Giovanna Azevedo Celestrino

Reconhecimento do *Trichophyton rubrum* pelos monócitos humanos: papel dos receptores de lectina do tipo C e do tipo *toll*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientadora: Dra. Maria da Glória Sousa Stafocker

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Celestrino, Giovanna Azevedo
Reconhecimento do *Trichophyton rubrum* pelos
monócitos humanos : papel dos receptores de lectina
do tipo C e do tipo toll / Giovanna Azevedo
Celestrino. -- São Paulo, 2020.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientadora: Maria da Glória Sousa Stafocker.

Descritores: 1.Receptores toll-like 2.Lectinas
tipo C 3.Dermatofitose 4.Imunidade inata 5.Monócitos
6.*Trichophyton rubrum* 7.Dermatófitos

USP/FM/DBD-246/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho àqueles que estiveram comigo em todos momentos da minha vida, que me incentivaram e sempre acreditaram em mim. Que me guiam pelo melhor caminho, e que sei que nunca irão me deixar sozinha. Minha base de amor! Aos meus pais Pedro Sergio Celestrino e Rosana de Azevedo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Glória Sousa, por todos ensinamentos, pela orientação, paciência, confiança e amizade, e por ser sempre tão inspiradora. Obrigada pela oportunidade, pelo suporte constante e por me guiar durante todo o processo. Todas as conversas e discussões, assim como os puxões de orelha, me fizeram crescer muito pessoalmente e profissionalmente.

À Ana Paula Reis, Daniel Valério, Franciele Correia e Thais Martins, meus irmãos de orientadora, por toda ajuda, apoio, paciência, risadas de alívio nos momentos de tensão, e por sempre acreditarem em mim e não me deixarem desistir.

Às minhas mães, Rosana e Sônia, por todo amor, carinho, e apoio incondicional. Com certeza não teria conseguido sem vocês.

À todos funcionários, alunos e ex alunos do LIM-53: Gabriel Naves, Gabrielle Haddad, Fábio Lorenzo, Flaviano Luiz, Camila Midori, Viviane Gimenes, Sonia Cavalcante, Roseli Freitas, Mônica Vidal, Danilo Yamamoto, Lumena Siqueira, Vanessa Moraes, Priscila Nagatomo, Dona Antônia e Dona Katia, pela amizade, convivência, aprendizado, e por serem sempre muito solícitos fazendo com que, desde meu primeiro dia, me sentisse muito bem e em casa.

Aos chefes do LIM-53, Prof. Dr. Gil Benard, Prof. Dr. Carlos Taborda e Dra. Gilda del Negro, por tornarem possível a realização desse trabalho, disponibilizando o laboratório para a realização de todos os experimentos.

Às funcionárias do LIM 48, pela disponibilização e auxílio no uso dos aparelhos, e em especial à Dra. Paula Sato pela ajuda nas análises dos dados de citometria.

À minha banca de qualificação: Dr Angelo Lindoso, Dra Suelen Rossi e Dr John Veasey por todas dicas e valiosas sugestões para melhorias na dissertação.

À Margoth Ramos, técnica responsável pelo setor de microscopia confocal do laboratório de Nefrologia Celular da FMUSP.

À Daniel Lopes, enfermeiro do LIM-56.

À Fernanda Simões, Victor Vaz, Leonardo Rabelo, Larissa Andrade, Aline Tavares, Roberta Souza, Auri Lopes, Marilene Purificação e todos que mesmo de longe, fizeram parte disso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP #2018/16146-8), pelo auxílio na realização deste trabalho.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Resposta imune nas infecções fúngicas	3
1.2 Resposta imune da dermatofitose	9
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVO	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Fungo	17
4.2 Preparação de conídios	17
4.3 Grupo avaliado.....	17
4.4 Separação dos monócitos	17
4.5 Participação dos receptores de lectina do tipo C (CLR) e do tipo <i>Toll</i> (TLR) no reconhecimento do <i>T. rubrum</i>	18
4.6 Citometria de fluxo para identificação fenotípica e ensaio de fagocitose	18
4.7 Ensaio de fagocitose/ <i>binding</i> por coloração de <i>Giemsa</i>	19
4.8 Ensaio de fagocitose por microscopia confocal	19
4.9 Quantificação de nitrito (NO ₂ ⁻)	20
4.10 Quantificação de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10.....	20
5. RESULTADOS	22
5.1 Cinética da interação dos monócitos com o <i>T. rubrum</i>	22
5.2 Identificação e avaliação fenotípica dos monócitos e ensaio de fagocitose	23
5.3 Ensaio de fagocitose dos conídios de <i>T. rubrum</i> pelos monócitos por microscopia confocal	25
5.4 A fagocitose do <i>T. rubrum</i> é prejudicada com o bloqueio do TLR2	26
5.5 O TLR2 não participa da produção de NO pelos monócitos, mas promove a produção de citocinas pró-inflamatórias após interação com conídios de <i>T. rubrum</i>	28
5.6 A fagocitose do <i>T. rubrum</i> é reduzida com o bloqueio do receptor de Manose, mas não com o bloqueio de Mincle e Dectina-1	32

5.7 Os receptores MR, Mincle e Dectina-1 promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias após interação com conídios de <i>T. rubrum</i>	35
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	44
8. REFERÊNCIAS	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: Microlitros

μg: Microgramas

μM: Micromolar

Act1: *Alpha-actinin1*

APC: Célula apresentadora de antígeno

AP-1: *Activator protein 1*

BSA: Albumina de soro bovino

CARD9: *Caspase recruitment domain-containing protein 9*

Ca²⁺: Cálcio

CLR: Receptor de lectina do tipo C

CO₂: Dióxido de carbono

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HBD-1: *Human beta-defensin-1*

HBD-2: *Human beta-defensin-2*

ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule 1*

IF: Índice de fagocitose

IFN-γ: *Interferon gamma*

IgA: Imunoglobulina A

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

IL: Interleucina

mL: Mililitros

MHC-II: Complexo principal de histocompatibilidade de classe II

Mincle: *The macrophage-inducible C-type lectin*

MR: Receptor de manose

mRNA: RNA mensageiro

MyD88: *Myeloid differentiation primary response 88*

NF-κB: *Nuclear factor κB*

ng: Nanogramas

NLR: Receptor do tipo NOD

NO: Óxido nítrico

NO₂·: Nitrito

PAMP: Padrão molecular associado ao patógeno

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

pg: Picogramas

PMA: *Phorbol myristate acetate*

PRM: Molécula de reconhecimento padrão

PRR: Receptor de reconhecimento padrão

RLR: Receptor do tipo *RIG*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

rpm: Rotações por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institut*

SFB: Soro fetal bovino

STAT3: *Signal transducers and activators of transcription*

TGF-β: *Transforming growth factor beta*

TIRAP: *TIR Domain containing adaptor protein*

TLR: Receptor do tipo *Toll*

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa

TRAM: *TRIF*- related adaptor molecule

T reg cell: Célula T regulatória

TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reconhecimento de estruturas fúngicas pelos PRRs e vias de sinalização.....	8
Figura 2: Avaliação da atividade fungicida dos monócitos.	22
Figura 3: Avaliação fenotípica dos monócitos.	23
Figura 4: Avaliação da fagocitose dos conídios de <i>T. rubrum</i> pelos monócitos por citometria de fluxo.	24
Figura 5: Avaliação da fagocitose dos conídios de <i>T. rubrum</i> pelos monócitos por microscopia confocal.	25
Figura 6: Monócitos com o receptor TLR2 bloqueado exibem redução na fagocitose.	26
Figura 7: Índice de fagocitose dos monócitos após o bloqueio do receptor TLR2.....	27
Figura 8: Unidades Formadoras de Colônia dos conídios de <i>T. rubrum</i> após bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos..	27
Figura 9: Concentração de NO após o bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos na presença de <i>T. rubrum</i>	28
Figura 10: Quantificação da citocina TNF- α após bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos na presença de <i>T. rubrum</i>	29
Figura 11: Quantificação da citocina IL-1 β após bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos na presença de <i>T. rubrum</i>	30
Figura 12: Quantificação da citocina IL-6 após bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos na presença de <i>T. rubrum</i>	30
Figura 13: Quantificação da citocina IL-10 após bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos na presença de <i>T. rubrum</i>	31
Figura 14: Monócitos com o receptor de manose blqueado exibem redução na fagocitose.	32
Figura 15: Índice de fagocitose dos monócitos após o bloqueio dos receptores Manose, Mincle e Dectina-1.....	33
Figura 16: Unidades Formadoras de Colônia dos conídios de <i>T. rubrum</i> após bloqueio dos receptores Manose, Mincle e Dectina-1 nos monócitos.	34

Figura 17: Quantificação da citocina TNF- α após bloqueio dos receptores Manose, Mincle e Dectina-1 nos monócitos na presença de <i>T. rubrum</i>	36
Figura 18: Quantificação da citocina IL-1 β após bloqueio dos receptores Manose, Mincle e Dectina-1 nos monócitos na presença de <i>T. rubrum</i>	37
Figura 19: Quantificação da citocina IL-10 após bloqueio dos receptores Manose, Mincle e Dectina-1 nos monócitos na presença de <i>T. rubrum</i>	38

RESUMO

Celestrino GA. *Reconhecimento do Trichophyton rubrum pelos monócitos humanos: papel dos receptores de lectina do tipo C e do tipo toll* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A dermatofitose é uma infecção fúngica superficial, caracterizada pelo comprometimento dos tecidos queratinizados, como pele, pelos e unha, mas que, em alguns casos, também pode se tornar uma infecção profunda. O principal agente etiológico é o *Trichophyton rubrum*, sendo responsável por aproximadamente 80% dos casos. O papel dos fagócitos e dos receptores de reconhecimento de padrões nas infecções fúngicas já foi discutido em vários trabalhos; no entanto, poucos estudos abordam o papel dos monócitos e dos PRRs durante a fase inicial da dermatofitose. Neste trabalho, foi avaliada a participação dos receptores de lectina do tipo C e do tipo *Toll* expressos em monócitos humanos no reconhecimento de conídios do *T. rubrum*. Os resultados mostraram que a fagocitose dos conídios de *T. rubrum* pelos monócitos está associada ao TLR2 e ao receptor de manose, mas não foi alterada pelo bloqueio dos receptores mincle e dectina-1 com seus respectivos anticorpos monoclonais. A atividade fungicida dos monócitos foi prejudicada na ausência dos receptores TLR2 e receptor de manose. A secreção de TNF- α pelos monócitos na presença dos conídios de *T. rubrum* foi reduzida pelo bloqueio dos receptores TLR2, manose, mincle e dectina-1, no entanto, a secreção de IL1- β foi prejudicada apenas pelo bloqueio do TLR2 e receptor de manose. A secreção de citocina IL-10 não foi alterada na ausência de nenhum dos receptores avaliados. Foi demonstrado que o TLR2 e o receptor de manose expressos nos monócitos humanos tem papel significativo no reconhecimento dos conídios de *T. rubrum* e na produção de citocinas inflamatórias.

Descritores: Receptores toll-like; Lectinas tipo C; Dermatofitose; Imunidade inata; Monócitos; *Trichophyton rubrum*; Dermatofitos.

ABSTRACT

Celestrino GA. *Human monocytes recognition of Trichophyton rubrum*: role of toll like and C-type lectin receptors [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Dermatophytosis is a superficial fungal infection, characterized by the involvement of keratinized tissues, such as skin, hair and nails, but in some cases, can also become a deep infection. The main etiological agent is *Trichophyton rubrum*, accounting for approximately 80% of the cases. The role of phagocytes and pattern recognition receptors in fungal infections has been discussed in several studies; however, few studies address the role of monocytes and PRRs during the early stage of dermatophytosis. In this work, we analyzed the role of C-type lectin receptors and Toll like receptors expressed in human monocytes in the recognition of *T. rubrum* conidia. The results showed that phagocytosis of *T. rubrum* conidia by monocytes is associated with TLR2 or mannose receptor, but it was not altered by the blockade of mincle or dectin-1 receptors with their respective monoclonal antibodies. The fungicidal activity of monocytes was impaired in the absence of TLR2 or mannose receptor. Secretion of TNF- α by monocytes in the presence of *T. rubrum* conidia was reduced by the blockade of the receptors mincle, dectin-1, TLR2 or mannose. On the other hand, the IL1- β secretion was impaired only by the blockade of TLR2 and mannose receptor. Secretion of IL-10 was not altered in the absence of signaling from any of these receptors. Was demonstrated that TLR2 and mannose receptor expressed in human monocytes have a significant role in the recognition of *T. rubrum* conidia and in the production of inflammatory cytokines.

