que variam de infecções cutâneas e subcutâneas, até oculomicose grave. É considerado de fundamental importância médica, uma vez que é a única espécie do seu gênero encontrada em pesquisa clínica, além de *Paecilomyces variotii* (Hall et al. 2004), que pertence a seu antigo gênero modificado recentemente (Luangsa-Ard et al. 2011).

Sabe-se que microrganismos patogênicos podem invadir células eucarióticas e se utilizar destas para se multiplicar ou mesmo para escapar da resposta imune do hospedeiro (Finlay & Falkow, 1997). O Processo de infecção por um microrganismo e sua colonização de órgãos é bem complexo, envolvendo desde a adesão às células do hospedeiro, até a penetração da matriz extracelular. Sabe-se também que várias espécies fúngicas são capazes de invadir células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*; porém, são poucos os trabalhos que descrevem esse processo (Monteiro et al. 2005).

Neste estudo, foram utilizadas 3 cepas de *P. lilacinum*: 1 isolado de lesão de área tibial, 1 isolado de seio paranasal e 1 isolado de biópsia de pele. A avaliação macro e micromorfológica demonstrou que os isolados apresentam características típicas da espécie, com uma produção de conídios por volta dos 14 dias de cultivo, conforme descrito por Luangsa-Ard e colaboradores em 2011. Essa grande produção de conídios pode ser um facilitador no processo de infecção do hospedeiro, devido a rápida dispersão de seus esporos no ambiente e a capacidade de produzir estruturas semelhantes à fiálides e conídios, além de hifas septadas e hialinas (Pastor & Guarro, 2006). A identificação e a confirmação das características do fungo são de grande importância, e já foi visto em alguns estudos, como no caso de Khan e colaboradores (2012), que relataram o primeiro caso de doença pulmonar cavitária causada por *P. lilacinum*, em que o mesmo cresceu apresentando características atípicas, se assemelhando ao *Acremonium* spp. Os próprios Luangsa-Ard e colaboradores (2011), discutiram sobre a dificuldade da identificação deste fungo, e relataram que *P. lilacinum* é capaz de formar biofilme. Okada e colaboradores (1995) já mostraram que *P. lilacinum* foi capaz de crescer com características semelhantes ao gênero

*Acremonium*, sendo este último fenotipicamente assemelhante ao *F. solani*, comprovando assim a dificuldade e a importância da identificação correta.

No presente estudo, também obtivemos uma grande produção de conídios durante o período de cultivo. Sendo assim, conseguimos isolar e obter uma quantidade suficiente para a realização da infecção *in vitro* em macrófagos peritoneais de camundongos nocaute NOS e selvagem na proporção de 2:1. Essa mesma taxa foi usada por Peixoto e colaboradores (2010). Naquele estudo, utilizou-se essa proporção em macrófagos murinos WT, achando que estes fagócitos seriam capazes de impedir a germinação, e que assim matariam o fungo após a realização do processo fagocítico. Isto foi postulado pois, segundo dados da literatura, esse fungo apresentava baixa virulência (Pastor & Guarro, 2006). Mas para surpresa dos autores, o fungo foi capaz de infectar os macrófagos, destruindo-os no período de 24 horas (Peixoto et al. 2010). Schaffner e colaboradores (1983), tendo como base dados anteriores, usaram cultura de células de macrófagos alveolares de coelho que prontamente foram infectados com conídios de *A. fumigatus* na proporção de 1 conídio para 2 macrófagos, o inverso do nosso trabalho. Como resultado, eles observaram que as células impediram a germinação e mataram todos os conídios em 48 horas de incubação.

Durante o processo de infecção *in vitro*, foi possível observar que nos primeiros 30 minutos de incubação, não tivemos interação entre o fungo e o macrófago, e que a mesma foi acontecendo gradativamente no período de 1 a 4 horas. Robertson e colaboradores (1989), avaliando a interação de *A. fumigatus* e *Penicillium ochrochloron* com macrófagos alveolares humanas na proporção de 1:1, observaram que em 1 hora de incubação a 37°C, mais de 60% dos conídios estavam associados com os fagócitos, não especificando, porém, se os mesmos estavam aderidos ou internalizados. Phillippe e colaboradores (2003) em seu estudo em infecção de macrófagos alveolares de camundongo com conídios de *A. fumigatus* na proporção de 1:1, observaram uma internalização de 30% dos conídios por fagócitos em apenas 15 minutos de incubação. Já em 2 horas, 85% dos conídios tinham sido fagocitados, e em 4 horas, o índice subiu para 90%. Nas três horas após a fagocitose, foi observado um aumento do volume conidial (Phillippe et al. 2003). A *C. albicans* também já foi objeto de estudo com relação à interação de leveduras com macrófagos peritoneais murinos da linhagem C57BL/6 (Kaposzta et al. 1998). Os autores demonstraram que durante interação celular, numa proporção que variou de 10 a 20 conídios para cada macrófago, 66,4 ± 5,6% de leveduras associadas aos macrófagos já tinham sido internalizadas em 10

minutos de incubação. Em 60 minutos, esta taxa aumentou para  $98,1 \pm 1,6\%$ ; porém, a mortalidade do fungo não chegou a 5% em 2 horas de infecção. O mesmo foi observado para outros fungos, como *P. marneffeii*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *Verticillium nigrescens* (Rongrungrung & Levitz 1999; Winn et al. 2003). Um outro estudo, de Perkhofer e colaboradores (2007), mostrou que a fagocitose e a morte intracelular de *A. fumigatus*, *A. terreus* e *A. flavus* por macrófagos e células dendríticas humanas ocorria já com 30 minutos de interação.

Em nosso estudo, entre o período de 4 a 6 horas, os conídios já apareceram internalizados no interior dos macrófagos, e se apresentaram dilatados. Segundo Latgé (1999), a dilatação de conídios é um pré-requisito importante para o desenvolvimento de hifas. Além disso, o mesmo autor mostrou que o percentual de morte de conídios de *A. fumigatus* fagocitados por macrófagos, diminui quando eles começam a se dilatar. Testes de sensibilidade de conídios dilatados desse fungo mostram que os mesmos são mais resistentes do que conídios latentes (Latgé, 1999). Também foi comprovado que conídios de *A. fumigatus* podem germinar no interior de monócitos, sugerindo que uma segunda linha de defesa de células fagocíticas, como os neutrófilos, sejam importantes na contenção de conídios que resistem à morte intracelular por monócitos (Schaffner et al. 1982; Schaffner et al. 1983; Washburn et al. 1987). Na interação de monócitos humanos com conídios de *A. fumigatus* por 6 horas, também ocorre a dilatação ao longo do tempo de interação dos conídios no interior das células fagocíticas (Loeffler et al. 2009).

