THAIS MARTINS DE JESUS

Participação dos receptores de lectinas do tipo C e do tipo *Toll* expressos nos neutrófilos no reconhecimento do *Trichophyton rubrum*

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 de Sousa Stafocker

São Paulo
2022

THAIS MARTINS DE JESUS

Participação dos receptores de lectinas do tipo C e do tipo *Toll* expressos nos neutrófilos no reconhecimento do *Trichophyton rubrum*

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 de Sousa Stafocker

São Paulo
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Jesus, Thais Martins de
Participação dos receptores de lectinas do tipo C e do tipo Toll expressos nos neutrófilos no reconhecimento do Trichophyton rubrum / Thais Martins de Jesus. -- São Paulo, 2022.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientadora: Maria da Glória de Sousa Stafocker.

Descritores: 1.Receptores de lectina do tipo C 2.Dermatofitose 3.Imunidade inata 4.Neutrófilos 5.Trichophyton rubrum 6.Dermatófitos

USP/FM/DBD-254/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho aos meus dois amores: Luiz Américo de Jesus e Luiz Augusto Martins de Jesus Ventura. Vocês são o combustível que me dá energia, para eu levantar todas as manhãs e ir atrás do nosso conforto, da nossa segurança e dos nossos momentos de felicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gil, por me aceitar de volta ao LIM-53 e me apresentar o trabalho da Dra. Maria da Glória Sousa Stafocker.

À Dra. Maria da Glória, por me aceitar em sua linha de pesquisa. Obrigada por todas as conversas e conselhos sobre a carreira profissional, pelos “puxões” que me deu e pela paciência quanto aos prazos de entrega, durante todo o meu período como mestranda.

À Giovanna Azevedo, à Ana Paula Reis e à Franciele Correia, pela amizade criada, pela parceria no laboratório e nos experimentos e pelas risadas compartilhadas.

Aos funcionários e colegas do LIM-53: Dona Antônia, Dona Kátia, Sônia Cavalcante, Fábio Lorenzo, Danilo Yamamoto, Lumena Siqueira, Mônica Vidal e Viviane Gimenez, por todo suporte que me deram, antes e depois de me ambientar no LIM, pelos conselhos e cafés compartilhados.

À Dra. Gilda, pela solicitude, pelos conselhos e por disponibilizar o espaço e os equipamentos do laboratório para a realização dos experimentos.

Aos funcionários do LIM-48, pela disponibilidade e pela ajuda no manuseio dos equipamentos do laboratório.

À minha banca de qualificação, Dra. Viviane Gimenez, Dra. Gilda Montenegro e Dr. José Angelo, por todas as observações e pelos apontamentos feitos para a melhoria deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
LISTA DE FIGURAS
RESUMO
ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO 10
1.1 Dermatofitoses 1
1.2 Invasão do dermatófito 3
1.3 Receptores de Reconhecimento Padrão – PRR 5
1.4 Neutrófilos 8
1.5 NET – *neutrophil extracellular traps* 10
1.6 Fatores de virulência de patógenos que interferem nas atividades das NET 14
1.7 As NET em infecções fúngicas 15
2. JUSTIFICATIVA 19
3. OBJETIVOS 21
4. MATERIAIS E MÉTODOS 21
4.1 Cultivo do *Tricophyton rubrum* 21
4.2 Preparo dos conídios 21
4.3 Grupo avaliado 22
4.4 Separação das células PMN (neutrófilos) 22
4.5 Fagocitose 23
4.6 Formação das NET 24
4.7 Quantificação de IL-6, IL-1β, IL-10 e TNF-α 24
4.8 Ensaio de quimioluminescência – produção de ROS 25
4.9 Quantificação das NET – Complexo MPO-DNA 25
4.10 Análise estatística 26
5. RESULTADOS 27
6. DISCUSSÃO 28
7. CONCLUSÃO 29
8. REFERÊNCIAS 30