Descriptors: Toll-like receptors; Lectins, C-type; Dermatophytosis, Immunity, innate; Monocytes; *Trichophyton rubrum*, Dermatophytes.

1. INTRODUÇÃO

A dermatofitose (também conhecida como *Tinea*) é uma infecção fúngica superficial, caracterizada pelo comprometimento dos tecidos queratinizados, como pele, pelos e unha, mas que, em alguns casos, também pode se tornar uma infecção profunda. É causada por dermatófitos; fungos filamentosos que utilizam a queratina desses tecidos como fonte de nutrientes (1, 2).

Existem aproximadamente 40 espécies de dermatófitos; essas espécies são divididas em três gêneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* (3). Eles também são agrupados de acordo com suas fontes de infecção: geofílicos (encontrados no solo e raramente em infecções humanas), zoofílicos (infectam animais e ocasionalmente podem ser transmitidos para humanos) e antropofílicos (infectam humanos, sendo responsáveis por cerca de 70% das dermatofitoses humanas). Espécies geofílicas e zoofílicas geralmente causam inflamação aguda, enquanto as antropofílicas causam infecções crônicas e de evolução lenta, uma vez que são espécies mais adaptadas aos hospedeiros humanos (4). O principal agente etiológico antropofílico é o *Trichophyton rubrum*, responsável por aproximadamente 80% dos casos (5). É um fungo filamentoso, constituído por hifas hialinas septadas e esporos em forma de lágrima chamados conídios (3, 6, 7).

A prevalência global das dermatofitoses é de aproximadamente 20%, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, e aproximadamente 10% da população sofre de onicomicose (6). Os dermatófitos crescem em temperaturas de 25-28°C e a infecção da pele humana é sustentada por condições quentes e úmidas. Por essas razões, as infecções fúngicas superficiais são relativamente comuns em países tropicais (3).

A infecção pelos dermatófitos pode ocorrer a partir do contato direto com indivíduos, animais ou solo contaminado, ou por exposição a fômites contaminados (8, 9). No entanto, a prevalência da infecção é variável e pode depender de vários parâmetros, como condições climáticas, umidade, temperatura, pH adequado, idade do indivíduo e sua propensão a doenças, dano

na epiderme, localização mecânica das lesões, e também a espécie e grupo ecológico do dermatófito (3, 10).

O desenvolvimento da dermatofitose depende da capacidade do fungo em superar as barreiras naturais do hospedeiro, como o pH e a descamação da pele, presença de moléculas inibidoras como ácidos graxos e peptídeos antimicrobianos, e a ação das células fagocíticas como as células de *Langerhans* (11-14). Zurita *et al.* (1987) demonstraram que a aderência de conídios ao estrato córneo acontece dentro de 3 a 4 horas após a infecção, e que esses conídios germinam por até 24 horas (15). As hifas colonizam e se espalham pela pele durante os próximos 3 dias após a infecção (16).

Uma vez aderido ao tecido queratinizado, o fungo libera enzimas, como queratinases, lipases, elastases, gelatinases, fosfatases e/ou DNAses, que rompem as ligações desse tecido; digerem queratina e outras proteínas, lipídios e DNA, induzindo vários graus de inflamação (8, 17). Durante o crescimento, a queratina é a única fonte de carbono para os dermatófitos, e sua degradação tem como resultado a alteração do pH da pele do hospedeiro de ácido para alcalino, sendo favorável para a maioria das proteases secretadas pelos dermatófitos e essencial para sua sobrevivência (18).

Após a instalação da infecção dermatofítica, os sintomas podem variar de acordo com o local da infecção, a resposta imune do hospedeiro e a espécie do fungo infectante (19). A apresentação clínica mais comum é o aparecimento de lesões superficiais escamosas com a borda elevada, confinadas ao estrato córneo. As lesões podem afetar o tronco (*Tinea corporis*), os pés (*Tinea pedis*, também conhecida como pé de atleta), as mãos (*Tinea manus*), a região da virilha (*Tinea cruris*) e o couro cabeludo (*Tinea capitis*). As unhas também são frequentemente infectadas por dermatófitos, causando onicomicose (3, 17). Normalmente, a onicomicose é rara em crianças, uma vez que a unha de crianças e adolescentes saudáveis crescem rapidamente. Os dermatófitos, por sua vez, crescem lentamente, logo, são rapidamente eliminados da placa ungueal durante os cortes de rotina das unhas (18).

Ocasionalmente, podem ocorrer lesões invasivas e disseminadas, quando o fungo invade a derme e a hipoderme e se dissemina para outros tecidos profundos, como linfonodos, cérebro, ossos ou trato digestivo (2, 20, 21).

A disseminação é uma condição rara e potencialmente fatal, sugestiva de imunodeficiência, e tem sido relatada em pacientes com deficiência na proteína CARD9; uma molécula adaptadora com papel importante na via molecular do reconhecimento fúngico (20, 22).

A técnica clássica no diagnóstico da dermatofitose consiste na análise do material queratinizado (pelo, unha ou raspado de pele) em microscopia óptica, utilizando entre 15 a 20% de hidróxido de potássio (KOH). Sob microscopia, são observadas hifas hialinas e septadas. Não há necessidade de se conhecer a espécie envolvida na infecção, uma vez que os medicamentos utilizados são eficazes para todas elas (9).

O padrão da infecção por dermatófitos é amplo e abrange desde indivíduos com confirmação micológica mas sem sintomas, até indivíduos com sintomas que podem ser inflamatórios agudos, não inflamatórios, ou crônicos e resistentes ao tratamento (23). O tratamento farmacológico na dermatofitose consiste no uso de antifúngicos tópicos e/ou orais. Os antifúngicos mais utilizados são os imidazóis (clotrimazol, miconazol, cetoconazol), as alilaminas (terbinafina) e os triazóis (itraconazol e fluconazol) (9). Alguns pacientes são refratários ao tratamento farmacológico disponível, não obtendo a cura facilmente. Deficiência em alguma via da resposta imune (inata ou adaptativa), os fatores de virulência do fungo, assim como falha do paciente em cumprir o tratamento prescrito, têm sido propostos como possíveis causas da falha de tratamento e da cronicidade das infecções pelo *T. rubrum* (24-26).

1.1 Resposta imune nas infecções fúngicas

O sistema imunológico inato detecta a presença de micro-organismos e inicia mecanismos para eliminar as possíveis ameaças infecciosas. Descrita pela primeira vez por Charles Janeway Jr., em 1989, a detecção microbiana é obtida através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) codificados por linha germinativa, que buscam, nos espaços extracelular e intracelular, determinantes microbianos que servem como indicadores de infecção (27). Cada PRR tem ampla especificidade e pode se ligar à grande número de moléculas que possuem padrão estrutural comum, normalmente chamadas de padrões

moleculares associados ao patógeno (PAMPs), embora estejam presentes em micro-organismos patogênicos e não patogênicos (28, 29).

Em sua maioria, os PRRs podem ser classificados com base na homologia do domínio de proteína, podendo ser separados em receptores ligados à membrana, receptores intracelulares e receptores solúveis (28). Os receptores do tipo Toll (TLRs) e os de lectina do tipo C (CLRs), encontrados na superfície celular ou nos compartimentos endocíticos, reconhecem ligantes microbianos no espaço extracelular e nos endossomos. Já os receptores do tipo NOD (NLRs) e os do tipo RIG-I (RLRs), localizados no citoplasma, reconhecem ligantes no espaço intracelular (27) (28). Os receptores solúveis, como pentraxinas, colectinas, ficolinas, e o receptor do complemento CR3, são proteínas que podem reconhecer uma variedade de agentes patogênicos e eliminá-los por ativação do complemento, opsonização, neutralização e regulação da inflamação (30-32).

Os TLRs são a família de PRRs melhor caracterizada, sendo expressos em células dendríticas, fagócitos, queratinócitos, linfócitos B, células endoteliais, dentre outros tipos celulares (33). São receptores transmembrana do tipo I, que possuem domínios extracelulares de ligação ricos em leucina, responsáveis pelo reconhecimento, e possuem domínio citoplasmático com alta similaridade à família de receptores IL-1, denominado Toll/IL-1R (TIR), que é responsável por induzir as cascatas de sinalização intracelular (28, 33, 34).

O reconhecimento de diversos PAMPs pelos TLRs já foi identificado, incluindo o reconhecimento de peptidoglicano, lipoproteínas bacterianas e zimosan pelo TLR2, RNA dupla fita pelo TLR3, LPS e proteínas do choque térmico pelo TLR4, flagelina pelo TLR5, RNA de fita simples pelo TLR7/TLR8 e DNA bacteriano não metilado pelo TLR9 (33). As vias de sinalização dos TLRs recrutam diferentes combinações de moléculas adaptadoras que contêm o domínio TIR: MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM (35). Essas vias de sinalização ativam NF- κ B e a proteína ativadora-1 (AP-1), que é comum a todos os TLRs, levando à produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias (35, 36).

Há vários trabalhos relatando o papel dos TLRs nas infecções fúngicas, com ênfase nos receptores TLR2 e TLR4 (33). Estudos na literatura com modelos experimentais mostram que a ausência de TLR4 em macrófagos de

camundongos infectados com *Sporothrix brasiliensis* diminui a fagocitose, a secreção de citocinas inflamatórias e de óxido nítrico, levando à persistência da infecção (37, 38). Outro estudo evidenciou que TLR2 e MyD88 contribuem na defesa contra *Cryptococcus neoformans*, com aumento da expressão das citocinas TNF- α , IL-12 e IFN- γ , e que camundongos deficientes de TLR2 apresentam maior suscetibilidade a infecções por *C. neoformans* (39). Villamón *et al.* (2004) e Tessarolli *et al.* (2010) demonstraram, em modelo murino, que a ausência de TLR2 leva à suscetibilidade à infecção experimental por *Candida albicans*. Essa suscetibilidade à candidíase foi associada à falha na síntese de TNF- α e MIP-2, à diminuição da síntese de óxido nítrico e ao comprometimento da atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos (40, 41). No entanto, Bellocchio *et al.* (2004) e Netea *et al.* (2004) observaram que camundongos nocautes para TLR2 são tão suscetíveis a candidíase quanto o grupo controle e que a baixa diminuição das citocinas TNF- α e IL-1 não gerou consequências funcionais para esses camundongos nocautes. (42, 43).

No modelo humano, a deficiência de MyD88 leva à alta suscetibilidade a infecções bacterianas, mas não fúngicas (44). Zhang *et al.* (2015) relataram que pacientes com meningite criptocócica apresentam redução na expressão de TLR2 e MyD88 nas células mononucleares do sangue periférico, prejudicando a produção de citocinas pró-inflamatórias e a resposta protetora (45). Van der Graaf *et al.* (2006) demonstraram que polimorfismos no TLR4 estão associados à maior suscetibilidade à candidíase sistêmica (46, 47), enquanto polimorfismos em TLR6, TLR6 e TLR9 foram associados a desenvolvimento de aspergilose broncopulmonar alérgica e invasiva em pacientes transplantados (48, 49).

Outro grupo de PRRs essenciais na imunidade antifúngica são os CLRs (50). Os CLRs fazem parte de uma família de proteínas solúveis e de transmembrana e possuem um domínio de lectina do tipo C, que consiste em uma estrutura de dupla alça conservada e uma alça longa, estrutural e evolutivamente flexível que está envolvida na ligação de carboidratos dependente de Ca₂⁺. Esses receptores são comumente expressos em células mieloides do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, mas também nas células epiteliais da mucosa (48, 51, 52).

Com base na sua estrutura e na sua filogenia, os CLRs foram divididos em 17 subgrupos; dentre estes destacam-se, Dectina-1, Mincle e o receptor de Manose (MR) (27, 53). A Dectina-1 reconhece especificamente β -1,3-glucana, os carboidratos encontrados na parede celular de fungos, plantas e algumas bactérias, enquanto o receptor Mincle reconhece a α -manana presente em fungos como *Candida*, *Saccharomyces* e *Malassezia*, além de também reconhecer células necróticas e micobactérias (54-57). Já o MR pode se ligar a manose, fucose ou N-acetilglicosamina, possibilitando o reconhecimento de fungos, como *C. albicans*, *C. neoformans* e *Pneumocystis jirovecii*, vírus, como HIV e dengue, e bactérias, como *Klebsiella* e *Streptococcus* (57, 58).