No período que compreende os tempos de 6 a 14 horas, os conídios de *P. lilacinum* em nosso estudo se apresentaram cada vez mais dilatados, e pudemos observar a presença de tubos germinativos. Após esse tempo, o surgimento de hifas resultou no rompimento das membranas dos macrófagos. Peixoto e colaboradores (2010), utilizando macrófagos peritoneais de camundongos selvagem imunocompetentes, mostraram resultados similares, embora o rompimento total das membranas dos macrófagos só tenha acontecido no período de 24 a 48 horas de infecção. Mazet e colaboradores (1994) pesquisaram a interação de neutrófilos equinos com *Paecilomyces farinosus* e observaram que, em 1 hora de incubação na proporção de 1:1, já houve internalização dos conídios pelos neutrófilos, e que em 4 horas de interação, ainda não tinha sido observada a formação de tubo germinativo. Em 16 horas, observaram-se micélios limitados crescendo nas monocamadas de neutrófilos. Vieira (2008), utilizando macrófagos humanos inativados por inibidor de NO sintase e

infectados por *F. solani*, mostrou que esses macrófagos eram visivelmente mais permissivos à infecção pelo patógeno em relação ao controle não tratado com o inibidor de NO-sintase (L-NAME).

Resumidamente, foi possível observar nesse trabalho que *P. lilacinum* apresentou um rápido crescimento, sendo que o MOI de 2:1 se mostrou eficiente na infecção onde o fungo conseguiu destruir os macrófagos. Em 1982, Schaffner e colaboradores também viram em seu estudo com *Aspergillus* que o ele conseguiu escapar da defesa inata, destruindo os macrófagos. Os macrófagos quando desafiados por patógenos internalizam seu alvo através da fagocitose, compartimentando os mesmos em fagossomos, em um processo que envolve eventos de projeção e fusão de membranas, assim como o recrutamento de fatores, tais como enzimas hidrolíticas e GTPases (Ibrahim-Granet et al. 2003). O que estamos observando nesse trabalho é exatamente o contrário, no qual mostramos a capacidade do fungo de escapar desse mecanismo inato. Campos e colaboradores (2006) mostraram em um experimento *in vitro* que conídios de *Trichophyton rubrum* foram fagocitados por macrófagos peritoneais murinos, formaram hifas dentro dos macrófagos, e romperam a membrana celular desses fagócitos. Já Brummer e colaboradores (1990) usando células de levedura de *Paracoccidioides brasiliensis*, viram o oposto: as leveduras se multiplicaram dentro dos macrófagos peritoneais, mas foram inibidas, mortas e digeridas por macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  (Brummer et al. 1990). Resta averiguar se em nosso modelo atual tal fato pode ser reproduzido.

Na literatura, ainda não é bem esclarecido o que pode estar protegendo ou facilitando a infecção de células hospedeiras por fungos. O que se sabe é que os macrófagos têm um papel importante na resistência contra patógenos intracelulares. Estudos *in vitro* têm demonstrado que vários fatores podem estar ligados a essa proteção, tais como intermediários reativos de oxigênio, hidrolases, proteínas e defensas contra as infecções fúngicas (Romani, 2004). Schaffner e colaboradores em 1983, usando *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, compararam a eficiência entre os macrófagos alveolares e os macrófagos peritoneais, tanto de camundongos, quanto de coelhos da raça Nova Zelândia, e viram que nos macrófagos alveolares ocorreu uma diminuição da taxa de germinação desses fungos, o mesmo não observado nos macrófagos peritoneais. Phillippe e colaboradores (2003) não observaram qualquer resistência *in vitro* de conídios de *A. fumigatus* à fagocitose de macrófagos de camundongo na proporção de 1:1. Resultado parecido foi encontrado por Ibrahim-

Granet e colaboradores em 2003, onde *in vitro* não observaram resistência à fagocitose de conídios de *A. fumigatus* em macrófagos alveolares humanos (proporção conídio: macrófago de 2:1).

Já Kaposzta e colaboradores (1998) sugerem que a formação do tubo germinativo em *C. albicans* é necessária para o escape do microrganismo. Este último, então, penetra em outra célula intacta por meio do tubo germinativo, mesmo na presença de vários inibidores da fagocitose, como a citocalasina, que inibe a polimerização da actina. No presente estudo demonstramos que, houve a formação de tubos germinativos somente após 6 horas de interação. Kaposzta e colaboradores (1999) sugerem que esta estrutura é mais frequentemente observada em condições ácidas, e os autores comprovaram que os tubos germinativos se tornavam mais alongados em pH variando de 5,0 a 6,5. Os autores sugerem ainda que o recrutamento de endossomos tardios/lisossomos, e consequente fusão com fagossomos, seja provocado pelo patógeno em questão, para a futura formação do tubo germinativo dentro do fagolisossomo.

A comparação entre os 3 isolados de *P. lilacinum* nesse estudo mostrou que todos se comportaram de maneira diferente, sendo que o isolado proveniente da região de biopsia de pele se apresentou mais invasivo, germinando e produzindo hifas no período mais curto (14h) em relação aos outros dois isolados (14h a 24h). Peixoto e colaboradores (2010) utilizando os mesmos 3 isolados, não viram diferença relacionada a infectividade quando eles infectaram macrófagos peritoneais de camundongos selvagens. Já Brito e colaboradores (2011) observaram diferenças quando compararam isolados de *P. lilacinum* provenientes de forma clínica da hialohifomicose e ambiental em modelo Balb/c *in vivo*. Esses dados vão a favor de Casadevall & Pirofski (2000) que sugerem que não são apenas os fatores de virulência do fungo que podem influenciar no curso da doença, mas também as condições do hospedeiro.

Este estudo não se deteve apenas na microscopia óptica, mas também foi expandido a nível ultra-estrutural. Em nosso experimento piloto de análise da interação macrófago-conídio por microscopia eletrônica de transmissão, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos selvagens, foi possível observar que em 30 minutos de incubação, os conídios já estavam se aderindo a parede do macrófago, diferente do que observamos por microscopia convencional. Nos demais tempos analisados, e de uma maneira geral, comprovamos o que já havia sido descrito na avaliação inicial. Desta forma, já no tempo de 5 horas, observamos conídios dilatados no interior do

macrófago. Na microscopia óptica, essas mesmas características só foram observadas no tempo de 14 horas. Os tubos germinativos de *P. lilacinum*, com presença ou não de septo, foram vistos em maiores detalhes no interior de macrófagos peritoneais murinos. Esse resultado é crucial, pois demonstra haver uma pequena diferença entre as duas técnicas microscópicas utilizadas neste estudo. Contudo deve-se salientar alguns nuances, pois essa diferença pode estar relacionada ao preparo das amostras e ao ambiente no qual os macrófagos foram expostos ao fungo, o qual pode exercer profunda influência no processo de infecção. Os macrófagos que interagiram com os conídios de *P. lilacinum* para a avaliação pela óptica foram incubados em câmaras, enquanto que para a avaliação ultra-estrutural, os mesmos foram incubados em garrafas de cultura.

Em 2003, utilizando a ultra-estrutura para observar a interação dos conídios de *A. fumigatus* com macrófagos humanos, mostrou-se que o macrófago foi capaz de formar pseudópodos durante o processo de fagocitose dos conídios (Ibrahim-Granet et al, 2003). Embora com outro fungo, este fato claramente corrobora com o que observamos no presente estudo. Este tipo de fagocitose, denominada *trigger*, envolve a polimerização de actina, e já foi observado na interação de macrófagos peritoneais e células epiteliais de camundongos C57BL/6 com *C. albicans* (Kaposzta et al, 1998; Tsarfaty et al, 2000). Outro estudo de Van Waeyenberghe e colaboradores (2012), agora observando a interação de macrófagos de pombos com conídios de *A. fumigatus*, também constatou que na primeira hora de infecção, já se podia confirmar que conídios haviam sido internalizados, e que em 5 horas de interação, era clara a germinação desses conídios, sendo que com 8 horas, houve clara destruição desses macrófagos.