LISTA DE ABREVIATURAS

µL: Microlitros
µg: Micrograma
µM: Micromolar
adsA: Adenosina sintase A
AIM2 (ausente no melanoma 2)
CARD9: *Caspase Recruitment Domain Family Member 9*
CD: Células dendríticas
CLR: Receptor de lectina do tipo C
dAdo: Deoxiadenosina
DCG: Doença granulomatosa crônica
DNA: Ácido desoxirribonucleico
GAS: *Streptococcus* Grupo A
GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
hBD-2: beta defensina-2
HMGB1: *Hight mobility group protein* 1
IL: Interleucina
INF-ɣ: *interferon gamma*
KOH: Hidróxido de potássio
LPS: Lipopolissacarídeo
Mincle: *The macrophage-inducible C-type ectin*
MPO: Mieoperoxidase
MR: receptor de manose
MyD88: *Myeloid differentiation primary response 88*
NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina)
NE: *Neutrophil elastase*
NET: N*eutrophil extracellular traps*
ng: Nanogramas
nm: nanômetro
NOD: (domínio de ligação a nucleotídeos
PAM: Peptídeos Antimicrobianos
PAMP: Padrão molecular associado ao patógeno
PBMC: Células mononucleares do sangue periférico
PBS: *Phosphate-Buffered Saline*
pg: Picogramas
pH: Potência hidrogeniônico
PKC: Proteína quinase-C
PMA: P*horbol myristate acetate*
PMN: Célula poimorfonuclear
PR3: Proteinase
PRR: Receptor de reconhecimento padrão
RIG-I (receptor de reconhecimento de padrão citosólico
ROS: *reactive Oxygen Species*
RPMI: *Roswell Park Memorial Institut*
SFB: Soro fetal bovino
TDM (*trehalose-dimycolate*)
TIR: Receptor *Toll*-Interleucina-1

TLR: Receptor do tipo *Toll*ll (TLR
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Adesão do dermatófito na epiderme:. 5
Figura 2 - NETose suicida e NETose vital:. 14
Figura 3: Neutrófilos com os receptores de mincle, dectina-1 ou manose bloqueados exibem redução na fagocitose. .....**Error! Bookmark not defined.**
Figura 4: A viabilidade do fungo fagocitado é diminuída quando o receptor manose é bloqueado. .....**Error! Bookmark not defined.**
Figura 5: Burst oxidativo em neutrófilos de indivíduos sadios incubados com T. rubrum ou PMA. .....**Error! Bookmark not defined.**
Figura 6: A secreção da citocina IL-1β é prejudicada pelo bloqueio dos receptores de dectina-1, manose ou mincle nos neutrófilos na presença de *T. rubrum.*.**Error! Bookmark not defined.**
Figura 7: A secreção da citocina IL-6 não é alterada pelo bloqueio dos receptores de dectina-1, manose ou mincle nos neutrófilos na presença de *T. rubrum*..**Error! Bookmark not defined.**
Figura 8: Os conídios de *T. rubrum* foram capazes de induzir produção da citocina TNF-α bem como as células estimuladas com C. albicans. .....**Error! Bookmark not defined.**
Figura 9: Quantificação da citocina IL-10.....**Error! Bookmark not defined.**
Figura 10: Complexo MPO-DNA mensurado a partir do sobrenadante de culturas das NET.**Error! Bookmark not defined.**
Figura 11: *T. rubrum* nas formas de conídio e hifa induz a formação de NET por neutrófilos..**Error! Bookmark not defined.**

RESUMO

Jesus TM. Participação dos receptores de lectinas do tipo C e do tipo *Toll* expressos nos neutrófilos no reconhecimento do *Trichophyton rubrum* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

As dermatofitoses são infecções superficiais causadas por fungos queratinofílicos que afetam cerca de 20-25% da população mundial. O *Trichophyton rubrum* é o agente etiológico mais comum, responsável por cerca de 60-80% dos casos. Esse tipo de infecção é restrito à camada córnea da pele, porém, o grau de invasão do dermatófito pode mudar, de leve para grave, de acordo com a espécie e a virulência do fungo, como também do estado imunológico do hospedeiro. O papel dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) expressos nos fagócitos, como os neutrófilos, é crucial no reconhecimento de estruturas fúngicas com consequente ativação da resposta imune inata. Ainda, há poucos estudos que abordam o papel dos PRR expressos em neutrófilos durante a fase inicial da infecção por dermatófitos. Esses fagócitos reconhecem padrões moleculares presentes na superfície do fungo, como a manana e a β-glucana, através dos PRR, e este reconhecimento inicial é essencial para modular uma resposta efetiva contra o patógeno. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o foco infeccioso, sendo que indivíduos com neutropenia estão predispostos a infecções fúngicas graves. Recentemente, foi descoberto que essas células são capazes de formar armadilhas extracelulares (NET) que podem destruir fungos como: *Candida albicans* e *Paracoccidioides brasiliensis*, entre outros. Sendo assim, neste estudo, mostramos que o bloqueio dos receptores mincle, dectina-1 ou manose, expressos nos neutrófilos, tem papel significativo no reconhecimento dos conídios de *T. rubrum* e na produção da citocina inflamatória IL-1-β. Os conídios de *T. rubrum* também foram capazes de induzir a formação das NET pelos neutrófilos.