As respostas mediadas por esses receptores incluem fagocitose, indução da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além da modulação da imunidade adaptativa, particularmente respostas via Th1 e Th17 (50, 59). Essas ações dependem da ativação de vias de sinalização envolvendo Syk quinase, CARD9 e NF-kB (59).

Nas últimas décadas, vários trabalhos foram publicados relatando o papel dos CLRs nas infecções fúngicas em humanos e em modelos experimentais. Saijo *et al.* (2007) observaram que camundongos deficientes do receptor Dectina-1 mostraram maior suscetibilidade à infecção por *P. jirovecii*, mesmo com produção normal de citocinas, mas essa suscetibilidade não acontece em resposta a *C. albicans* (60). Chen *et al.* (2019) demonstraram, em modelo murino, que macrófagos e neutrófilos com ausência de Dectina-1 são suscetíveis a infecções por *C. krusei* (61).

Em outro estudo, Wells *et al.* (2008) demonstraram que após exposição a *C. albicans*, a produção de TNF- α foi reduzida em macrófagos de camundongos com ausência de Mincle, levando a aumento da suscetibilidade à candidíase sistêmica (56). Essa resposta defeituosa também foi observada por Yamasaki *et al.* (2008), em modelo experimental, em que a ausência desse receptor prejudicou a resposta inflamatória contra espécies de *Malassezia* (55, 56).

Os camundongos deficientes de MR não apresentaram suscetibilidade a infecções por *C. albicans* ou *P. jirovecii*, no entanto, foram suscetíveis à infecção por *C. neoformans*, que resultou da indução defeituosa da resposta de linfócitos TCD4⁺ (62).

Em humanos, foi observado que polimorfismos do receptor Dectina-1 (Y238X) foram associados à maior suscetibilidade à candidíase mucocutânea e a risco aumentado de aspergilose invasiva após cirurgia de transplante (63-65). Van de Veerdonk *et al.* (2009) demonstraram que a produção de IL-17, a partir de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) estimuladas com *C. albicans*, é dependente do MR e que essa resposta pode ser aumentada pela sinalização de TLR2 e Dectina-1, evidenciando colaboração entre os PRRs na resposta imune (46, 66).

A detecção dos PAMPs pelos PRRs é capaz de induzir respostas inflamatórias e essa detecção, quando feita por APCs, em especial, as células dendríticas, leva à modulação e à ativação da resposta imune adaptativa (67). As células dendríticas estão presentes em locais de exposição ao antígeno, como epitélio e mucosa, e são responsáveis por reconhecer o antígeno, processá-lo e apresentar seus peptídeos via MHC-II para linfócitos TCD4⁺ *naive* (68, 69). Esses linfócitos se diferenciam em subgrupos com funções efetoras específicas contra infecções por patógenos distintos. A diferenciação nesses subgrupos de células depende das citocinas presentes durante sua ativação (67).

Figura 1 - Reconhecimento de estruturas fúngicas pelos PRRs e vias de sinalização. Chai *et al.* 2009 (70)

O eixo Th2 tem perfil de respostas não protetoras para a grande maioria das infecções fúngicas, sendo que as citocinas IL-4 e IL-13, quando secretadas, levam à ativação alternativa dos macrófagos, que, por sua vez, não produzem a quantidade de óxido nítrico necessária para a atividade fungicida. Há, então, a persistência da infecção, com respostas alérgicas com altos níveis de IgE, IgA e IgG e recidiva da doença (71, 72). Na criptococose, a ativação indesejada da resposta Th2 leva à inflamação alérgica não protetora em camundongos (73). No entanto, foi observado que macrófagos alternativamente ativados têm função protetora na infecção por *Pneumocystis murina* (74). Pacientes com dermatofitose crônica apresentam reações de hipersensibilidade imediata, com produção de IL-4 pelas células T CD4⁺, que induz a troca de isótipos de anticorpos para IgG4 e IgE (75, 76).

Já, uma resposta predominante das células Th1 está relacionada com imunidade protetora contra as infecções fúngicas, como histoplasmose, paracoccidioidomicose e candidíase (71, 77). Após exposição, as APCs produzem IL-12 – citocina importante para diferenciação do eixo Th1 (77). As células Th1, por sua vez, liberam citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e GM-CSF(71, 77). A citocina IFN- γ induz a ativação clássica de macrófagos, com papel crítico em deter o crescimento de fungos intracelulares, como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Coccidioides immitis* (77-79). Essa ativação clássica leva à liberação de óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio, bem como ao aumento da fagocitose, e a falha em fornecer esses sinais de ativação pode predispor a infecções(48). Camundongos deficientes de IFN- γ apresentam maior suscetibilidade à histoplasmose, assim como a ausência de GM-CSF reduziu a imunidade protetora contra *H. Capsulatum* (80, 81). Pacientes com deficiências de IL-12R β 1 são suscetíveis à candidíase mucocutânea recorrente ou persistente, assim como em paracoccidioidomicose profunda (67, 71, 77, 82).

O eixo Th17, assim como o eixo Th1, tem papel protetor na resposta imune antifúngica (72). Essas células T têm como característica a expressão das citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22. As citocinas TGF- β e IL-6 são responsáveis pela diferenciação inicial para o eixo Th17, enquanto a citocina IL-23 é responsável pela manutenção e pela expansão dessas células (77). Em termos de funções efetoras, as células Th17 promovem o recrutamento e a ativação de neutrófilos, a liberação de peptídeos antimicrobianos, como β -defensinas, e a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (72); essas células já foram implicadas no direcionamento de respostas imunes protetoras contra vários patógenos, incluindo fungos como *C. albicans*, *C. neoformans* e *P. Carinii* (83-85).

1.2 Resposta imune da dermatofitose

A infecção por dermatófitos é caracteristicamente limitada ao tecido queratinizado do estrato córneo, resultando em uma reação inflamatória leve ou intensa, enquanto os mecanismos de defesa do hospedeiro, inata e adaptativa, respondem para eventualmente eliminar o fungo e impedir a invasão para os tecidos mais profundos (3, 10).

A pele representa a primeira linha de defesa contra os dermatófitos, e além de funcionar como barreira física, também possui a ação dos queratinócitos (principais células que constituem a epiderme) e das células de *Langerhans* (as células dendríticas da epiderme) (69, 86). A proliferação aumentada de queratinócitos da pele em resposta à inflamação pode ser o mecanismo final, que remove o fungo da pele por descamação epidérmica (10). Berk *et al.* (1976) relataram que os dermatófitos podem ser removidos da pele pela renovação epidérmica acelerada (87). Os queratinócitos reconhecem antígenos microbianos e induzem a produção de citocinas responsáveis pela ativação da resposta imune inata, como a secreção da citocina IL-8, importante para o recrutamento de neutrófilos para o sítio infeccioso, e da citocina pró-inflamatória TNF- α (68, 69, 86, 88). Os queratinócitos também secretam peptídeos antimicrobianos, como as catelicidinas e as defensinas que possuem funções fungicidas (69, 89). Jensen *et al.* (2007) e López *et al.* (2006) demonstraram que a β -defensina e a catelicidina LL-37 humanas são fungistáticas e fungicidas *in vitro* contra o *T. rubrum* e também demonstraram que sua expressão está aumentada nas infecções causadas por esse fungo (90, 91).

Os antígenos dermatofíticos podem ser divididos em glicopeptídeos (como as mananas), e proteases secretadas (como queratinases, lipases, elastases e fosfatases). A porção proteica dos glicopeptídeos estimula preferencialmente a imunidade mediada por células, enquanto a porção polissacarídica estimula preferencialmente a imunidade humoral. As proteases permitem a aderência do fungo na epiderme, e a degradação da queratina e outras macromoléculas (92-94).

A manana, uma glicoproteína componente da parede celular fúngica, pode suprimir a resposta inflamatória, especialmente em pessoas atópicas ou suscetíveis (10, 95). Estudos anteriores demonstraram que a incubação de manana purificada de *T. rubrum* (TRM) com células mononucleares do sangue periférico suprimiu a formação de linfoblastos e inibiu a linfoproliferação em resposta a uma variedade de estímulos antigênicos e demonstraram, também, que a TRM inibe a proliferação de queratinócitos, postergando a renovação epidérmica e permitindo a infecção crônica mais persistente (10, 95, 96).

Uma característica do *T. rubrum* é que ele tem a capacidade de induzir reações de hipersensibilidade dos tipos imediata e tardia, sendo a resposta imediata mediada por IgE associada com infecções crônicas ou recorrentes, enquanto a tardia é caracterizada pela ação de macrófagos e neutrófilos, que geram uma resposta protetora (10, 69).

Os receptores da imunidade inata (como os CLRs e TLRs) reconhecem os dermatófitos, induzindo cascatas de sinalização intracelular, que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo recrutamento dos fagócitos, como macrófagos e neutrófilos, para o local da infecção (10, 95).

Pacientes com dermatofitose localizada ou disseminada apresentam diminuição na expressão de TLR4 nos queratinócitos, o que provavelmente contribui para a não resolução da infecção, uma vez que TLR4 induz produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de neutrófilos (19). Garcia-Madrid *et al.* (2011) e Brasch *et al.* (2014) observaram que, após estimulação com conídios de *T. rubrum*, queratinócitos primários humanos aumentaram a expressão de TLR2, TLR4 e TLR6 e a produção de HBD-1 e HBD-2 (97, 98). No entanto, em queratinócitos da linhagem HaCat, foi observada diminuição da expressão de TLR2 após 24 horas em contato com conídios de *T. rubrum* (99).

A importância dos fagócitos na imunidade contra dermatofitose foi reconhecida há mais de 30 anos (100). Estudos anteriores mostraram que os fagócitos estavam aumentados nas áreas das lesões tanto na epiderme como na derme, e que neutrófilos foram observados em amostras do extrato córneo coletados de pacientes, embora esses achados não seja exclusivo da dermatofitose (101, 102).

Sousa *et al.* (2015) consolidaram a importância dos fagócitos na dermatofitose, ao correlacionarem o defeito dessas células com a infecção crônica da doença. Neutrófilos e macrófagos de pacientes com dermatofitose crônica disseminada por *T. rubrum* apresentaram menor capacidade fagocítica, redução na produção de ROS e diminuição na secreção de citocinas inflamatórias (103).

Em modelo murino, foi observado que macrófagos residentes (peritoneais) de camundongos foram capazes de fagocitar conídios de *T. rubrum* e secretar TNF- α , mas não foram capazes de eliminar o patógeno, indicando que

as células fúngicas são capazes de inibir as funções dos macrófagos ou induzir citocinas supressoras que poderiam favorecer a evasão fúngica das respostas do hospedeiro (6). Um outro estudo do mesmo grupo demonstrou que camundongos com deficiência dos receptores Dectina-1 e Dectina-2 apresentaram falha na produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta à dermatofitose por *T. rubrum*, prejudicando sua resolução. Já a ausência de linfócitos T e B e da citocina IL-17 não prejudicaram a eliminação do fungo em camundongos nocautes para essas células e citocina, o que sugere que a dermatofitose não é necessariamente associada com deficiência e/ou alterações na imunidade adaptativa (7).

Santiago *et al.* (2014) demonstraram que as células dendríticas e os macrófagos de pacientes com dermatofitose ou indivíduos normais interagem com o *T. rubrum* e que, diferentemente dos macrófagos, as células dendríticas inibiram o crescimento do fungo e induziram ativação de linfócitos T, sugerindo que as células dendríticas possam desempenhar papel importante na resposta do hospedeiro à dermatofitose (104). Um recente trabalho do nosso grupo mostrou que pacientes com dermatofitose apresentam menor densidade de células de *Langerhans* na epiderme, o que resultaria em uma apresentação defeituosa de antígeno, apontando assim para um possível fator de cronicidade ou recorrência da infecção (105).

A importância da resposta adaptativa é corroborada pelo fato de que pacientes com AIDS podem apresentar maior suscetibilidade a infecções fúngicas, incluindo dermatofitoses (106, 107). No entanto, mesmo em pacientes imunodeprimidos, infecções disseminadas por dermatófitos são raras, ainda que com relatos do envolvimento de linfonodos, baço, ossos, cérebro ou fígado (108).