As proteinases são enzimas que atuam sobre as proteínas, decompondo-as em peptídeos e aminoácidos, e desempenhando um papel fundamental no processo de cicatrização normal (Consenso Internacional, 2011). As principais proteinases presentes na matriz extracelular são conhecidas como MMPs, que atuam sobre diferentes proteínas daquele substrato, decompondo-as. De acordo com Gibson e colaboradores (1999), as MMPs são geradas pelas células inflamatórias ativadas, tais como os neutrófilos e macrófagos, que por sua vez produzem citocinas pró-inflamatórias que também estimulam a produção de mais MMPs. São conhecidas por contribuir na indução de resposta imune do hospedeiro e na patogênese de doenças agudas e crônicas, incluindo infecções (Parks et al. 2004, Manicone & McGuire 2008).

No presente estudo, a atividade de MMP-9 nos sobrenadantes obtidos das culturas de macrófagos peritoneais murinos KO nos diferentes tempos de infecção com *P. lilacinum* não apresentou alteração significativa em sua expressão, quando comparada ao controle não infectado. Estudos em pacientes com criptococose mostraram altos níveis de MMP-9 no líquido cefalorraquidiano (Liuzzi et al. 2000). No entanto, foi sugerido que a MMP-2 estava envolvida na patologia pulmonar de infecção por *C. neoformans*, pois a expressão de MMP-2 foi detectada em granulomas bem definido após a infecção (Majka et al. 2002). Supasorn e colaboradores (2016), também investigando a expressão de diferentes MMPs em infecções por *C. neoformans*, observaram um aumento na expressão de mRNA de MMP-3 e MMP-12, e atividade de MMP-12 após infecção com aquele patógeno. Já Mitchell e colaboradores (2007), em um estudo de perfis de MMPs durante a ceratite fúngica por *F. solani* em camundongos, observaram que ocorreu um aumento do nível de MMP-9 nas 6 horas após a exposição fúngica, retornando ao valor normal após o tratamento. As evidências no decorrer dos anos vêm mostrando a importância das MMPs como mediadores importantes na regulação da resposta imune de alguns hospedeiros, como seria o caso citado acima da criptococose pulmonar (Supasorn et al. 2016). A expressão precoce de MMPs pode funcionar promovendo o recrutamento de células inflamatórias, mas elas também podem estar envolvidas em danos nos tecidos durante a infecção crônica.

Citocina é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de moléculas, como interferons (IFN), interleucinas (IL), fatores estimuladores de colônias (CSF), fatores de necrose tumoral (TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ ) e fator de transformação e crescimento (TGF $\beta$ ), todas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes (Cavaillon 1996). Constituem um grupo de fatores solúveis proteicos extra-celulares, algumas contendo moléculas de açúcares ligadas, como as glicoproteínas, que podem ser produzidos por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos e outras que não sejam linfóides. As citocinas são produzidas durante a fase de ativação e fase efetora da imunidade para mediar e regular a resposta imunológica. Em geral, têm uma vida média curta. Estas estimulam somente células que apresentam receptores específicos na sua membrana (célula alvo) e têm uma ação extremamente potente (Cavaillon, 1996).

A família dos IFNs compreende um grupo de citocinas secretadas por todas as células nucleadas presentes em mamíferos, conhecidas pelas suas atividades antivirais, antiproliferativas e imunomoduladoras. IFN- $\alpha$  é conhecido por mediar o início

da resposta imune inata a infecções virais, atuando quer diretamente, através da inibição da replicação viral, ou indiretamente através da ativação, e potencializar as funções efetoras exercidas pelas células do sistema imune (Trinchieri, 2010). Mais importante, IFN- $\alpha$  é classicamente secretado por macrófagos para modular a resposta imune. Com relação a determinação dos níveis de IFN- $\alpha$  nos sobrenadantes de macrófagos de animais das linhagens selvagens e iNOS $^{-/-}$ , infectados com *P. lilacinum*, não demonstrou haver grande alteração quando relacionados ao tempo de infecção ou a comparação entre os dois modelos, apesar da necessidade de se confirmar estes achados. Em consonância, mas avaliando o IFN- $\gamma$ , Brito e colaboradores (2011) não observaram diferenças nos níveis deste outro IFN quando camundongos imunocompetentes foram infectados *in vivo* por *P. lilacinum*. Fernandes e colaboradores (2008) somente observaram diferenças na produção de IFN- $\gamma$  em esplenócitos após estimulação com o mitógeno Concanavalina A. Porém, esses autores utilizaram um modelo imunocompetente de infecção por *S. schenckii*. Loeffler e colaboradores (2009) mostraram que hifas e conídios de *A. fumigatus* apresentaram comportamentos diferentes quanto a expressão de várias citocinas e quimiocinas, como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , já que apenas os conídios na forma latente conseguiram induzir essas citocinas. Em outro trabalho relevante, Vieira (2008) relatou que macrófagos humanos infectados por *F. solani* produziram um aumento expressivo de TNF- $\alpha$  no início da infecção, sendo que o mesmo diminuiu após o período de 24 horas. Infelizmente, nenhum outro estudo utilizando uma molécula tão importante na sinalização celular entre fagócitos, como seria o IFN- $\alpha$ , foi feito para efeitos comparativos com o presente trabalho.

Algumas proteínas, como os CD de superfície, desempenham uma variedade de funções, incluindo participação nos processos de adesão e migração celular. Existem aproximadamente 320 tipos de proteínas com designado número de CD (Zola et al. 2006). Devido ao pouco ou quase nenhum conhecimento sobre os marcadores de superfície estimulados nas células imunes frente a infecção com *P. lilacinum* descritos na literatura científica contemporânea, nosso grupo resolveu escolher os marcadores que potencialmente poderiam ser regulados nas células fagocíticas, como CD14, CD38, CD11b, CD18, CD80 ou CD86. Tais receptores participam ativamente na modulação dos fagócitos em outros modelos experimentais. Assim, observamos que tanto em 14, quanto em 24 horas de infecção por *P. lilacinum*, ocorreu um aumento considerável da dupla expressão das moléculas CD18 e CD38 nos macrófagos