Descritores: Receptores de lectina do tipo C. Dermatofitose. Imunidade inata. Neutrófilos. Trichophyton rubrum. Dermatófitos.

ABSTRACT

Jesus TM The role of C-type lectin and toll-like receptors expressed in neutrophils in the recognition of trichophyton rubrum [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Dermatophytosis are superficial infections caused by keratinophilic fungi that affect about 20-25% of the world's population. Trichophyton rubrum is the most common etiological agent, it’s responsible for about 60-80% of cases. This type of infection is restricted to the corneal layer of the skin, however, the degree of invasion of the dermatophyte can change, from mild to severe, according to the species and virulence of the fungus, as well as the immune state of the host. The role of pattern recognition receptors (PRR) expressed in phagocytes, such as neutrophils, is crucial in the recognition of fungal structures with consequent activation of the innate immune response. There are still few studies addressing the role of PRR expressed in neutrophils during the initial phase of dermatophyte infection. These phagocytes recognize molecular patterns present on the surface of the fungus, such as manana and β-glucan, through PRR, and this initial recognition is essential to modulate an effective response against the pathogen. Neutrophils are the first cells to migrate to the infectious focus and individuals with neutropenia are predisposed to severe fungal infections. Recently, it has been discovered that these cells can form extracellular traps (NET) that can destroy fungi such as: Candida albicans and Paracoccidioides brasiliensis, among others. Thus, in this study, we demonstrated that the blockade of mincle receptors, dectitin-1 or mannose, expressed in neutrophils, plays a significant role in the recognition of T. rubrum conidia and in the production of inflammatory cytokine IL-1-β. The conidia of T. rubrum were also able to induce the formation of NET by neutrophils.

Descriptors: Lectins C-type. Dermatophytosis. Immunity, innate. Neutrophils. Trichophyton rubrum. Dermatophytes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dermatofitoses

As dermatofitoses, também conhecida como *tineas*, são infecções fúngicas superficiais de tecidos queratinizados, causadas por fungos filamentosos queratinofílicos chamados de dermatófitos (1). Esse tipo de infecção acomete os pelos, as unhas e os cabelos de humanos e animais, por ser restrita à camada cornificada da pele, pois o fungo não possui capacidade de invadir tecidos mais profundos em indivíduos imunocompetentes (2). As dermatomicoses afetam cerca de 20-25% da população mundial, sendo 3-4% dos casos dermatológicos causados por dermatófitos (3,4).

São conhecidas aproximadamente 40 espécies diferentes de fungos com capacidade de digerir queratina (5), divididas em 3 gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton spp.* O *Trichophyton rubrum* é o agente mais comum na dermatofitose e na onicomicose (6), responsável por 50 a 90% dos casos. De acordo com suas características ecológicas, os fungos são classificados em geofílicos, aqueles encontrados no solo; antropofílicos, os que causam infecções em humanos; e os zoofílicos, que colonizam a pele de animais (7). O grupo de dermatófitos zoofílicos acomete 30% das *tineas* humanas, provocando inflamação aguda. Os antropofílicos estão envolvidos em 70% das infecções, sendo estas crônicas e de progressão lenta, nas quais há a adaptação do fungo no sítio de infecção e resposta do hospedeiro (8). Os geofílicos, comuns no solo, podem infectar esporadicamente os humanos; nesses casos, a infecção pode variar no grau de inflamação.

Os fungos que causam as dermatofitoses são encontrados na região dos trópicos, onde o clima é quente e úmido, principalmente nas temperaturas entre 25 e 28ºC, possibilitando condições favoráveis para seu crescimento e sua viabilidade. De acordo com essa classificação, o *T. rubrum* é considerado um fungo antropofílico (5).