Um estudo realizado por Waldman *et al.* (2009) retratou que linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de pacientes saudáveis podem apresentar atividade citotóxica contra dermatófitos *in vitro*; no entanto, sua principal contribuição no controle da infecção pode depender da sua capacidade de ativar fagócitos por meio da produção de citocinas. Já, os pacientes com dermatofitose crônica, apresentaram comprometimento seletivo na função linfocitária, incluindo baixo efeito citotóxico das células T, supressão da proliferação celular e regulação negativa da expressão de MHC de classe II e ICAM-1 (109).

Kaya *et al.* (2009) sugeriram que o aumento do número de linfócitos TCD4⁺ CD25⁺ (T reg) podem acarretar uma falha na eliminação dos dermatófitos da pele, impedindo a resposta protetora e promovendo a colonização fúngica crônica no pé, levando à onicomicose. Pode-se especular nesse caso, que a manana ou outra molécula do fungo induza a formação dessas células ao invés de células T efetoras nesses pacientes (110).

Baltazar *et al.* (2013) mostraram, a importância da IFN- γ e IL-12 na resolução da infecção, uma vez que macrófagos de camundongos deficientes dessas citocinas não foram capazes de impedir a proliferação de *T. rubrum* devido à redução na fagocitose e na produção de ROS, com aumento da carga fúngica (111).

A maioria dos estudos da resposta imune adaptativa na dermatofitose é focada apenas no eixo Th1, sendo o eixo Th17 apresentado em número limitado de estudos (112-114). Recentemente, Heinen *et al.* (2018) demonstraram que, após infecção com *T. benhamiae*, camundongos apresentaram aumento significativo dos níveis de expressão de mRNA de IL-17A, IL-22 e IFN- γ , polarizando para ambos os eixos Th1 e Th17, e demonstraram que a ausência dessas citocinas de forma individual não foi necessária para a eliminação completa do patógeno; no entanto, verificaram que o *clearance* fúngico foi menos eficaz na deficiência de IL-17A, enquanto os sinais clínicos foram intensificados na deficiência de IFN- γ (115).

Nos últimos anos, foi relatado que mutações no CARD9 predispoem pacientes a infecções fúngicas graves e invasivas, como dermatofitose profunda, candidíase mucocutânea crônica e infecção extrapulmonar por *Aspergillus fumigatus* (20, 22, 116-120). Fagócitos e células epiteliais reconhecem o fungo através dos PRRs (em especial, dectina-1, dectina-2 e mincle), levando à ativação do CARD9, que, subsequentemente, medeia a indução de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-23, ativando linfócitos TCD4⁺, resultando em sua diferenciação em células T produtoras de IL-17 (20, 116, 119). Em pacientes com dermatofitose profunda, já foi demonstrado que o número de células Th-17 e Th-22 estão reduzidos, assim como redução de IL-17 e IL-22, tendo, como consequência, respostas imunes inatas e adaptativas comprometidas (21, 118).

Alguns estudos mostram que anticorpos contra dermatófitos são detectados em humanos e animais infectados, mas acredita-se que a imunidade humoral por si só não seja protetora, enquanto a imunidade mediada por células é valiosa para o controle e a proteção contra reinfecção (121-123).

2. JUSTIFICATIVA

Consideradas como infecções fúngicas superficiais limitadas às camadas de queratina da epiderme, as infecções por dermatófitos em pacientes com deficiências na imunidade celular podem evoluir para infecções profundas e disseminadas, evidenciando essa resposta imune como essencial para os mecanismos de defesa contra fungos dermatofíticos.

Tendo em vista o crescente número de pacientes submetidos à imunossupressão relacionada aos avanços da medicina invasiva (transplantes, quimioterapia) e à melhor abordagem profilática das infecções por patógenos oportunistas convencionais (como bactérias, *Candida spp*), é de se prever o aumento da frequência de infecções por novos patógenos, como dermatófitos. A dermatofitose é uma infecção fúngica crônica, geralmente benigna, mas de difícil tratamento. O *T. rubrum* é o principal agente etiológico, sendo capaz de suprimir e evadir-se da resposta imune celular do hospedeiro.

Sabe-se que os receptores da imunidade inata, como os CLRs e os TLRs, presentes nas células mieloides, como monócitos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, reconhecem estruturas da parede celular de fungos e que esse reconhecimento resulta na ativação de cascatas de vias intracelulares que pode resultar no controle ou na progressão da doença. No entanto, poucos estudos abordam o papel dos monócitos e desses receptores durante a fase inicial da dermatofitose. Como consequência, nossa proposta foi avaliar a participação desses receptores da imunidade inata expressos em monócitos humanos no reconhecimento de conídios do *T. rubrum*.

Nossa hipótese é de que esse fungo seja reconhecido através das estruturas de manana presente em sua parede celular, e que esse reconhecimento aconteça não só por um receptor, mas através de uma colaboração entre dois ou mais deles.

3. OBJETIVO

Avaliar o papel dos receptores de lectina do tipo C (dectina-1, mincle e manose) e do tipo *Toll* (TLR2) expressos em monócitos de indivíduos saudáveis envolvidos no reconhecimento *in vitro* dos conídios de *T. rubrum*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fungo

Foi utilizada a cepa do fungo *Trichophyton rubrum* (IMT-20) com 15 dias de crescimento em meio ágar batata (BD Biosciences), a 25°C.

4.2 Preparação de conídios

Após o crescimento do fungo, foram adicionados, às colônias, 10 mL de solução salina 0,9%, que foram, então, raspadas delicadamente com pipeta *pasteur*. Em seguida, a solução foi centrifugada a 2.000 rpm, por 10 minutos, sendo filtrada com *cell strainer* (Falcon, Glendale, AZ, USA) de 40 µm para retirada de hifas e qualquer resíduo de ágar batata. Os conídios foram contados em câmara de *Neubauer* (Inlab - Brasil), ajustando o número de acordo com cada experimento, segundo o protocolo de Sousa *et al.* (103).

4.3 Grupo avaliado

Os experimentos foram realizados com indivíduos saudáveis para a caracterização dos receptores de lectina do tipo C e do tipo *Toll* após o reconhecimento do *T. rubrum*. Critérios para exclusão do grupo avaliado: possuir lesões ativas causadas por dermatófitos; ser menor de 18 ou maior de 70 anos; estar grávida; possuir alguma imunodeficiência; fazer uso de drogas imunossupressoras; ser diabético ou ser HIV positivo. Foram coletados 70 mL de sangue periférico de cada indivíduo, utilizando tubos com heparina (*Vacurette*). Este trabalho foi aprovado pelo Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP – CAPPesq (CAAE 91420018.3.0000.0068).

4.4 Separação dos monócitos

Os monócitos do sangue periférico foram isolados por gradiente de densidade utilizando *Histopaque®-1077* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), segundo o protocolo de Repnik *et al* (124). Resumidamente, o sangue foi diluído em solução salina 0,9% (diluição 1:1), adicionado sob 15 mL de *Histopaque* e centrifugado a 2.200 rpm, por 20 minutos. Após centrifugação, a camada de

células mononucleares foi lavada três vezes com PBS, ressuspensa em R10 (RPMI (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) + 10% SFB (Soro Fetal Bovino) (*Gibco/Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA)) e contadas em câmara de *Neubauer* (Inlab - Brasil). As células foram plaqueadas em placa de 24 poços sobre lamínulas de vidro, com 5×10^6 /mL de células por poço, por 1:30h, em estufa de CO₂ para aderência. Após o período de incubação, os poços foram lavados com solução salina para retirada das células não aderentes. Em seguida, foram realizados a imunofenotipagem e os ensaios para avaliar a participação dos receptores mincle, manose, dectina-1 e TLR-2 no reconhecimento dos conídios de *T. rubrum*.

4.5 Participação dos receptores de lectina do tipo C (CLR) e do tipo Toll (TLR) no reconhecimento do *T. rubrum*

Os monócitos foram plaqueados sobre lamínulas de vidro em placa de 24 poços. Os receptores mincle, manose, dectina-1 e TLR-2 foram bloqueados separadamente, utilizando os seus respectivos anticorpos monoclonais (anti-hMincle (10µg/mL), MAb-hMR (5µg/mL), anti-hDectin-1 (10µg/mL) e anti-hTLR2 (10µg/mL) respectivamente, (todos da *InVivoGen*, San Diego, CA, USA) durante 50 minutos no gelo. Em seguida, foram adicionados os conídios de *T. rubrum* às culturas de monócitos (proporção 1:5) e incubados em estufa de CO₂, a 37°C, para ensaio de fagocitose, dosagem de óxido nítrico (NO) e quantificação de citocinas.

4.6 Citometria de fluxo para identificação fenotípica e ensaio de fagocitose

Os monócitos, depois de isolados, numa concentração de 2×10^5 /mL, foram transferidos para tubos de citometria, centrifugados e lavados com PBS + 2% de BSA (Albumina de Soro Bovino) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA). Após a lavagem, foi adicionado 0,1 µL do fluorocromo *PE-Texas Red – Live/DEAD* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA), e 4 µL dos anticorpos monoclonais *APC-H7 Mouse anti-Human CD-14* (*BD biosciences*, San Jose, CA, USA) e *V450 Mouse anti-Human CD3* (*BD biosciences*, San Jose, CA, USA) e os tubos foram incubados por 40 minutos a 4°C, no escuro. Posteriormente, os tubos foram lavados novamente com PBS + 2% BSA. Após a caracterização dos monócitos,

foi realizado o ensaio de fagocitose. Os conídios de *T. rubrum* foram previamente marcados com o fluorocromo *CFSE* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA), adicionados às culturas dos monócitos na proporção 1:5, e incubados em estufa de CO₂, a 37°C. Após 3 horas de incubação, as células foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas e lavadas com PBS + 2% BSA. Após a lavagem, foi adicionado 0,1 µL do fluorocromo *PE-Texas Red – Live/DEAD* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA), e 4µL dos anticorpos monoclonais *APC-H7 Mouse anti-Human CD-14* (*BD biosciences*, San Jose, CA, USA) e *V450 Mouse anti-Human CD3* (*BD biosciences*, San Jose, CA, USA) às células e os tubos foram incubados por 40 minutos a 4°C, no escuro. Em seguida, os tubos foram lavados novamente e as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS + 2% BSA. Foi realizada a aquisição de 300.000 eventos por amostra no quadrante de monócitos, determinado pela relação de tamanho/granulosidade. A aquisição de dados foi realizada em citômetro de fluxo LSRFortessa (*BD biosciences*), e as análises foram realizadas pelo software *FlowJo* (*FlowJo LLC - BD biosciences*).

4.7 Ensaio de fagocitose/*binding* por coloração de *Giemsa*

Após o bloqueio dos receptores do tipo *Toll* e de lectina do tipo C, foram adicionados os conídios de *T. rubrum* às culturas dos monócitos (na proporção 1:5), e incubados em estufa de CO₂, a 37°C. Após 3 horas de incubação, as lamínulas de vidro de cada poço foram recolhidas e coradas com *Giemsa*, segundo o protocolo de Campos *et al.* (6). Após a coloração, as lamínulas foram fixadas com resina para montagem para lâminas (*ERV-MOUNT – CasaLab-Brasil*) e analisadas em microscópio óptico (*Nikon Eclipse E200*). O índice de fagocitose (IF) foi calculado multiplicando-se a porcentagem de monócitos que fagocitaram pela média de partículas fagocitadas por essas células.

4.8 Ensaio de fagocitose por microscopia confocal

Os monócitos foram plaqueados sobre lamínulas de vidro em placa de 24 poços. Foram adicionados os conídios de *T. rubrum*, previamente marcados com o fluorocromo *CFSE* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA), na proporção 1:5, às culturas dos monócitos, e incubados em estufa de CO₂, a 37°C. Após 3 horas de incubação, as lamínulas foram fixadas com formalina 8%, depois coradas com

Phalloidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para coloração dos filamentos de actina das células, e analisadas em microscópio confocal (LSM 880 – Zeiss).