peritoneais da linhagem iNOS<sup>-/-</sup>. Esse fato nos leva a inferir que a interação célula hospedeira e *P. lilacinum* possivelmente induz o aumento de certos marcadores envolvidos na ativação macrofágica, mesmo em um modelo nocaute e com certo grau de imunossupressão. Por outro lado, determinados marcadores sofreram uma redução, como seria o caso da dupla expressão de CD14 e CD80, nas 14 horas iniciais de interação. Esta regulação negativa do CD14 já havia sido demonstrada na infecção *in vitro* de monócitos humanos pelo patógeno da hanseníase, o *Mycobacterium leprae* (Hernandez et al. 2003). Wang e colaboradores (2000) mostraram em seu estudo que CD14 estava diretamente envolvido na ativação de monócitos por hifas de *A. fumigatus*. Já Srinoulprasert e colaboradores (2009) mostraram que a adesão entre monócitos humanos e conídios de *P. marneffei* foi inibida quando o fungo foi tratado com anticorpos anti-CD14. Um estudo de 2005 mostrou o aumento do percentual de células B pulmonares e macrófagos expressando CD80 e CD86 nos animais sensibilizados com antígeno de *A. fumigatus*, um importante fungo responsável por episódios alérgicos, e os autores sugeriram que essa estimulação poderia contribuir para o aumento de células T, principalmente as que produzem citocinas do tipo Th2, um fenótipo relacionado a atopia (Barrios et al. 2005). Os 2 outros marcadores estudados no presente trabalho (CD11b e CD86) não pareceram sofrer mudanças significativas nos níveis de expressão mediante a infecção com conídios de *P. lilacinum* em ambos os tempos de interação. Jain e colaboradores (2015) mostraram recentemente, em um estudo de caso de um paciente de 62 anos com uma sepse fúngica incomum e causada pelo fungo *A. alternata*, um aumento da expressão de CD45, CD10, CD19, CD22 em amostra de sangue periférico. Com esse resultado, o paciente foi diagnosticado corretamente com leucemia linfoblástica aguda.

Um dado curioso é que na nossa interação *in vitro* utilizando câmaras onde as células ficaram aderidas, este processo pareceu facilitar a infecção, onde nos três isolados de *P. lilacinum* com 24 horas de interação, já não eram mais observados macrófagos intactos. O mesmo não foi visto quando a interação foi realizada em suspensão nos tubos para citometria de fluxo, onde foi inibida a aderência (Santos et al, 2016). Neste processo, observamos que em 24 horas ainda havia células viáveis expressando os marcadores de superfície utilizados. Certamente, e como são dados bem interessantes e que precisam ser extrapolados, o presente trabalho tem o viés de desdobramentos futuros.

No presente estudo, esperamos ter tornado reprodutível a técnica de infecção de 2 diferentes linhagens de macrófagos peritoneais murinos por conídios de *P. lilacinum*. Além disso, também observamos, em caráter inédito e comparativo, o papel que os conídios fagocitados tiveram no envolvimento das populações de macrófagos, sejam elas imunocompetentes ou deficientes de produção do radical NO, no que tange a ativação de algumas moléculas co-estimulatórias, e também na possibilidade desse fungo não ser capaz de induzir uma importante citocina inflamatória nos fagócitos murinos. Adicionando-se a esses resultados, esperamos ter contribuído para visualizar, seja ele de limitada capacidade ou ultra-estruturalmente, o mecanismo de interação do fungo com o macrófago durante a fagocitose e seu destino intracelular.

Como os únicos relatos referentes a esse fungo quanto aos aspectos objetivados nesse projeto foram gerados por nosso grupo em animais imunocompetentes e do mesmo *background* genético (Peixoto et al. 2010), a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese do mesmo será de grande contribuição para a prevenção, diagnóstico e tratamento futuro dessa micose.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados da análise *in vitro* da interação de macrófagos peritoneais murinos com conídios de *P. lilacinum* nos permitem concluir que:

- A metodologia de obtenção e isolamento de conídios de *P. lilacinum* se mostrou factível, com resultados satisfatórios em termos de quantidade e pureza da suspensão conidial.

- As técnicas de obtenção, de cultivo e de interação entre macrófagos peritoneais murinos da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> com *P. lilacinum* foram padronizadas com sucesso, servindo a estudos posteriores.

- Os 3 diferentes isolados de *P. lilacinum* testados aqui apresentaram comportamento diferente quando observados pela microscopia óptica, sendo que esta interação apresentou um comportamento semelhante nas fases iniciais da infecção, mas às 14 horas, apenas o isolado proveniente da pele foi capaz de produzir um micélio que destruiu os macrófagos, enquanto que os outros dois isolados produziram a mesma estrutura após 24 horas de infecção.

- As microscopias eletrônicas de transmissão e de varredura foram capazes de confirmar os resultados observados pela microscopia óptica. Além do mais, as definições ultra-estruturais revelaram nuances não observadas na técnica tradicional.

- Conídios de *P. lilacinum*, principalmente os isolados a partir da pele e da área tibial, foram capazes de induzir uma modulação significativa no perfil de marcadores de macrófagos peritoneais da linhagem iNOS<sup>-/-</sup> após a infecção. Essas mudanças foram encontradas para CD11b, CD14, CD18, CD38 e CD80. Esse fato nos leva a inferir que, apesar de intensa destruição do fagócito e perfil deficiente em NO, também há um aumento de certos marcadores envolvidos na ativação macrofágica.

- Os conídios de *P. lilacinum* nos experimentos realizados nesse projeto não foram capazes de induzir mudanças expressivas de padrão nas expressões de metaloproteinases e IFN $\alpha$  no decorrer da infecção.

## 8 PERSPECTIVAS

- Perfazer a comparação entre os modelos WT e KO durante a interação com os 3 isolados de *P. lilacinum*, usando as microscopias ótica e eletrônicas de transmissão e varredura.

- Perfazer a comparação no modelo KO na infecção com os 3 isolados de *P. lilacinum*, utilizando os mesmos marcadores de superfície.

- Avaliar uma gama maior de monocinas nos modelos WT e KO na infecção com os 3 isolados de *P. lilacinum*, utilizando o ensaio de luminex.

- Fazer a infecção in vivo no modelo KO com os 3 isolados de *P. lilacinum*

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aerts AM, François IE, Cammue BP, Thevissen K. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins *Cell Mol Life Sci*. 2008 Jul;65(13):2069-79.

Alvarez M, Casadevall A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunology* 2007; 8:16.

American Academy of Otolaryngology 2002

Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Lee C, Summerbell RC, Rex JH, Monson TP & Walsh TJ Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2003; 101: 2542–2546.

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 Infect* 2012; 14:1-8.

Araújo AJG, Souza MAJ, Bastos OMP, Oliveira JC. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. *An Bras Dermatol*. 2003;78:445-55.

Atkins SD, Clark IM, Pande S, Hirsch PR, Kerry BR. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Ecol*. 2005 1;51(2):257-64.

Barrios CS, Johnson BD, Henderson JD, Jr, Fink JN, Kelly KJ, Kurup VP. The coestimulatory molecules CD80, CD86 and OX40L are up-regulated in *Aspergillus fumigatus* sensitized mice. *Clin Exp Immunol*. 2005; 142(2):242 250.

Bassiri Jahromi S, KhaksarIran AA. Cutaneous hyalohyphomycosis 18 in a woman with normal immune system. *Iran J Med Sci* 2007 ; 32: 51 – 53.

Bellocchio S, Gaziano R, Bozza S, Rossi G, Montagnoli C, Perruccio K, Calvitti M, Pitzurra L, Romani L. Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4. *J Antimicrob Chemother*, 2005,55: 214-222.

Blackwell V, Ahmed K, O'Docherty C & Hay RJ. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in a renal transplant patient. *British Journal of Dermatology* 2000; 143: 873-77.

Bonants PJ, Fitters PF, Thijs H, den Belder E, Waalwijk C, Henfling JW. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne* hapla eggs. *Microbiology*. 1995 Apr;141 (Pt 4):775-84.