A infecção causada por dermatófitos é denominada e tratada de acordo com a área em que se instala. Os termos usados para a identificação são em latim, começando pela palavra “tinea”, seguida da área do corpo acometida, como: *Tinea pedis*, *Tinea capitis*, *Tinea unguium*, *Tinea manuum* e *Tinea* corporis (2). Sua

transmissão ocorre de pessoa para pessoa, através de materiais compartilhados ou pelo contato com animais e solo infectado (6). A infecção superficial por fungos pode se manifestar com o uso habitual de calçados fechados ou em função de imunossupressão, diabetes mellitus e obesidade, além de uso de piscinas, suor excessivo e idade avançada (5,9). Em pacientes imunocompetentes, a infecção é restrita à camada córnea da pele, porém, alguns fatores podem mudar o grau da invasão dos dermatófitos, de leve para grave, de acordo com a espécie dos dermatófitos, a virulência da cepa e os produtos metabólicos secretados pela espécie (2), além do estado imunológico do hospedeiro e do sítio de infecção (10).

A variabilidade e a gravidade da dermatofitose em indivíduos com AIDS são comuns, podendo ocorrer em qualquer fase dessa doença imunossupressora (11). Por se tratar de uma infecção superficial, quando o fungo invade a derme, ela é chamada de “tinea profunda” ou “dermatofitose profunda”. Considerando que a pessoa não seja imunossuprimida, para a infecção ocorrer, há a possibilidade de o indivíduo ter um polimorfismo genético como, por exemplo, a deficiência na molécula CARD9 (*Caspase Recruitment Domain Family Member 9*) – molécula necessária para modular uma resposta antifúngica efetiva (12).

No geral, a área afetada possui uma lesão circular avermelhada, com a borda elevada. Com a progressão da infecção, esta área torna-se anular (13). Pode ocorrer descamação da lesão e formação de crosta, vesículas e pápulas na parte em que não há pelos (14); no caso de *tinea capitis*, há a formação de alopécias no couro cabeludo e descamação contínua neste sítio (15). A onicomicose, infecção que acomete principalmente as unhas, se difere um pouco das demais, pois há formação de um macerado de pele branca, com erupções vermelhas e úmidas, que pode se estender aos dedos e à fáscia plantar dos pés (16).

O diagnóstico para infecções fúngicas superficiais requer a identificação de padrões na lesão, como vermelhidão, elevação e descamação das bordas da lesão. A identificação de conídios e hifas do patógeno em questão é feita por exames como a microscopia direta (6). O preparo do material para leitura é feito através de uma solução na concentração de 10 a 30% de KOH (hidróxido de potássio) (2). Outra forma de diagnóstico de infecção por dermatófitos é a confirmação do patógeno em cultivo laboratorial. O isolamento do fungo obtido nas amostras clínicas é feito em

ágar de dextrose ou Saboraud, com a utilização de suplementos como antibióticos ou não (17).

O tratamento é realizado com drogas antifúngicas. As mais comuns no Brasil são griseofulvina, terbinafina, itraconazol e fluconazol. As formas de uso dessas drogas são em creme, xampu, comprimidos e esmalte de unhas (no caso de onicomicose). Cada droga possui diferentes formas de ação durante seu uso no combate à micose. Por exemplo: a griseofulvina, antifúngico extraído do *Penicillium griseofulvum*, inibe a síntese da parede celular da hifa: interferindo na síntese de ácido nucleico e no processo de mitose; a terbinafina atua inibindo a enzima esqualeno epoxidase no citoplasma da membrana do fungo, dificultando a conversão e a produção do ergosterol, causando um dano estrutural e funcional no processo de crescimento fúngico (18).

1.2 Invasão do dermatófito

A queratina está presente na pele, no cabelo, nas unhas, nos cascos e possui o papel de revestir e proteger. A invasão de um fungo queratinofílico pode ser dividida em dois eventos: a colonização do dermatófito na pele e a infecção. Dentre os mecanismos de defesa estão as barreiras físicas (6) e químicas na pele, como ácidos graxos, enzimas, pH ácido e peptídeos antimicrobianos (8). A epiderme é uma barreira física, sendo composta, em sua maioria, por queratinócitos. Os queratinócitos medeiam a resposta imune na presença de micro-organismos invasores. A IL-8 e o TNF-α são exemplos de produtos secretados pelos queratinócitos num combate fúngico (19). Os dermatófitos, quando cultivados em meio na presença de queratina, fazem a digestão dessa proteína, utilizando-a como fonte de carbono e nitrogênio para seu crescimento (20).