4.9 Quantificação de nitrito (NO_2^-)

A produção de NO pelos monócitos foi avaliada pela quantificação dos níveis de nitrito (NO_2^-) nos sobrenadantes da cultura pela técnica de *Griess* após 3 horas de incubação. Resumidamente, foram adicionados 50 μL de sobrenadante em uma placa de 96 poços, com volume igual do reagente de *Griess* (Promega, Madison, WI, USA) por 10 minutos, em temperatura ambiente, no escuro. A absorbância foi medida utilizando-se leitor de placas com um filtro entre 520 nm e 550 nm. A concentração de NO_2^- foi determinada executando-se paralelamente uma curva padrão com concentrações variando de 0 a 100 μM . Foram utilizados PMA (50nM) e Zimosan (8 $\mu\text{g/mL}$) como controles positivos para a liberação de nitrito (ambos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4. 10 Quantificação de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10

A produção das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no sobrenadante com 18 horas de cultura dos monócitos foi avaliada e quantificada pela técnica de ELISA, seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences- San Jose, CA, USA). Resumidamente, placas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em tampão carbonato e armazenadas a 4°C de um dia para o outro. Após lavagens com PBS contendo 0,5% de *Tween* 20 (Inlab – Brasil), as placas foram bloqueadas com PBS+10% SFB (*Gibco/Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA), por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com as amostras por 2 horas, em temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo de detecção e conjugado estreptavidina, ambos diluídos em PBS+10%SFB, por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, após lavagens, foi adicionado o substrato TMB (tetrametilbenzidina) e as placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Para bloqueio da reação, foi utilizado H_3PO_4 1M (ácido fosfórico). A leitura foi realizada em leitor de placa, em comprimento de onda de 450 nm. A concentração das citocinas foi determinada executando-se paralelamente uma curva padrão, onde concentrações variaram

de 7,8 a 500 pg/mL para TNF- α e IL-10, de 3,91 a 250 pg/mL para IL-1 β e de 9,38 a 600 pg/mL para IL-6. Foram utilizados Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (100ng/mL) e Zimosan (8 μ g/mL) como controles positivos para a liberação de citocinas (ambos da *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Cinética da interação dos monócitos com o *T. rubrum*

Avaliamos a interação dos monócitos com conídios de *T. rubrum* em diferentes tempos (3, 6, 18 ou 24 horas) por microscopias óptica e eletrônica. Após 18 horas de interação, os conídios de *T. rubrum* começaram a filamentar dentro dos monócitos (**Figura 2A**) e, após 24 horas de interação, os conídios se desenvolveram em hifas (**Figura 2B**).

Figura 2: Avaliação da atividade fungicida dos monócitos. 2×10^5 /mL monócitos foram incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 em estufa de CO₂ a 37°C por 3, 6, 18 e 24 horas e essa interação foi analisada por microscopias óptica (Microscópio *Nikon Eclipse E200* 400x) e eletrônica (Microscópio eletrônico JEOL-1010 1.000x). **A)** Análise da cultura de monócitos por microscopia eletrônica após 18 horas de incubação. **B)** Análise da cultura de monócitos por microscopia óptica após 24 horas de incubação. Fotos de microscopia tiradas de um experimento (representando 4 experimentos independentes, sendo cada um realizado em triplicata)

5.2 Identificação e avaliação fenotípica dos monócitos e ensaio de fagocitose

Em seguida, foi realizada a imunofenotipagem para caracterização da população celular estudada. Depois de isolados, os monócitos foram identificados a partir da molécula de superfície CD14 (**Figura 3**).

Figura 3: Avaliação fenotípica dos monócitos. Ilustração da estratégia de *gates* e populações utilizada para caracterização dos monócitos. **A)** Exclusão dos possíveis agrupamentos celulares. **B)** População celular determinada pela relação de tamanho/granulosidade. **C)** O fluorocromo Live/DEAD utilizado como marcador de viabilidade celular. **D)** Exclusão da população de linfócitos a partir do marcador CD3. **E)** Monócitos identificados pelo fenótipo CD3-CD14+. **F)** Monócitos visualizados pela relação de tamanho/granulosidade. Essa identificação foi realizada por citometria de fluxo e as análises realizadas pelo software *FlowJo* (FlowJo LLC - BD biosciences)

Após a caracterização dos monócitos, foi realizado o ensaio de fagocitose, onde os conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 foram adicionados às culturas dos monócitos, e incubados em estufa de CO₂, a 37°C, por 3 horas. Após esse período, foi possível identificar a fagocitose pela dupla marcação (conídios e monócitos) no quadrante Q2 (**Figura 4**). É possível visualizar uma menor quantidade de células no quadrante Q3 (que representa apenas os monócitos não infectados), e quando comparado ao quadrante Q2, é possível visualizar que a grande maioria dos monócitos está fagocitando os conídios.

Figura 4: Avaliação da fagocitose dos conídios de *T. rubrum* pelos monócitos por citometria de fluxo. 2x10⁵/mL monócitos foram incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 em estufa de CO₂ a 37°C por 3 horas, e essa interação foi analisada por citometria de fluxo. **Q1:** Conídios de *T. rubrum* marcados com CFSE. **Q2:** Dupla marcação: monócitos e conídios de *T. rubrum*. **Q3:** Monócitos não infectados. **Q4:** Células/conídios que não foram marcados com nenhum fluorocromo. As análises foram realizadas pelo software FlowJo (FlowJo LLC - BD biosciences)

5.3 Ensaio de fagocitose dos conídios de *T. rubrum* pelos monócitos por microscopia confocal

Após os ensaios de fagocitose por microscopia óptica, eletrônica e por citômetria de fluxo, foi realizado o ensaio por microscopia confocal. Após 3 horas de incubação, foi possível observar, além da aderência do fungo na célula, a fagocitose dos conídios pelos monócitos, uma vez que essa é uma marcação intracelular. Com essa técnica, foi possível validar as duas metodologias utilizadas anteriormente.

Figura 5: Avaliação da fagocitose dos conídios de *T. rubrum* pelos monócitos por microscopia confocal. 2×10^5 /mL monócitos foram incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 em estufa de CO₂ a 37°C por 3 horas e essa interação foi analisada por microscopia confocal (Microscópio LSM 880 – Zeiss - 630x com óleo de imersão). **A)** Monócitos não infectados. **B)** Monócitos fagocitando os conídios de *T. rubrum*. Fotos de microscopia tiradas de um experimento (representando 3 experimentos independentes, sendo cada um realizado em triplicata)

5.4 A fagocitose do *T. rubrum* é prejudicada com o bloqueio do TLR2

O TLR2 reconhece vários ligantes microbianos, como fosfolipomananas e zimosan (34). Para avaliar se o TLR2 está envolvido no reconhecimento de conídios de *T. rubrum* pelos monócitos humanos, o IF foi determinado após 3 horas de incubação dos monócitos com os conídios de *T. rubrum*. Embora os monócitos tenham sido eficientes em fagocitar os conídios de *T. rubrum*, o bloqueio do TLR2 diminuiu significativamente a fagocitose (**Figuras 6 e 7**) e a atividade fungicida dos monócitos (**Figura 8**). A viabilidade do fungo fagocitado foi diminuída após bloqueio do TLR2.

Figura 6: Monócitos com o receptor TLR2 bloqueado exibem redução na fagocitose. 2×10^5 /mL monócitos foram incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 em estufa de CO_2 a 37°C durante 3 horas e essa interação foi analisada por microscopia óptica (Microscópio Nikon Eclipse E200). **A)** Controle: monócitos e conídios de *T. rubrum* **B)** com anti-hTLR2 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$). Resultados de 5 experimentos independentes

Figura 7: Índice de fagocitose dos monócitos após o bloqueio do receptor TLR2. 2×10^5 /mL monócitos foram incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 em estufa de CO₂ a 37°C durante 3 horas e essa interação foi analisada por microscopia óptica (Microscópio *Nikon Eclipse E200*). Esses resultados são média + s.e.m. de 11 experimentos independentes. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: ***P < 0.001

Figura 8: Unidades Formadoras de Colônia dos conídios de *T. rubrum* após bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos. Fungo quantificado a partir do lisado de monócitos (receptor TLR-2 bloqueado e controle sem bloqueio do receptor) incubados com conídios de *T. rubrum*. Resultados de 2 experimentos independentes com média+s.e.m. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: **p<0.01

5.5 O TLR2 não participa da produção de NO pelos monócitos, mas promove a produção de citocinas pró-inflamatórias após interação com conídios de *T. rubrum*

Foi visto que os monócitos foram capazes de fagocitar e destruir os conídios de *T. rubrum* e que, na ausência do TLR2, houve redução da fagocitose dos conídios desse fungo. Sendo assim, avaliamos participação do TLR2 em induzir a secreção de moléculas microbicidas como o NO em cultura de monócitos com conídios de *T. rubrum*. A secreção de NO foi avaliada após 3 horas de cultura de monócitos com conídios de *T. rubrum*. A secreção de NO não foi alterada na ausência do TLR2 quando comparado ao grupo controle (Figura 9).

Figura 9: Concentração de NO após o bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos na presença de *T. rubrum*. NO quantificado do sobrenadante da cultura de 2×10^5 /mL monócitos incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 na presença de 10 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-hTLR2. Essas culturas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 3 horas. Foram utilizados PMA (50nM) e Zimosan (8 µg/mL) como controles positivos para a liberação de nitrito. Resultados de onze experimentos independentes expressos como média + s.e.m. One-way ANOVA e teste de Bonferroni

Seguidamente, foi avaliado se o TLR2 está envolvido na secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias pelos monócitos. Foi realizada uma cinética para avaliar qual o pico de maior secreção de citocinas, e foi visto que essa expressão é tardia, após 18 horas. Então, o sobrenadante da cultura dos monócitos foi recolhido após esse período para quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 por ELISA. Houve diminuição da produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 após o bloqueio do receptor TLR2 (**Figuras 10, 11 e 12**) quando comparado ao grupo sem bloqueio do receptor (célula + *T. rubrum*). A secreção da citocina IL-10 não foi prejudicada na ausência do receptor TLR2 (**Figura 13**).

Figura 10: Quantificação da citocina TNF- α após bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos na presença de *T. rubrum*. Citocina quantificada do sobrenadante da cultura de 2×10^5 /mL monócitos incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 na presença de $10 \mu\text{g/mL}$ do anticorpo monoclonal anti-hTLR2. Essas culturas foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 18 horas. Foram utilizados Zymosan ($8 \mu\text{g/mL}$) e LPS (100 ng/mL) como controles positivos para a liberação de citocina. Resultados de onze experimentos independentes expressos como média + s.e.m. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: $**P < 0.01$

Figura 11: Quantificação da citocina IL-1 β após bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos na presença de *T. rubrum*. Citocina quantificada do sobrenadante da cultura de 2×10^5 /mL monócitos incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 na presença de 10 μ g/mL do anticorpo monoclonal anti-hTLR2. Essas culturas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 18 horas. Foram utilizados Zimosan (8 μ g/mL) e LPS (100 ng/mL) como controles positivos para a liberação de citocina. Resultados de onze experimentos independentes expressos como média + s.e.m. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: ***P < 0.001

Figura 12: Quantificação da citocina IL-6 após bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos na presença de *T. rubrum*. Citocina quantificada do sobrenadante da cultura de 2×10^5 /mL monócitos incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 na presença de 10 μ g/mL do anticorpo monoclonal anti-hTLR2. Foram utilizados Zimosan (8 μ g/mL) e LPS (100 ng/mL) como controles positivos para a liberação de citocina. Essas culturas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 18 horas. Resultados de onze experimentos independentes expressos como média + s.e.m. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: ***P < 0.001

Figura 13: Quantificação da citocina IL-10 após bloqueio do receptor TLR2 nos monócitos na presença de *T. rubrum*. Citocina quantificada do sobrenadante da cultura de 2×10^5 /mL monócitos incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 na presença de 10 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-hTLR2. Essas culturas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 18 horas. Foram utilizados Zimosan (8 µg/mL) e LPS (100 ng/mL) como controles positivos para a liberação de citocina. Resultados de onze experimentos independentes expressos como média + s.e.m. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: ns, não significativo

5.6 A fagocitose do *T. rubrum* é reduzida com o bloqueio do receptor de Manose, mas não com o bloqueio de Mincle e Dectina-1

Após avaliarmos o papel do TLR2 dos monócitos no reconhecimento do *T. rubrum*, a próxima etapa foi avaliar a participação dos receptores Mincle, Dectina-1 e MR (Figura 14). O IF foi determinado após 3 horas de incubação dos monócitos com os conídios de *T. rubrum*. O bloqueio do MR diminuiu significativamente a fagocitose pelos monócitos quando comparado ao grupo controle (Figura 15). A atividade fungicida também foi prejudicada (Figura 16). O mesmo não foi observado em Mincle e Dectina-1, uma vez que o bloqueio desses receptores não promoveu alteração na fagocitose nem na atividade fungicida dos monócitos.