Bradfield JF, Wagner JE, Boivin GP, Steffen EK, Russell RJ Epizootic fatal dermatitis in athymic nude mice due to *Staphylococcus xylosus*. *Lab Anim Sci*. 1993 Feb;43(1):111-3.

Brito MM, Lima Mda S, Morgado FN, Raibolt P, Menezes R, Conceição-Silva F, Borba C de M. Matrix metalloproteinases contribute to the regulation of chemokine expression and pulmonary inflammation in *Cryptococcus* infection *Mycoses*. 2011; May 23. 513-21

Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of in vitro passage and storage. *Mycopathologia*.1990; 109: 13-17.

Campos M.R, Russo M, Gomes E, Almeida S.R. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect*. 2006 Feb; 8(2):372-9.

Carey J, D'Amico R, Sutton DA, Rinaldi MG *Paecilomyces lilacinus* vaginitis in an immunocompetent patient. 2003 *Emerg Infect Dis* 9:1155–1158.

Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections *Infect Immun*. 1995;63(11):4211-8.

Casadevall A, Pirofski LA Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun*. 2000; 68(12):6511-8.

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.

Cavaillon J.M., *Les cytokines*, Edições Masson, 1996

Cavaillon J.M., *Molecular mediators: Cytokines*", em "*Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*", 2ª Edição, Vol. 8Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Alemanha, 2005, pp 431-460

Consenso internacional. *Función de las proteasas en el diagnóstico de heridas*. Revisión de un grupo de trabajo de expertos. Londres: Wounds International; 2011

Cramer, R., and K. Blaser. Allergy and immunity to fungal infections and colonization. *European Respiratory Journal* 2002; 19:151–157

Deng SX, Kamal KM, Hollander DA. The use of voriconazole in the management of post-penetrating keratoplasty *Paecilomyces* keratitis. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2009 Apr; 25(2):175-7.

Dennis CG, Greco WR, Brun Y, Youn R, Slocum HK, Bernacki RJ, Lewis R, Wiederhold N, Holland SM, Petraitiene R, Walsh TJ & Segal BH. Effect of amphotericin B and micafungin combination on survival, histopathology, and fungal burden in experimental aspergillosis in the p47phox<sup>-/-</sup> mouse model of chronic granulomatous disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 50: 422-7.

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

Ellis DH, Marley JE, Watson AB & Williams TG. Significance of non-dermatophyte moulds and yeast in onychomycosis. Dermatology 1997; 194 (Suppl 1): 40-42.

Evans J M, a Apphia L. Wang B. and Elewskib B E. Successful Treatment of Paecilomyces lilacinus Onychomycosis with Efinaconazole and Tavaborole Skin Appendage Disord. 2016 May; 1(4): 169–171.

Fernandes KSS, Neto EH, Brito MMS, Silva JS, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defense against Sporothrix schenckii. Immunology 2008; 123: 469–79.

Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 1997 Jun; 61(2):136-69

Fletcher CL, Hay RJ, Midgley G, Moore M. Onychomycosis caused by infection with Paecilomyces lilacinus. Br J Dermatol. 1998; 139:1133–1135

Flora Filho R. and Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras. 2000, vol.46, n.3, pp.265-271.

Freitas DFS, Valle ACF, Silva MBT, Campos DP, M R Lyra, Souza RV, Veloso VG, Zancopé-Oliveira RM, Bastos FI, and Galhardo MCG. Sporotrichosis: An Emerging Neglected Opportunistic Infection in HIV-Infected Patients in Rio de Janeiro, Brazil PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(8): e3110.

Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat. Rev. Immunol. 2003; 3:710-720.

Garbino J, Ondrusova A, Baligvo E, Lew D, Bouchuiguir-Wafa K, Rohner P 2002. Successful Treatment of Paecilomyces lilacinus Endophthalmitis with Voriconazole Scandinavian Journal of Infectious Diseases 34: 2002; 701-703.

Gibson, D., Cullen, B., Legerstee, R., Harding, K.G., Schultz, G... MMPs Made leukocytes in vitro. Infec Immun. 1999; 67(9):4732-4736.

Goihman-Yahr M, Pine L, Albornoz MC, Yarzabal L, Gómez MH, San Martín B, Ocanto A, Molina T, Convit J. Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of Paracoccidioides brasiliensis yeast cells. Mycopathologia. 1980 Jul 1;71(2):73-83.

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

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.

Gucalp R, Carlisle P, Gialanella P, Mitsudo S, McKittrick J, Dutcher J Paecilomyces sinusitis in an immunocompetent adult patient: case report and review. Clin Infect Dis. 1996;23:391–393

Gutierrez F, Masia M, Ramos J, Elia M, Mellado E, Uenca-Estrella M. Pulmonary mycetoma caused by an atypical isolate of Paecilomyces species in an immunocompetent individual: Case report and literature review of Paecilomyces lung infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24:607–11

Gutiérrez Rodero F, Moragon M, Ortiz de la Tabla V, Mayol MJ, Martin C Cutaneous hyalohyphomycosis caused by Paecilomyces lilacinus in an immunocompetent host successfully treated with itraconazole: case report and review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999; 18:814–818

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.

Haneke E. Fungal infections of the nail. Semin Dermatol 1991; 10: 41-53

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.

Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by Mycobacterium leprae in vitro: a possible role for tumor necrosis factor-alpha. Immunology. 2003; 109(1): 156-64.

Houbraken J, López-Quintero CA, Frisvad JC, Boekhout T, Theelen B, Franco-Molano AE & Samson RA Five new Penicillium species, P. araracuarensis, P. elleniae, P. penarajense, P. vanderhammenii and P. wotroi, from Colombian leaf litter. Int J Evol Syst Microbiol. 2011; 61: 1462–1475.

Houbraken J, Verweij P E., Rijs A J. M. M., Borman A M., and Samson R A. Identification of Paecilomyces variotii in Clinical Samples and Settings. J Clin Microbiol. 2010 Aug; 48(8): 2754–2761.

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

Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, Latgé JP. Phagocytosis and intracellular fate of Aspergillus fumigatus conidia in alveolar macrophages. Infection and Immunity 2003; 71(2): 891-903.

Inglis, P. W.; Tigano, M.S. Identification and taxonomy of some entomopathogenic Paecilomyces spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. Genetics and Molecular Biology.V.29, n. 1, p. 132-6, 2006.



Innocenti P, Pagani E, Vigl D, Höpfl R, Huemer HP, Larcher C: Persisting *Paecilomyces lilacinus* nail infection following pregnancy. *Mycoses* 2011; 54:e880–e882.

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): 401-9.

Jackson SH, Gallin JI & Holland SM. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *The Journal of experimental medicine* 1995; 182: 751-8.

Janeway CA. Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.

Kaposzta, R.; Tree, P.; Marodi, L.; Gordon, S. Characteristics of invasive candidiasis in gamma interferon and interleukin-4- deficient mice: role of macrophage in host defense against *Candida albicans*. *Infection and Immunity, Washington.* 1998; v. 66, n. 4, p. 1708-1717,

Kenna ME, Elewski BE. A US epidemiological survey of superficial fungal diseases. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35: 539-42.