Os dermatófitos conseguem induzir, nos queratinócitos, um perfil específico de expressão de citocinas, de acordo com a espécie presente na infecção. Outra forma de tentativa de bloqueio do dermatófito, durante sua colonização, seria a renovação do estrato córneo – evento chamado de queratinização. A queratinização é necessária e confere ao patógeno a capacidade de invasão e degradação de

camadas mais profundas da pele, tornando a infecção mais exacerbada, assim, ativando a resposta imune inflamatória (8). Mesmo com o mecanismo da queratinização, os dermatófitos conseguem secretar fungolisinas, comumente conhecidas por queratinases, que são proteases destinadas a digerir a queratina e avançar com a penetração do fungo no estrato córneo; algumas dessas proteases são: serina-subtilisinas e metalo-endoproteases (21). Escapando dessa barreira inata do hospedeiro, o artroconídio (forma infecciosa) adere ao tecido queratinizado, prosseguindo com sua germinação e tomando o tecido (4, 21).

Catelecidinas e defensinas são peptídeos antimicrobianos (PAM) com papel fundamental na defesa imune. Elas pertencem à primeira linha de defesa contra diversos micro-organismos e são produzidas por queratinócitos durante uma desordem inflamatória, como a psoríase. Em infecções acometidas por dermatófitos, é comum encontrar atividade dos PAM, como a LL-37 (catelecidina), que se apresentam ativas quando a pele é estimulada por *M. furfur*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (22). A beta defensina-2 (hBD-2) também é um tipo de PAM produzida por queratinócitos e encontrada nas infecções causadas por *M. furfur*, *Candida albicans* e dermatófitos. A produção dos PAM pela epiderme tem como objetivo defender o hospedeiro contra bactérias, vírus e fungos (23).

Em modelos experimentais, foi demonstrado que a adesão dos conídios fúngicos de *Trichophyton spp.* ocorre em aproximadamente 3-4 horas, após o contato com o estrato córneo do hospedeiro. Em 24 horas, tem-se a germinação dos conídios. Após 3 dias, as hifas colonizam a epiderme do hospedeiro (8, 24,25). Com o estímulo fúngico, os queratinócitos produzem peptídeos antimicrobianos, com a finalidade de promover inflamação local. Esse modelo é demonstrado na Figura 1.

Figura 1: Adesão do dermatófito ao estrato córneo do hospedeiro.