Figura 14: Monócitos com o receptor de manose bloqueado exibem redução na fagocitose. 2×10^5 /mL monócitos foram incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 em estufa de CO_2 a 37°C durante 3 horas e a interação foi analisada por microscopia óptica (Microscópio *Nikon Eclipse E200*). **A)** Controle: monócitos e conídios de *T. rubrum*. **B)** com anti-hMincle ($10\mu\text{g/mL}$). **C)** com anti-hdectina-1 ($10\mu\text{g/mL}$). **D)** com anti-Manose ($5\mu\text{g/mL}$). Resultados de 5 experimentos independentes

Figura 15: Índice de fagocitose dos monócitos após o bloqueio dos receptores Manose, Mincle e Dectina-1. 2×10^5 /mL monócitos foram incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 em estufa de CO₂ a 37°C durante 3 horas e a interação foi analisada por microscopia óptica (Microscópio *Nikon Eclipse E200*). Esses resultados são média + s.e.m. de 11 experimentos independentes. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: **P<0.01; ns, não significante

Figura 16: Unidades Formadoras de Colônia dos conídios de *T. rubrum* após bloqueio dos receptores Manose, Mincle e Dectina-1 nos monócitos. Fungo quantificado a partir do lisado de monócitos (receptores MR, Mincle e Dectina-1 bloqueados, controle sem bloqueio dos receptores) incubados com conídios de *T. rubrum*. Resultados de 2 experimentos independentes com média+s.e.m. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: ** $p < 0.01$; ns, não significante

5.7 Os receptores MR, Mincle e Dectina-1 promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias após interação com conídios de *T. rubrum*

Por fim, foi avaliado se os receptores MR, Mincle e Dectina-1 estão envolvidos na secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias pelos monócitos. Após 18 horas de incubação, o sobrenadante da cultura de monócitos foi recolhido para quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 por ELISA. Houve diminuição da produção das citocinas TNF- α e IL-1 β após o bloqueio do MR (**Figura 17**), no entanto, o bloqueio de Mincle e Dectina-1 não prejudicou a produção de IL-1 β (**Figura 18**) quando comparado ao grupo sem bloqueio (célula + *T. rubrum*). A secreção da citocina IL-10 não foi prejudicada na ausência dos receptores (**Figura 19**).

Figura 17: Quantificação da citocina TNF- α após bloqueio dos receptores Manose, Mincle e Dectina-1 nos monócitos na presença de *T. rubrum*. Citocina quantificada do sobrenadante da cultura de 2×10^5 /mL monócitos incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 na presença de $5 \mu\text{g/mL}$ do anticorpo monoclonal MAb-hMR e $10 \mu\text{g/mL}$ dos anticorpos monoclonais anti-hMincle e anti-hDectin-1. Essas culturas foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 18 horas. Foi utilizado LPS (100 ng/mL) como controle positivo para a liberação de citocina. Resultados de onze experimentos independentes expressos como média + s.e.m. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Figura 18: Quantificação da citocina IL-1 β após bloqueio dos receptores Manose, Mincle e Dectina-1 nos monócitos na presença de *T. rubrum*. Citocina quantificada do sobrenadante da cultura de 2×10^5 /mL monócitos incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 na presença de $5 \mu\text{g/mL}$ do anticorpo monoclonal MAb-hMR e $10 \mu\text{g/mL}$ dos anticorpos monoclonais anti-hMincle e anti-hDectin-1. Essas culturas foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 18 horas. Foi utilizado LPS (100 ng/mL) como controle positivo para a liberação de citocina. Resultados de onze experimentos independentes expressos como média + s.e.m. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: *** $P < 0.001$; ns, não significante

Figura 19: Quantificação da citocina IL-10 após bloqueio dos receptores Manose, Mincle e Dectina-1 nos monócitos na presença de *T. rubrum*. Citocina quantificada do sobrenadante da cultura de 2×10^5 /mL monócitos incubados com conídios de *T. rubrum* na proporção 1:5 na presença de $5 \mu\text{g/mL}$ do anticorpo monoclonal MAb-hMR e $10 \mu\text{g/mL}$ dos anticorpos monoclonais anti-hMincle e anti-hDectin-1. Essas culturas foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 18 horas. Foi utilizado LPS (100 ng/mL) como controle positivo para a liberação de citocina. Resultados de onze experimentos independentes expressos como média + s.e.m. One-way ANOVA e teste de Bonferroni: ns, não significante

6. DISCUSSÃO

A dermatofitose é uma infecção fúngica crônica, geralmente benigna, mas de difícil tratamento. O papel dos fagócitos e dos PRRs nas infecções fúngicas já foi discutido em vários trabalhos (48, 103, 125, 126); no entanto, poucos estudos abordam o papel dos monócitos e dos PRRs durante a fase inicial da dermatofitose.

Previamente consideradas como infecções fúngicas superficiais limitadas às camadas de queratina da epiderme, as infecções por dermatófitos em pacientes imunocomprometidos podem evoluir para infecções profundas e disseminadas, implicando o envolvimento de outros compartimentos do sistema imunológico (21).

Como consequência, nosso objetivo foi avaliar o papel dos receptores TLR2, mincle, dectina-1 e MR expressos em monócitos humanos após interação com os conídios de *T. rubrum*. Para isso, os monócitos em cultura foram tratados com anticorpos monoclonais anti-hTLR2, anti-hMincle, anti-hDectin-1 e anti-hMR, que funcionaram como antagonistas da interação dessas células com os conídios do *T. rubrum*.

Inicialmente, investigamos o papel do TLR2 após interação com os conídios de *T. rubrum*. Nossos resultados mostram que o bloqueio desse receptor prejudica a fagocitose e a atividade fungicida dos monócitos. Porém, como o TLR2 não é um receptor fagocítico, a fagocitose ineficiente pode ser explicada pela secreção prejudicada de fatores opsonizantes, pelos fagócitos, ou pelo papel coadjuvante do TLR2 na função de outros receptores, como, por exemplo, dectina-1 (127). A fagocitose dependente de TLR2 envolve o reconhecimento de carboidratos fúngicos; no entanto, vários estudos investigando seu papel em diferentes modelos de infecções fúngicas mostraram resultados conflitantes (34), sugerindo efeitos protetores ou não protetores, que podem ser explicados por diferenças na virulência dos patógenos, pelos antígenos e a genética dos animais utilizados.

A colaboração entre PRRs no reconhecimento de micro-organismos é capaz de gerar respostas inflamatórias e indução/modulação da resposta adaptativa (127-130). Netea *et al.* (2006) demonstraram que o reconhecimento

de *C. albicans* envolve a cooperação entre os TLRs e os CLRs, uma vez que os resíduos de manose e fucose foram reconhecidos por MR e TLR4, enquanto o reconhecimento de β 1-3glucanas ocorreu através de TLR2 e dectina-1 – expressos tanto em macrófagos murinos como em monócitos humanos (131). Podemos hipotetizar a colaboração do TLR2 com outros receptores da imunidade inata no reconhecimento do *T. rubrum*. Estudos futuros serão realizados para investigar a colaboração entre esses receptores e suas interferências na sinalização da resposta na dermatofitose.

O bloqueio do TLR2 não interferiu no fato de os conídios ingeridos pelos monócitos se diferenciarem em hifas, crescendo e matando os monócitos após 12 horas de cultura, corroborando os resultados encontrados em modelos de macrófagos murinos (6). Estes resultados indicam que as células fúngicas são capazes de inibir as funções dos monócitos ou induzir citocinas supressoras que poderiam favorecer a evasão fúngica da resposta do hospedeiro.

Mostramos que o TLR2 não participa da secreção da citocina anti-inflamatória IL-10. Já foi demonstrado que a IL-10 desempenha papel inibitório na atividade de monócitos e neutrófilos contra patógenos fúngicos. Os monócitos humanos induzidos com conídios de *T. rubrum* produziram baixos níveis de IL-10, estando de acordo com dados sobre outros fungos, que também foram fracos indutores da IL-10 (em comparação com níveis de citocinas pró-inflamatórias secretadas) (132).

Hipotetizamos que a secreção de IL-10 por TLR2 induzida por conídios de *T. rubrum* em monócitos humanos possa ser equilibrada por sinalização de outros receptores, como o TLR4. Estudos anteriores demonstraram, em modelos experimentais e humanos, que o TLR4, que reconhece resíduos de manana fúngica, sinaliza para aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuir a produção de IL-10 (132-134). Essa sinalização não ocorreria em monócitos de pacientes com dermatofitose crônica, que secretam níveis significativamente mais altos de IL-10 quando comparados a indivíduos controles ou pacientes com *Tinea pedis* – como demonstrou Sousa *et al.* (2015) (103). Isso também poderia explicar porque o bloqueio do TLR2 por si só não resultou em aumento nos níveis de IL-10.

Além disso, o TLR2 contribui para a secreção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por *T. rubrum*. Outros estudos já demonstraram o papel do TLR2 na atividade antifúngica de macrófagos murinos e neutrófilos, principalmente por influência na produção de TNF- α (135-137). Ademais, Yoshikawa *et al.* (2015) mostraram que a falta de sinalização da citocina pró-inflamatória IL-1 promove o desenvolvimento de hifas de *T. rubrum*, revelando papel protetor da IL-1 β em macrófagos, e mostraram, também, que camundongos sem IL-1R apresentam redução na produção de IL-17 – citocina fundamental para uma resposta antifúngica eficaz (138).

Estudos anteriores sugerem que o TLR2 regula a liberação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio antimicrobianos por células imunes inatas (41, 139), mas não conseguimos reproduzir esses achados em nossos experimentos, presumindo que não há contribuição do TLR2 para a secreção de NO nos monócitos induzida por *T. rubrum*. No entanto, o *T. rubrum* não induziu um pico alto de espécies oxidativas (em comparação com partículas de zimosan); então, podemos hipotetizar que esse fungo não promove forte explosão oxidativa em monócitos e que o TLR2 pode ser importante na regulação de eventos de estresse oxidativo intenso.

Posteriormente, avaliamos o papel dos receptores manose, mincle e dectina-1 dos monócitos na interação com os conídios de *T. rubrum*. Nossos resultados mostram que o bloqueio do receptor de manose prejudicou a fagocitose e a atividade fungicida dos monócitos e que esse receptor contribuiu para a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β induzidas por *T. rubrum* – mas não para a secreção da citocina IL-10.

Já foi demonstrado que o receptor de manose pode ter função imunossupressora, inibindo a produção de TNF- α mediada por TLR4 após reconhecimento do *P. jirovecii* e sugerindo que o receptor de manose pode regular as vias de citocinas induzidas por outros receptores (140). O conceito de colaboração entre receptores já foi abordado anteriormente (127, 130); no entanto, estudos futuros são necessários para investigar a contribuição do receptor de manose com os TLRs (isto é, TLR2 e TLR4) no reconhecimento do *T. rubrum* e verificar se essas colaborações refletem na produção de citocinas.

A citocina IL-1 β é um mediador fundamental na indução de IFN- γ no controle da proliferação de *T. rubrum*, em modelo experimental de dermatofitose (111), e está envolvida na indução de respostas do eixo Th17(141). TNF- α tem papel fundamental no recrutamento de neutrófilos e na indução da inflamação (142). O nível baixo dessas citocinas pró-inflamatórias, em conjunto com a liberação de IL-10, é o que provavelmente afeta a indução de uma resposta protetora contra o *T. rubrum*, uma vez que a IL-10 pode inibir os efeitos das citocinas pró inflamatórias e inibe a proliferação de células Th1, mas não de Th2, que está relacionada à resposta não protetora nas infecções fúngicas, inclusive na dermatofitose.

No entanto, o mesmo não foi observado nos receptores mincle e dectina-1. O bloqueio desses receptores não afetou a fagocitose, tendo em vista que a resposta frente ao estímulo com conídios de *T. rubrum* foi semelhante com a resposta do grupo controle (sem bloqueio de receptor).