Khan Z, Ahmad S, Al-Ghimlas F, Al-Mutairi S, Joseph L, Chandy R, Sutton DA, Guarro J, Ding CH, Tzar MN, Rahman MM, Muttaqillah NAS, Redzuan SRM, Periyasamy P. *Paecilomyces lilacinus* fungaemia in an AIDS patient: the importance of mycological diagnosis. *Pakistan Journal of Medical Sciences.* 2014;30(4):914-916.

Kurzai O, Vaeth T, Hamelmann W, Müller FMC, Klinker H, Langmann P, Frosch M & Mühlischlegel. Combined surgical and antifungal treatment of a subcutaneous infection due to *Paecilomyces lilacinus*. *Medical Mycology* 2003; 41: 253-258.

Latgé J. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:310-350.

Levitz SM. Overview of host defenses in fungal infections. *Clin Infect Dis.* 1992 Mar;14 Suppl 1:S37-42.

Li XL, Zhang CL, Fang WH, Lin FC. White-spot disease of Chinese soft-shelled turtles (*Trionyx sinens*) caused by *Paecilomyces lilacinus* *J Zhejiang Univ Sci B.* 2008; 9(7):578-81.

Lima, D.A. Quantificação de fases cristalinas de incrustações em colunas de produção de petróleo pelo método Rietveld. fl. 109. *Dissertação (Mestrado) – Ciência e Engenharia do Petróleo.* Natal - RN, 2010.

Liu, K.; Howell, D.N.; Perfect, J.R.; Schell, W.A. Morphologic Criteria for the preliminary identification of *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Acremonium* Species by histopathology. *American Journal of Clinical Pathology.* 1998; .V. 109, n. 1, p. 45-54.

Liuzzi GM, Mastroianni CM, Santacroce MP et al. Increased activity of matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurological diseases. *J Neurovirol* 2000; 6:156–63.

- Loeffler J, Haddad Z, Bonin M, Romeike N, Mezger M, Schumacher U, et al. Interaction analyses of human monocytes cocultured with different forms of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol*. 2009; 58(Pt 1):49–58.
- López-Medrano R, Pérez M A, Fuster F C. Eye infections caused by *Purpureocillium lilacinum*: A case report and literature review. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32(2):111-4.
- Lovell RD, Moll M, Allen J, Cicci LG. Case report disseminated *Paecilomyces lilacinus* infection a patient with AIDS. *AIDS Read*. 2002; 12: 212-21.
- Luangsa-Ard J, Houbraken J, van Doorn T, et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Lett*; 2011; 321: 141 – 149.
- Maier AK, Ozlügedik S, Rottler J, Heussen FM, Klamann MK, Huber KK, Jousen AM, Winterhalter S Efficacy of postoperative immunosuppression after keratoplasty in herpetic keratitis. *Cornea*. 2011;30(12):
- Majka SM, Kasimos J, Izzo L, Izzo AA. *Cryptococcus neoformans* pulmonary granuloma formation is associated with matrix metalloproteinase-2 expression. *Med Mycol*. 2002 ;40(3):323-8.
- Malecha MA, Tarigopula S, Malecha MJ. Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* keratitis in a patient with a history of herpes simplex virus keratitis. *Cornea*. 2006;25(10):1240-2.
- Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19:34–41.
- Martin CA, Roberts S & Greenberg RN. Voriconazole treatment of disseminated *Paecilomyces* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 35: e78-e81.
- Mathon CR. Textbook of diagnostic microbiology. Ed Saunders Elsevier, Missouri, EUA. 2000; .p.1101-2.
- Mazet I, Pendland J, Boucias D. Comparative analysis of phagocytosis of fungal cells by insect hemocytes versus horse neutrophils. *Dev Comp Immunol*. 1994;18(6):455-66.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997; 31;91(3):295-8.
- Meier A, Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol*. 2003;5(8):561-70.
- Minogue MJ, Francis IC, Quatermass P, Kappagoda MB, Bradbury R, Walls RS, Motum PI. Successful treatment of fungal keratitis caused by *Paecilomyces lilacinus*. *American Journal of Ophthalmology* 1984;98(5): 626-7.

Mitchell BM, Wu TG, Chong EM, Pate JC, Wilhelmus KR. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in experimental corneal injury and fungal keratitis. *Cornea*. 2007;26(5):589-93. PMID:

Monteiro da Silva, J.L.; Andreotti, P.F.; Mendes-Gianni, M.J.S. Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células endoteliais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2005; V.26, n.2, p.149-156.

Montiel HV Patógenos emergentes en micosis cutáneas y sistémicas. *Dermatología Venezolana*. 2004; 42(2): 4-18.

Murciano A, Domer J, Cohen I. *Paecilomyces lilacinus* infection in an immunocompromised patient. *Journal La State Med Society* 1990;142: 35-7.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000 ;52(1):145-76.

Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, 1992 v. 6, n.12, p.3051–3064.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994; 23;78(6):915-8.

Nayak DR, Balakrishnan R, Nainani S, Siddique S. *Paecilomyces* fungus infection of the paranasal sinuses. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2000 ;52:183–187.

Netea MG, Ferwerda G, van der Graaf CA, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Curr Pharm Des*. 2006;12(32):4195-201.

Netea MG1, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Van der Meer JW. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol*. 2002; 23(3):135-9

O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 1998; 8(3):275-83.

Okada G, Sakai N, Yamagishi M. Acremonium-like submerged conidiation in *Paecilomyces nostocoides* and *P. lilacinus*. *Mycoscience*.1995; 36: 345–351.

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. *Ann Internal Med*.1996; 125: 799–806.

Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:617–29.

Pastor FJ, Guarro J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. *Clin Microbiol Infec* 2006;12: 948–960.

Pawloski DR, Brunker JD, Singh K, Sutton DA. Pulmonary Paecilomyces lilacinus infection in a cat. J Am Anim Hosp Assoc 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(6): 529-34.

Perca S, Ramos MJ, Garau M, Gonzoles A, Noriega AR, del Palacio A. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. J Clin Microbiol 2000; 38(9): 3226-30.

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

Perkhofer S, Speth C, Dierich MP, Lass-Flörl C. In vitro determination of phagocytes. Mycopathologia. 2007; 163(6):303-307.

Permi H S, Sunil K Y, Karnaker V K, Kishan P H L, Teerthanath S, and Bhandary S K. A Rare Case of Fungal Maxillary Sinusitis due to Paecilomyces lilacinus in an Immunocompetent Host, Presenting as a Subcutaneous Swelling .J Lab Physicians. 2011; 3(1): 46–48.

Pettit TH, Olson RJ, Foos RY & Martin WJ Fungal endophthalmitis following intraocular lens implantation. A surgical epidemic. Arch Ophthalmol. 1980; 98: 1025–1039.

Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prévost MC, Gougerot-Pocidaló MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, Latgé JP. Killing of Aspergillus fumigatus by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. Infect Immun. 2003;71(6):3034-42

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.

Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, Orkin SH, Doerschuk CM, Dinauer MC. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production Nat Genet. 1995;9(2):202-9.

Polonelli L, Casadevall A, Han Y, Bernardis F, Kirkland TN, Matthews RC, Adriani D, Boccanera M, Burnie JP, Cassone A, Conti S, Cutler JE, Frazzi R, Gregory C, Hodgetts S, Illidge C, Magliani W, Rigg G, Santoni G. The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. Med Mycol. 2000;38 Suppl 1:281-92.