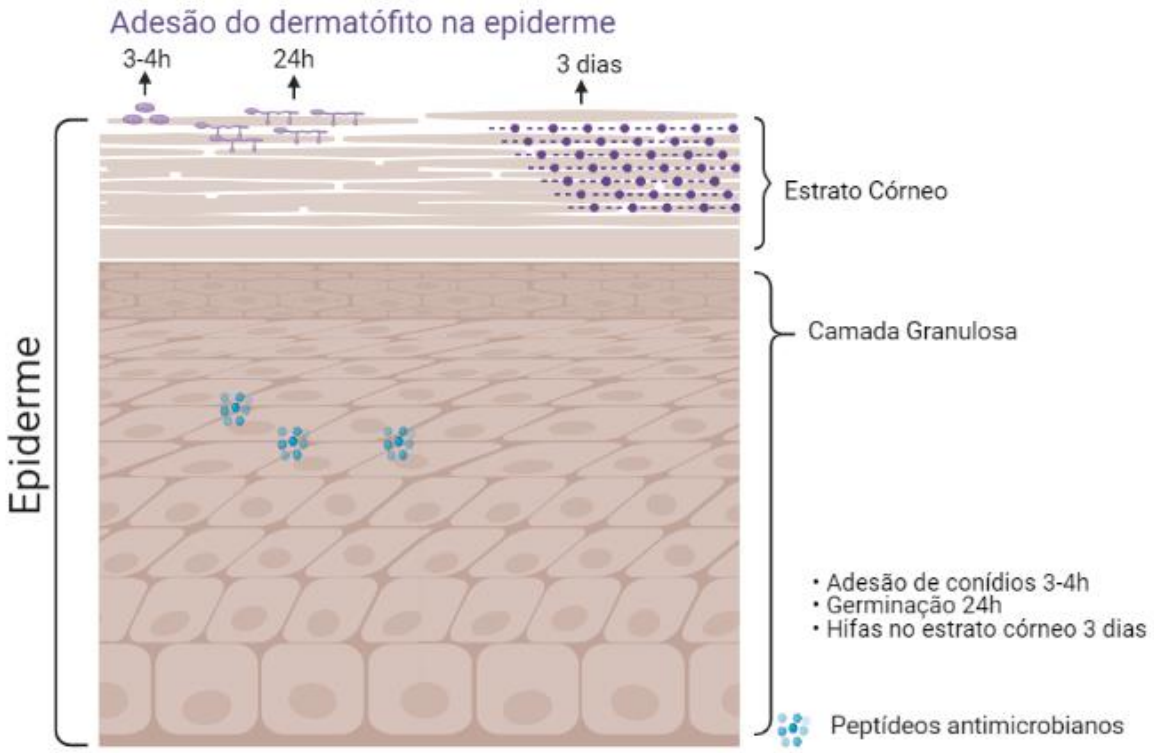


Figura 1: Adesão do dermatófito na epiderme: após o contato dos conídios fúngicos de *Trichophyton spp. com a pele do hospedeiro, a adesão ocorre em aproximadamente 3-4 horas. Em 24 horas, tem-se a germinação dos conídios. As hifas colonizam a epiderme após 3 dias. Com o estímulo fúngico, os queratinócitos produzem os peptídeos antimicrobianos, gerando inflamação no sítio de acometimento.*

Fonte: próprio autor.

1.3 Receptores de Reconhecimento Padrão – PRR

A resposta imune inata trabalha com o reconhecimento de moléculas de assinatura presentes na estrutura celular do fungo, chamadas de PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*), como complexos de polissacarídeos, glicolipídios, lipoproteínas, nucleotídeos e ácidos nucleicos. Os PRR (*pattern-recognition receptors*) são moléculas que reconhecem os PAMP e se encontram disponíveis em células imunes do hospedeiro, como as células dendríticas (CD), os neutrófilos, os macrófagos (38) e os queratinócitos (26).

Os PRR podem ser classificados em uma das cinco famílias seguintes: receptores do tipo Toll (TLR), presentes na superfície da célula e no compartimento endossômico; receptores CLR (receptores de Lectina do tipo C), como dectina-1, 2 e

manose, encontradas na superfície da célula; receptores tipo NOD (domínio de ligação a nucleotídeos), presentes no citoplasma, no plasma e na membrana endossômica associada; receptores do tipo RIG-I (receptor de reconhecimento de padrão citosólico), encontrados no citoplasma celular; e receptores AIM2 (ausente no melanoma 2), presentes no citoplasma e no núcleo (27).

Os receptores CLR são apontados como a família mais importante para o reconhecimento de fungos e têm papel crítico na resposta imune. Os receptores mincle e dectina-1 e 2 são considerados os principais envolvidos na resposta fúngica (28), pois conseguem modular respostas TH1 e TH17 – ambas determinantes nesse tipo de infecção (29). A dectina-1 reconhece a β-glucana e os polissacarídeos presentes na parede celular de fungos. Este CLR é altamente expresso em células como macrófagos e monócitos e na lâmina própria intestinal (30). A dectina-2 reconhece estruturas de manose presentes na superfície de uma variedade de micro-organismos, como a α-manana presente em *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* (31). O mincle reconhece a α-manana, a TDM (*trehalose-dimycolate*) e a ribonucleoproteína nuclear SAP130 (32). Esses três receptores podem sinalizar via dependente de Syk e CARD9 para ativar uma resposta imune antifúngica.

É conhecido que indivíduos com deficiência genética na proteína adaptadora CARD9 são suscetíveis a infecções fúngicas, ao passo que, no combate a bactérias, vírus e parasitas, a imunidade trabalha normalmente (33). Com a deficiência da CARD9, a produção de citocinas pró-inflamatórias específicas na resposta antifúngica fica prejudicada (IL-6 e TNF-α) (28), o que inibe uma resposta efetiva via TH17 – deixando o hospedeiro suscetível à candidíase mucocutânea, por exemplo.