Alguns estudos mostram resultados conflitantes sobre o mincle ser um receptor fagocítico ou não (56, 143), o que poderia ser explicado pelo patógeno em si, uma vez que esse receptor mostrou não induzir respostas inflamatórias durante infecções fúngicas, mas durante respostas contra *Mycobacterium tuberculosis* (59, 77, 144). Mincle pode ter um papel no reconhecimento inicial, e depender de uma colaboração simultânea com um ou mais receptores, para que ocorra a fagocitose e consequente resposta inflamatória, e que sozinho, seu reconhecimento e sinalização sejam compensados por outros receptores.

Dectina-1, uma vez que reconhece o carboidrato, β -1,3-glucana, pode reconhecer várias espécies fúngicas, como *A. fumigatus* (145), *P. carinii* (146), *C. albicans* e *S. cerevisiae* (147). No entanto, há evidências de patógenos que mascaram essa estrutura em sua parede celular, evitando o reconhecimento pela dectina-1(148, 149) Isso poderia também ser um mecanismo de defesa do *T. rubrum* frente o reconhecimento por monócitos humanos, uma vez que o bloqueio desse receptor não demonstrou contribuir na fagocitose e atividade fungicida. Yoshikawa *et al.* (2016) evidenciou em modelo murino que a ausência de dectina-1 prejudica a eliminação de *T. rubrum* (7), porém esse papel protetor pode estar limitado ao modelo *in vivo*.

Além disso, o bloqueio de mincle e dectina-1 prejudicou apenas a secreção de TNF- α , mas não a secreção de IL-1 β . Nenhum dos receptores analisados participou da secreção da citocina anti-inflamatória IL-10. Embora esses receptores reconheçam diferentes PAMPS, ambos sinalizam pela mesma via para a ativação de NF- κ B (150), então podemos hipotetizar que a secreção de citocinas seja dependente de uma colaboração entre mincle e dectina-1.

Os resultados demonstram que os TLRs, assim como os CLR, desempenham papéis diferentes durante as infecções fúngicas, dependendo das colaborações entre si na ativação da resposta imune, reforçando a relevância do estudo sobre a função desses receptores em diferentes células na dermatofitose. Demonstramos que o receptor TLR2 e o receptor de manose, expressos nos monócitos humanos, têm papel significativo na captura dos conídios de *T. rubrum* e na produção de citocinas inflamatórias.

7. CONCLUSÃO

- Os monócitos foram capazes de fagocitar os conídios de *T. rubrum* após 3 horas de cultura, no entanto, essas células não foram capazes de ativar de forma eficiente suas funções microbidas para destruir o *T. rubrum* e evitar sua filamentação, o que pode explicar a baixa produção de espécies reativas de oxigênio;
- O bloqueio dos receptores TLR2 e MR diminuiu a fagocitose e a atividade fungicida dos monócitos na presença dos conídios de *T. rubrum*, assim como a secreção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6;
- O TLR2 não participa da produção de NO pelos monócitos na presença dos conídios de *T. rubrum*;
- O bloqueio dos receptores mincle e dectina-1 não alterou a fagocitose e a atividade fungicida dos monócitos na presença dos conídios de *T. rubrum*, alterou apenas a secreção da citocina TNF- α ;
- Nenhum dos receptores avaliados participa da secreção da citocina IL-10.

8. REFERÊNCIAS

1. Rouzaud C, Hay R, Chosidow O, Dupin N, Puel A, Lortholary O, et al. Severe Dermatophytosis and Acquired or Innate Immunodeficiency: A Review. *J Fungi (Basel)*. 2015;2(1).
2. Marconi VC, Kradin R, Marty FM, Hospenthal DR, Kotton CN. Disseminated dermatophytosis in a patient with hereditary hemochromatosis and hepatic cirrhosis: case report and review of the literature. *Med Mycol*. 2010;48(3):518-27.
3. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008;51 Suppl 4:2-15.
4. White TC, Oliver BG, Gräser Y, Henn MR. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryot Cell*. 2008;7(8):1238-45.
5. Lee WJ, Kim SL, Jang YH, Lee SJ, Kim DW, Bang YJ, et al. Increasing Prevalence of *Trichophyton rubrum* Identified through an Analysis of 115,846 Cases over the Last 37 Years. *J Korean Med Sci*. 2015;30(5):639-43.
6. Campos MR, Russo M, Gomes E, Almeida SR. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect*. 2006;8(2):372-9.
7. Yoshikawa FS, Yabe R, Iwakura Y, de Almeida SR, Saijo S. Dectin-1 and Dectin-2 promote control of the fungal pathogen *Trichophyton rubrum* independently of IL-17 and adaptive immunity in experimental deep dermatophytosis. *Innate Immun*. 2016;22(5):316-24.
8. Mendez-Tovar LJ. Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor. *Clin Dermatol*. 2010;28(2):185-9.
9. Kaushik N, Pujalte GG, Reese ST. Superficial Fungal Infections. *Prim Care*. 2015;42(4):501-16.
10. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(2):240-59.
11. Brettmann EA, de Guzman Strong C. Recent evolution of the human skin barrier. *Exp Dermatol*. 2018;27(8):859-66.
12. Seite S, Misery L. Skin sensitivity and skin microbiota: Is there a link? *Exp Dermatol*. 2018;27(9):1061-4.
13. Peres NT, Sanches PR, Falcão JP, Silveira HC, Paião FG, Maranhão FC, et al. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Microbiol*. 2010;10:39.
14. Ogawa H, Summerbell RC, Clemons KV, Koga T, Ran YP, Rashid A, et al. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Med Mycol*. 1998;36 Suppl 1:166-73.
15. Zurita J, Hay RJ. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol*. 1987;89(5):529-34.
16. Duek L, Kaufman G, Ulman Y, Berdicevsky I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *J Infect*. 2004;48(2):175-80.
17. Brasch J. Current knowledge of host response in human tinea. *Mycoses*. 2009;52(4):304-12.
18. Gnat S, Nowakiewicz A, Łagowski D, Zięba P. Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. *J Med Microbiol*. 2019;68(6):823-36.
19. Oliveira CB, Vasconcellos C, Sakai-Valente NY, Sotto MN, Luiz FG, Belda Júnior W, et al. Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 expression of keratinocytes from patients with localized and disseminated dermatophytosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(1):57-61.

20. Alves de Medeiros AK, Lodewick E, Bogaert DJ, Haerynck F, Van Daele S, Lambrecht B, et al. Chronic and Invasive Fungal Infections in a Family with CARD9 Deficiency. *J Clin Immunol*. 2016;36(3):204-9.
21. Lanternier F, Pathan S, Vincent QB, Liu L, Cypowyj S, Prando C, et al. Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency. *N Engl J Med*. 2013;369(18):1704-14.
22. Grumach AS, de Queiroz-Telles F, Migaud M, Lanternier F, Filho NR, Palma SM, et al. A homozygous CARD9 mutation in a Brazilian patient with deep dermatophytosis. *J Clin Immunol*. 2015;35(5):486-90.
23. Abdel-Rahman SM. Genetic Predictors of Susceptibility to Dermatophytoses. *Mycopathologia*. 2017;182(1-2):67-76.
24. Balci DD, Cetin M. Widespread, chronic, and fluconazole-resistant *Trichophyton rubrum* infection in an immunocompetent patient. *Mycoses*. 2008;51(6):546-8.
25. Cordeiro RA, Brilhante RS, Rocha MF, Rabenhorsch SH, Moreira JL, Grangeiro TB, et al. Antifungal susceptibility and genetic similarity of sequential isolates of *Trichophyton rubrum* from an immunocompetent patient with chronic dermatophytosis. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31(1):122-4.
26. Kong QT, Du X, Yang R, Huang SY, Sang H, Liu WD. Chronically recurrent and widespread tinea corporis due to *Trichophyton rubrum* in an immunocompetent patient. *Mycopathologia*. 2015;179(3-4):293-7.
27. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:257-90.
28. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-26.
29. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*. 2003;85(2):85-95.
30. Zhang P, Liu X, Cao X. Extracellular pattern recognition molecules in health and diseases. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(3):255-7.
31. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:157-83.
32. Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003;19(3):311-5.
33. Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(9):672-6.
34. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol*. 2012;3:79.
35. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(1):1-14.
36. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:447-80.
37. Rossato L, Santos SSD, Ferreira LG, de Almeida SR. The importance of Toll-like receptor 4 during experimental *Sporothrix brasiliensis* infection. *Med Mycol*. 2019;57(4):489-95.
38. Sassá MF, Ferreira LS, Ribeiro LC, Carlos IZ. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia*. 2012;174(1):21-30.
39. Biondo C, Midiri A, Messina L, Tomasello F, Garufi G, Catania MR, et al. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Immunol*. 2005;35(3):870-8.
40. Villamón E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect*. 2004;6(1):1-7.
41. Tessarolli V, Gasparoto TH, Lima HR, Figueira EA, Garlet TP, Torres SA, et al. Absence of TLR2 influences survival of neutrophils after infection with *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2010;48(1):129-40.

42. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol.* 2004;172(5):3059-69.
43. Netea MG, Suttmüller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol.* 2004;172(6):3712-8.
44. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science.* 2008;321(5889):691-6.
45. Zhang L, Liu T, Kong W, Zhang W, Gu M, Chen Y, et al. Decreased TLR2 signal expression in peripheral blood mononuclear cell from patients with cryptococcal meningitis. *Microbiol Immunol.* 2015;59(6):357-64.
46. Drummond RA, Gaffen SL, Hise AG, Brown GD. Innate Defense against Fungal Pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;5(6).
47. Van der Graaf CA, Netea MG, Morr SA, Den Heijer M, Verweij PE, Van der Meer JW, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17(1):29-34.
48. Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:1-21.
49. Carvalho A, Cunha C, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Denning DW, Romani L. Genetic variability of innate immunity impacts human susceptibility to fungal diseases. *Int J Infect Dis.* 2010;14(6):e460-8.
50. Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol.* 2012;13(9):817-22.
51. Goyal S, Castrilln-Betancur JC, Klaile E, Slevogt H. The Interaction of Human Pathogenic Fungi With C-Type Lectin Receptors. *Front Immunol.* 2018;9:1261.
52. Kerrigan AM, Brown GD. Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev.* 2010;234(1):335-52.
53. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 2005;272(24):6179-217.
54. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K, Saito T. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol.* 2008;9(10):1179-88.
55. Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, Matsuzawa T, Ishikawa E, Sakuma M, et al. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(6):1897-902.
56. Wells CA, Salvage-Jones JA, Li X, Hitchens K, Butcher S, Murray RZ, et al. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2008;180(11):7404-13.
57. Vautier S, Sousa MaG, Brown GD. C-type lectins, fungi and Th17 responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(6):405-12.
58. Gazi U, Martinez-Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology.* 2009;214(7):554-61.
59. Marakalala MJ, Graham LM, Brown GD. The role of Syk/CARD9-coupled C-type lectin receptors in immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Clin Dev Immunol.* 2010;2010:567571.
60. Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung SH, Kotaki H, Seki K, et al. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol.* 2007;8(1):39-46.
61. Chen SM, Zou Z, Qiu XR, Hou WT, Zhang Y, Fang W, et al. The critical role of Dectin-1 in host controlling systemic. *Am J Transl Res.* 2019;11(2):721-32.
62. Lee SJ, Zheng NY, Clavijo M, Nussenzweig MC. Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infect Immun.* 2003;71(1):437-45.

63. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spruel AB, Venselaar H, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med*. 2009;361(18):1760-7.
64. Chai LY, de Boer MG, van der Velden WJ, Plantinga TS, van Spruel AB, Jacobs C, et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human β -glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J Infect Dis*. 2011;203(5):736-43.
65. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood*. 2010;116(24):5394-402.
66. van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, Koenen HJ, Cheng SC, Joosten I, et al. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):329-40.
67. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343-53.
68. Blutfeld MS, Lohre JM, Pawich DA, Vlahovic TC. The Immunologic Response to. *J Fungi (Basel)*. 2015;1(2):130-7.
69. Criado PR, Oliveira CB, Dantas KC, Takiguti FA, Benini LV, Vasconcellos C. Superficial mycosis and the immune response elements. *An Bras Dermatol*. 2011;86(4):726-31.
70. Chai LY, Netea MG, Vonk AG, Kullberg BJ. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Med Mycol*. 2009;47(3):227-36.
71. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):275-88.
72. Borghi M, Renga G, Puccetti M, Oikonomou V, Palmieri M, Galosi C, et al. Antifungal Th Immunity: Growing up in Family. *Front Immunol*. 2014;5:506.
73. Müller U, Stenzel W, Piehler D, Grahnert A, Protschka M, Köhler G, et al. Abrogation of IL-4 receptor- α -dependent alternatively activated macrophages is sufficient to confer resistance against pulmonary cryptococcosis despite an ongoing T(h)2 response. *Int Immunol*. 2013;25(8):459-70.
74. Nelson MP, Christmann BS, Werner JL, Metz AE, Trevor JL, Lowell CA, et al. IL-33 and M2a alveolar macrophages promote lung defense against the atypical fungal pathogen *Pneumocystis murina*. *J Immunol*. 2011;186(4):2372-81.
75. Tainwala R, Sharma Y. Pathogenesis of dermatophytoses. *Indian J Dermatol*. 2011;56(3):259-61.
76. Woodfolk JA. Allergy and dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(1):30-43.
77. Verma A, Wüthrich M, Deepe G, Klein B. Adaptive immunity to fungi. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;5(3):a019612.
78. Brummer E, Stevens DA. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Clin Exp Immunol*. 1995;102(1):65-70.
79. Calvi SA, Peraçoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect*. 2003;5(2):107-13.
80. Deepe GS, Gibbons R, Woodward E. Neutralization of endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor subverts the protective immune response to *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol*. 1999;163(9):4985-93.
81. Allendoerfer R, Deepe GS. Intrapulmonary response to *Histoplasma capsulatum* in gamma interferon knockout mice. *Infect Immun*. 1997;65(7):2564-9.
82. Richardson JP, Moyes DL. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence*. 2015;6(4):327-37.
83. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med*. 2009;206(2):299-311.

84. Kleinschek MA, Muller U, Brodie SJ, Stenzel W, Kohler G, Blumenschein WM, et al. IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol.* 2006;176(2):1098-106.
85. Rudner XL, Happel KI, Young EA, Shellito JE. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun.* 2007;75(6):3055-61.
86. Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J Med Microbiol.* 2006;55(Pt 9):1175-85.
87. Berk SH, Penneys NS, Weinstein GD. Epidermal activity in annular dermatophytosis. *Arch Dermatol.* 1976;112(4):485-8.
88. Dambuja IM, Levitz SM, Netea MG, Brown GD. Fungal Recognition and Host Defense Mechanisms. *Microbiol Spectr.* 2017;5(4).
89. Mignon B, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Vermout S. Immunization and dermatophytes. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21(2):134-40.
90. Jensen JM, Pfeiffer S, Akaki T, Schröder JM, Kleine M, Neumann C, et al. Barrier function, epidermal differentiation, and human beta-defensin 2 expression in tinea corporis. *J Invest Dermatol.* 2007;127(7):1720-7.
91. López-García B, Lee PH, Gallo RL. Expression and potential function of cathelicidin antimicrobial peptides in dermatophytosis and tinea versicolor. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(5):877-82.
92. Dahl MV. Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J Am Acad Dermatol.* 1993;28(5 Pt 1):S19-S23.
93. Elavarashi E, Kindo AJ, Rangarajan S. Enzymatic and Non-Enzymatic Virulence Activities of Dermatophytes on Solid Media. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(2):DC23-DC5.
94. Cafarchia C, Iatta R, Latrofa MS, Gräser Y, Otranto D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect Genet Evol.* 2013;20:336-51.
95. Dahl MV. Dermatophytosis and the immune response. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31(3 Pt 2):S34-41.
96. Blake JS, Dahl MV, Herron MJ, Nelson RD. An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol.* 1991;96(5):657-61.
97. García-Madrid LA. *Trichophyton rubrum* Manipulates the Innate Immune Functions of Human Keratinocytes. In: Huizar-López MdR, editor. *Central European Journal of Biology* 2011.
98. Brasch J, Mörig A, Neumann B, Proksch E. Expression of antimicrobial peptides and toll-like receptors is increased in tinea and pityriasis versicolor. *Mycoses.* 2014;57(3):147-52.
99. Huang X, Yi J, Yin S, Li M, Ye C, Lai W, et al. *Trichophyton rubrum* conidia modulate the expression and transport of Toll-like receptor 2 in HaCaT cell. *Microb Pathog.* 2015;83-84:1-5.
100. Dahl MV, Carpenter R. Polymorphonuclear leukocytes, complement, and *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol.* 1986;86(2):138-41.
101. Meymandi S, Silver SG, Crawford RI. Intraepidermal neutrophils--a clue to dermatophytosis? *J Cutan Pathol.* 2003;30(4):253-5.
102. Szepes E, Magyarlaki M, Battyáni Z, Schneider I. Immunohistological characterization of the cellular infiltrate in dermatophytosis. *Mycoses.* 1993;36(5-6):203-6.
103. de Sousa MaG, Santana GB, Criado PR, Benard G. Chronic widespread dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum*: a syndrome associated with a *Trichophyton*-specific functional defect of phagocytes. *Front Microbiol.* 2015;6:801.

104. Santiago K, Bomfim GF, Criado PR, Almeida SR. Monocyte-derived dendritic cells from patients with dermatophytosis restrict the growth of *Trichophyton rubrum* and induce CD4-T cell activation. *PLoS One*. 2014;9(11):e110879.
105. Reis APC, Correia FF, Jesus TM, Pagliari C, Sakai-Valente NY, Belda Júnior W, et al. In situ immune response in human dermatophytosis: possible role of Langerhans cells (CD1a+) as a risk factor for dermatophyte infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61:e56.
106. Rodwell GE, Bayles CL, Towersey L, Aly R. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. *Int J Dermatol*. 2008;47(4):339-43.
107. Costa JE, Neves RP, Delgado MM, Lima-Neto RG, Moraes VM, Coêlho MR. Dermatophytosis in patients with human immunodeficiency virus infection: clinical aspects and etiologic agents. *Acta Trop*. 2015;150:111-5.
108. Venkatesan P, Perfect JR, Myers SA. Evaluation and management of fungal infections in immunocompromised patients. *Dermatol Ther*. 2005;18(1):44-57.
109. Waldman A, Segal R, Berdicevsky I, Gilhar A. CD4+ and CD8+ T cells mediated direct cytotoxic effect against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Int J Dermatol*. 2010;49(2):149-57.
110. Kaya TI, Eskandari G, Guvenc U, Gunes G, Tursen U, Burak Cimen MY, et al. CD4+CD25+ Treg cells in patients with toenail onychomycosis. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(10):725-9.
111. Baltazar LeM, Santos PC, Paula TP, Rachid MA, Cisalpino PS, Souza DG, et al. IFN- γ impairs *Trichophyton rubrum* proliferation in a murine model of dermatophytosis through the production of IL-1 β and reactive oxygen species. *Med Mycol*. 2014;52(3):293-302.
112. Burstein VL, Guasconi L, Beccacece I, Theumer MG, Mena C, Prinz I, et al. IL-17-Mediated Immunity Controls Skin Infection and T Helper 1 Response during Experimental *Microsporum canis* Dermatophytosis. *J Invest Dermatol*. 2018;138(8):1744-53.
113. Sakuragi Y, Sawada Y, Hara Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, et al. Increased circulating Th17 cell in a patient with tinea capitis caused by *Microsporum canis*. *Allergol Int*. 2016;65(2):215-6.
114. Nielsen J, Kofod-Olsen E, Spaun E, Larsen CS, Christiansen M, Mogensen TH. A STAT1-gain-of-function mutation causing Th17 deficiency with chronic mucocutaneous candidiasis, psoriasiform hyperkeratosis and dermatophytosis. *BMJ Case Rep*. 2015;2015.
115. Heinen MP, Cambier L, Antoine N, Gabriel A, Gillet L, Bureau F, et al. Th1 and Th17 Immune Responses Act Complementarily to Optimally Control Superficial Dermatophytosis. *J Invest Dermatol*. 2019;139(3):626-37.
116. Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schäffer AA, Woellner C, Salzer U, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med*. 2009;361(18):1727-35.
117. Rieber N, Gazendam RP, Freeman AF, Hsu AP, Collar AL, Sugui JA, et al. Extrapulmonary. *JCI Insight*. 2016;1(17):e89890.
118. Zhang Y, Mijiti J, Huang C, Song Y, Wan Z, Li R, et al. Deep dermatophytosis caused by *Microsporum ferrugineum* in a patient with CARD9 mutations. *Br J Dermatol*. 2019;181(5):1093-5.
119. Nazarian RM, Lilly E, Gavino C, Hamilos DL, Felsenstein D, Vinh DC, et al. Novel CARD9 mutation in a patient with chronic invasive dermatophyte infection (tinea profunda). *J Cutan Pathol*. 2019.
120. Huang C, Peng Y, Zhang Y, Li R, Wan Z, Wang X. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(12):1380.
121. Heinen MP, Cambier L, Fievez L, Mignon B. Are Th17 Cells Playing a Role in Immunity to Dermatophytosis? *Mycopathologia*. 2017;182(1-2):251-61.

122. Khosravi AR, Shokri H, Mansouri P. Immediate hypersensitivity and serum IgE antibody responses in patients with dermatophytosis. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2012;30(1):40-7.
123. Bagut ET, Cambier L, Heinen MP, Cozma V, Monod M, Mignon B. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of ringworm infection in cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(8):1150-4.
124. Repnik U, Knezevic M, Jeras M. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *J Immunol Methods.* 2003;278(1-2):283-92.
125. Almeida SR. Immunology of dermatophytosis. *Mycopathologia.* 2008;166(5-6):277-83.
126. Yoshikawa FS, De Almeida SR. The Role of Phagocytes and NETs in Dermatophytosis. *Mycopathologia.* 2017;182(1-2):263-72.
127. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med.* 2003;197(9):1107-17.
128. Willment JA, Brown GD. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol.* 2008;16(1):27-32.
129. Netea MG, van de Veerdonk F, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;52(1):118-23.
130. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol.* 2008;10(10):2058-66.
131. Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1642-50.
132. Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, et al. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis.* 2003;188(2):320-6.
133. Chai LY, Vonk AG, Kullberg BJ, Verweij PE, Verschueren I, van der Meer JW, et al. *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses. *Microbes Infect.* 2011;13(2):151-9.
134. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014;5:461.
135. Blasi E, Mucci A, Neglia R, Pezzini F, Colombari B, Radzioch D, et al. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;44(1):69-79.
136. Gil ML, Fradelizi D, Gozalbo D. TLR2: for or against *Candida albicans*? *Trends Microbiol.* 2005;13(7):298-9; discussion 9-301.
137. Gil ML, Gozalbo D. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. *Microbes Infect.* 2006;8(8):2299-304.
138. Yoshikawa FS, Ferreira LG, de Almeida SR. IL-1 signaling inhibits *Trichophyton rubrum* conidia development and modulates the IL-17 response in vivo. *Virulence.* 2015;6(5):449-57.
139. Pinke KH, Lima HG, Cunha FQ, Lara VS. Mast cells phagocyte *Candida albicans* and produce nitric oxide by mechanisms involving TLR2 and Dectin-1. *Immunobiology.* 2016;221(2):220-7.
140. Zhang J, Tachado SD, Patel N, Zhu J, Imrich A, Manfrulli P, et al. Negative regulatory role of mannose receptors on human alveolar macrophage proinflammatory cytokine release in vitro. *J Leukoc Biol.* 2005;78(3):665-74.
141. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-50.

142. Summers deLuca L, Gommerman JL. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(5):339-51.
143. Sharma A, Steichen AL, Jondle CN, Mishra BB, Sharma J. Protective role of Mincle in bacterial pneumonia by regulation of neutrophil mediated phagocytosis and extracellular trap formation. *J Infect Dis*. 2014;209(11):1837-46.
144. Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, Toyonaga K, Yamada H, Takeuchi O, et al. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med*. 2009;206(13):2879-88.
145. Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, et al. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog*. 2005;1(4):e42.
146. Steele C, Marrero L, Swain S, Harmsen AG, Zheng M, Brown GD, et al. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med*. 2003;198(11):1677-88.
147. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*. 2003;197(9):1119-24.
148. Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J*. 2005;24(6):1277-86.
149. Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(4):1366-70.
150. Vautier S, MacCallum DM, Brown GD. C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. *Cytokine*. 2012;58(1):89-99.