Popi AF, Lopes JD, Mariano M. Gp43 from Paracoccidioides brasiliensis inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. Cell Immunology 2002; 218: 87-94.

Portaria Nº 1.271, de 6 de junho de 2014, [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt1271\\_06\\_06\\_2014.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt1271_06_06_2014.html)

- Prabhu S, Kumar S, Subramanian S, Senthil K. Mass production and commercial formulation of *Paecilomyces lilacinus*. *Indian J Nematol* 2008; 32:350-358.
- Riddell, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia*. 1950; 42:265-270.
- Robbins, *Patologia Estrutural e Funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 1251p.
- Roberts DT. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: results of an omnibus survey. *Br J Dermatol* 1992; 126 : 23-27.
- Robertson MD, Seaton A, Raeburn JA. Phagocytic cell responses to *Aspergillus fumigatus* FEMS *Microbiol Immunol*. 1989;1(5):305-6.
- Rockhill RC, Klein MD. *Paecilomyces lilacinus* as the cause of chronic maxillary sinusitis. *J Clin Microbiol*. 1980;11:737–739.
- Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol*. 2004;42(6):485-98.
- Romani A, Ieri F, Turchetti B, Mulinacci N, Vincieri FF, Buzzini P Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. *J Pharm Biomed Anal*. 2006 3;41(2):415-20.
- Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nature reviews: Immunology*, London. 2004; v. 4, n. 1, p. 1-13.
- Rongrungrung Y, Levitz S. Interaction of *Penicillium manerfei* with human leukocytes in vitro. *Infec Immun* 1999: 67:4732-4736
- Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:217-42.
- Rowley SD, Strom CG. *Paecilomyces* fungus infection of the maxillary sinus. *Laryngoscope*. 1982; 92:332–334.
- Saghrouni F, Saidi W, Said B Z, Gheith S, Said B M, Ranque S, Denguezli M., Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Purpureocillium lilacinum* in an immunocompetent patient: case report and review. *Medical Mycology* August 2013; 51, 664–668
- Samson RA *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Stud Mycol*.1974; 6: 1–119.
- Santos DO, Coelho JG, Neri ECL, Campos-Souza IC, Ponte CGG, Antas PRZ. The differential in vitro presentation of *Mycobacterium leprae* antigens by human dendritic cells is determined by the mechanism of host cell adhesion. - *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 2016, 7 pp. 443.

Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest.* 1982; 69(3):617–631.

Schaffner, A, Douglas H, Braude A I, Davis CE. Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophages. *Infect Immun* 1983; 42:1109-1115

Sharma V., Angrup A., Panwar P., Verma S., Singh D., Kanga A. Keratitis by *Paecilomyces lilacinus*: A case report from Sub-Himalayan region. *Indian J Med Microbiol.* 2015; 33(4):585-7

Sholam S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology* 2005; 129: 569-82.

Sikora R. A & Fernandez, E. *Nematodes parasites of vegetables* (Ed.). Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2nd ed. Wallingford: Cabip. 2005; 319-392.

Silliman CC, Lawellin DW, Lohr JA, Rodgers BM, Donowitz LG. *Paecilomyces lilacinus* infection in a child with chronic granulomatous disease. *Journal of Infection* 1992;24: 191-195.

Silva, J. S.; Vespa, G. N.; Cardoso, M. A.; Alibert, J. C.; Cunha, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected-gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.* 1995; v.63, p.4862–4867.

Srinoulprasert Y, Pongtanalert P, Chawengkirttikul R, Chaiyaroj SC. Engagement of *Penicillium marneffei* conidia with multiple pattern recognition receptors on human monocytes. *Microbiol Immunol.* 2009 ;53(3):162-72.

Steinstraesser L, Koehler T, Jacobsen F, Daigeler A, Goertz O, Langer S, Kesting M, Steinau H, Eriksson E, and Hirsch T. Host Defense Peptides in Wound Healing. *Mol Med.* 2008; 14(7-8): 528–537.

Stirling GR & West LM. West. Fungal parasites of root-knot nematode eggs from tropical and subtropical regions of Australia. *Australasian Plant Pathology.* 1991, v 20, Issue 4, pp 149–154

Supasorn O, Sringkarin N, Srirmanote P, Angkasekwinai P. Matrix metalloproteinases contribute to the regulation of chemokine expression and pulmonary inflammation in *Cryptococcus* infection. *Clin Exp Immunol.* 2016 Mar;183(3):431-40.

Takayasu Susumu, MD; Masashi Akagi, MD; Yoko Shimizu, MT. Cutaneous Mycosis Caused by *Paecilomyces lilacinus*. *Arch Dermatol* 1977; 113:168 –1690.

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.

- Traynor TR, Huffnagle GB. Role of chemokines in fungal infections. *Med Mycol.* 2001; 39(1):41-50.
- Trinchieri, G. Type I interferon: friend or foe? *J. Exp. Med.* 2010; 207, 2053–2063.
- Tsarfaty I, Sandovsky-Losica H, Mittelman L, Berdicevsky I, Segal E. Cellular actin is affected by interaction with *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 15;189(2):225-32.
- Van Shoonveld T, Freifeld A, Lesiak B, Kalil A, Sutton DA, Iwen PC. *Paecilomyces lilacinus* infection in a liver transplant patient: case report and review of literature. *Transpl Infect Dis.* 2008; 10:117–122.
- Van Waeyenberghe L, Pasmans F, D'Herde K, Ducatelle R, Favoreel H, Li SJ, Haesebrouck F, Martel A. Germination of *Aspergillus fumigatus* inside avian respiratory macrophages is associated with cytotoxicity. *Vet Res.* 2012 Apr 19; 43:32.
- Vartivarian SE, Anassie EJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis and management. *Clinical Infectious Diseases* 1993; 17(Suppl 2): 487-91.
- Vieira HL, Queiroga CS, Alves PM. Pre-conditioning induced by carbon monoxide provides neuronal protection against apoptosis. *J Neurochem.* 2008; 107(2):375-84..
- Vieira RT. Interação de *Leishmania amazonensis*, *Mycobacterium leprae* e *Fusarium solani* com macrófagos humanos – papel do óxido nítrico e derivados sintéticos de piridinas. Dissertação- Universidade Federal Fluminense. 2008; Rio de Janeiro.
- Walsh TJ & Groll AH. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transplant Infectious Disease.* 1999; 1: 247-261.
- 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.
- Wang C, Wu J, Mei X. Enhancement of Taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001; 55(4):404-10.
- Wang L, Yokoyama K, Miyaji M, Nishimura K. Mitochondrial cytochrome b gene analysis of *Aspergillus fumigatus* and related species. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1352–1358.
- Washburn RG, Gallin JI, Bennett JE. Oxidative killing of *Aspergillus fumigatus* proceeds by parallel myelo peroxidase-dependent and – independent pathways. *Infect Immun* 1987; 55:2088-2092.
- Wessollosky M, Haran JP, Bagchi K. *Paecilomyces lilacinus* olecranon bursitis in an immunocompromised host: case report and review. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 61(3):354-7.

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.

Williamson PR, Kwon-Chung KJ & Gallin JI. Successful treatment of *Paecilomyces varioti* infection in a patient with chronic granulomatous disease and review of *Paecilomyces* species infections. *Clinical Infectious Diseases* 1992; 14: 1023-6.

Winn, RM, Gil-Lamaignerer C, Maloikou AVGI, Roilides E. The Eurofung Network. Interactions of human phagocytes with mould *Fusarium* spp. and *Verticillium nigrescens* possessing different pathogenicity. *Med Mycol* 2003; 41:503-509.

Wong G, Nash R, Barai K, Rathod R, Singh A. *Paecilomyces lilacinus* causing debilitating sinusitis in an immunocompetent patient: a case report. *J Med Case Rep*. 2012; 26; 6:86.

Wu, Pei-Chen MD; Lai, Chien-Hsiung MD; Tan, Hsin-Yuan MD; Ma, David HK MD, PhD; Hsiao, Ching-Hsi MD. The Successful Medical Treatment of a Case of *Paecilomyces lilacinus* Keratitis. *Cornea*: 2010 - v 29 - Issue 3 - 357-358

Zendri E, Martignoni G, Benecchi M, Fanti FD, Panfilis G. *Paecilomyces lilacinus* cutaneous infection associated with a dog bite. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 63–64

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000; 12(2):121-7.

Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Bühring HJ, Clark G, Engel P, Fox D, Jin BQ, Macardle PJ, Malavasi F, Mason D, Stockinger H, Yang X. CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods*. 2007; 318 (1–2): 1–5.



## 10 APÊNDICES E/OU ANEXOS

### Artigos publicados no período

**Human neonates display altered ex vivo monokine production related to healthy adults. Immunology Letters. v.170, p.64 - 67, 2016.** ANTAS, PAULO R.Z.; PEDRO, THAÍZE Q.C.; SANTIAGO, ELIANA A.; LIMA, JESSICA R.; SILVA, FERNANDA C.; MELCA, LUIS A.V.; PONTE, CARLOS G.G.

**A side-by-side comparison of T cell reactivity to fifty-nine Mycobacterium tuberculosis antigens in diverse populations from five continents. Tuberculosis (Edinburgh). v.14, p.30089-5 - , 2015.** CARPENTER, CHELSEA; SIDNEY, JOHN; KOLLA, RAVI; NAYAK, KAUSTUV; TOMIYAMA, HELENA; TOMIYAMA, CLAUDIA; PADILLA, OSCAR A.; ROZOT, VIRGINIE; AHAMED, SYED F.; PONTE, CARLOS; ROLLA, VALERIA; ANTAS, PAULO R.; CHANDELE, ANMOL; KENNETH, JOHN; LAXMI, SEETHA; MAKGOTLHO, EDWARD; VANINI, VALENTINA; IPPOLITO, GIUSEPPE; KAZANOVA, ALEXANDRA S.; PANTELEEV, ALEXANDER V.; HANEKOM, WILLEM; MAYANJA-KIZZA, HARRIET; LEWINSOHN, DAVID; SAITO, MAYUKO; MCELRATH, M. JULIANA; BOOM, W. HENRY; GOLETTI, DELIA; GILMAN, ROBERT; LYADOVA, IRINA V.; SCRIBA, THOMAS J.; KALLAS, ESPER G.; MURALI-KRISHNA, KAJA; SETTE, ALESSANDRO; LINDESTAM ARLEHAMN, CECILIA S.

**Comments on the elevated IL-27 expression in neonates: relevance between detecting nucleotide sequence or protein synthesized. Immunology Letters. v.164, p.53,54 - , 2015.** ANTAS, PAULO R.Z.; LIMA, JESSICA R.; PEDRO, THAÍZE Q.C.; SILVA, FERNANDA C.; PONTE, CARLOS G.G.

**In vitro T-cell profile induced by BCG Moreau in healthy Brazilian volunteers. Human Vaccines & Immunotherapeutics. v.11, p.450 - 457, 2015.** PONTE, C; PERES, L; MARINHO, S; LIMA, J; SIQUEIRA, M; PEDRO, T; DE LUCA, P; CASCABULHO, C; CASTELLO-BRANCO, L R; ANTAS, P R Z

**Notes for the Immune Responses in Neonates: Commonly Expected Dampening of the Type-1 Associated Immunity during BCG Vaccination. Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies. , v.03, p.124 - , 2015** PAULO RZ ANTAS; JESSICA R LIMA, THAÍZE QC PEDRO, CARLOS GG PONTE

**The role of host soluble inflammatory mediators induced by the BCG vaccine for the initiation of in vitro monocyte apoptosis in healthy Brazilian volunteers. Journal of Inflammation (London. Online). v.12, p.60 - , 2015.** LIMA, JESSICA; SIQUEIRA, MARIANA; PEDRO, THAÍZE; PONTE, CARLOS; PERES, LEANDRO; MARINHO, SUELEN; CASTELLO-BRANCO, LUÍZ R.; ANTAS, PAULO R. Z.

## **Participação em eventos no período**

- 30 anos de Simpósios e Cursos Yakult de Imunologia: Microbiota e Imunidade. SP, 2015. (Encontro)
- 4th International Conference and Exhibition on Immunology. Human Neonates Display Altered Ex Vivo Monokine Production Related To Healthy Adults. 5, 2015. (Encontro)
- 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Fortaleza, 2015.
- Seminário Comemorativo dos 35 anos da Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, 2015. (Seminário)
- XXVIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015.
- 52º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Fortaleza, 2016.
- Semana da Pós-graduação Stricto sensu do Instituto Oswaldo Cruz, 2016

## **Participação na orientação de Alunos de Iniciação Científica**

- Victor Neves da Fonseca. Avaliação in vitro da vacina BCG Moreau RDJ como indutora de apoptose via ATP em monócitos humanos. 2014/2015. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Instituto Oswaldo Cruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- Alana da Silva de Oliveira. Estudo da infecção in vitro de macrófagos humanos dos fenótipos M1 e M2 pela vacina BCG Moreau. Início: 2015/2016. Iniciação científica (Graduando em Biomedicina-IBMR) - Instituto Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz.
- Ana Luiza Macedo Soares. Avaliação in vitro da vacina BCG Moreau RDJ como indutora de apoptose via ATP em monócitos humanos. Início: 2016. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) - Instituto Oswaldo Cruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- Sandra Elizabete Carlos Ribeiro. N.A.. Início: 2016. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas: Modalidade Médica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Orientador).
- Lawrence Henrique Paz Albuquerque. Avaliação da vacina BCG Moreau como indutora in vitro de marcadores fenotípicos em monócitos humanos. Início: 2016. Iniciação científica (Graduando em Biomedicina) - Universidade Estácio de Sá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- Matheus Rogério Almeida. Desenvolvimento de um novo ensaio de potência para a vacina BCG Moreau utilizando cultivos de células dendríticas humanas. Início: 2016. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Veiga de Almeida, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- Lucas Wanderley Gaudie-Ley. Avaliação da vacina BCG Moreau como indutora de apoptose in vitro utilizando as vias TRAIL, FAS, IL-1b e TNF em monócitos humanos. Início: 2016. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Veiga de Almeida, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do RJ.