Os CRL trabalham em conjunto com os receptores *Toll-like* (TLR) para produzir resposta fúngica efetiva (29). Como dito anteriormente, a dectina-1 reconhece estruturas presentes na célula do fungo, como as β-glucanas (34). O *zymosan* é um produto da célula de *Saccharomyces cerevisiae*, composto basicamente por β-glucanas, mananas e manoproteínas (35), sendo muito utilizado em experimentos com a finalidade de promover a mesma resposta e atividade dos PRR *in vitro*, induzindo a fagocitose, o *burst* respiratório oxidativo e a produção de citocinas e quimiocinas, como IL-10, IL-6 e IL-23 via Syk quinase.

A dectina-1 também consegue agir concomitantemente via MyD88 com o TLR2, promovendo produção de TNF (36), e consegue amplificar a resposta fúngica Th17 mediada pelo receptor de manose (MR) e a produção de IL-17 contra uma infecção por *C. albicans*. A dectina-1 também pode promover a ativação de NF-κB e, consequentemente, mediar a resposta imune antifúngica TH1/TH17 (30). A dectina-2 é um receptor extracelular que tem afinidade para se ligar às hifas de *Candida albicans*, *Microsporum audouinii* e *Trichophyton rubrum* (37). A sinalização intracelular acontece por meio do reconhecimento da porção FcR-ITAM que regulará a produção de TNF-α (30).

Os receptores do tipo *Toll-like* também reconhecem padrões moleculares conservados nas estruturas de patógenos (PAMP), como, por exemplo, o TLR2, que reconhece estruturas como *zymosan*, ácido lipotetoico e lipoproteínas bacterianas. Esses receptores sinalizam via domínio TIR (38) e estão presentes em várias células, como queratinócitos e células de Langerhans, macrófagos, células T e B e mastócitos. Queratinócitos humanos expressam TLR de 1 a 10, porém, os TLR2 e 4 são os receptores que reconhecem estruturas presentes na parede celular de fungos e ambos são importantes na defesa do hospedeiro contra tal infecção (39). A fagocitose dos conídios de *T. rubrum* aderentes em monócitos é mediada pelo TLR2. Com a neutralização desse receptor, a atividade fungicida dos monócitos e a secreção de TNF-α ficam prejudicadas – como demonstrado por Celestrino *et al.* (2019). O TLR2 se mostrou necessário para a fagocitose dos conídios de *T. rubrum*. A ausência da expressão desse receptor prejudica a resposta inflamatória adequada para este evento (40).

Experimentos com células HaCat, quando estimuladas com conídios de *T. rubrum*, mostraram uma expressão aumentada de TLR2, 4 e dectina-1 mRNA, levando à produção de IL-8, IFN-γ, IL-6 e IL-13 (41). Esses resultados foram obtidos em experimentos *in situ*, com análises de lesões por imuno-histoquímica. A expressão de TLR2 e 4 foi maior em pacientes com *tinea* superficial, quando comparados com os controles (saudáveis) (42). Oliveira *et al.* (2015) demonstraram que a expressão de TLR4 – e não de TLR2 – apresentou-se diminuída na lesão de pacientes com dermatofitose disseminada, indicando um possível mecanismo para a cronicidade dessa doença.

O *T. rubrum* pode ser eliminado através da fagocitose feita por neutrófilos, macrófagos e monócitos, junto com produtos liberados por essas células, quando estimuladas, como citocinas TNF-α e espécies reativas de oxigênio (ROS) (43,44). Sousa *et al.* (2015) demonstraram que neutrófilos e macrófagos de pacientes com dermatofitose crônica apresentaram defeito na função fagocítica, na secreção de espécies reativas de oxigênio e na secreção de citocinas, como TNF-α, IL-1β.

Ainda não se sabe ao certo como a imunidade adaptativa trabalha na eliminação da dermatofitose. Estudos apontam que células T CD4, que produzem IFN-γ (TH1), IL-17 (TH17), formam melhor proteção contra este tipo de infecção (45,46). Camundongos com deficiência em IL-17A e IFN-γ, infectados por *A. benhamiae*, apresentaram carga de infecção maior e pouca recuperação. Outro dado importante é que essas citocinas, trabalhando individualmente, não surtem o mesmo efeito – de combate ao patógeno – observado quando o trabalho é concomitante (47).

Nakamura *et al*. (2007) investigaram as condições que induziriam perfis TH1-dominante e TH2-dominante em camundongos (C57BL/6 e BALB/c), utilizando antígenos de *Trichophyton*. Os linfonodos regionais estimulados com o antígeno induziram alta expressão de IL-17A e IFN-γ em camundongos C57BL/6 (TH1-dominante); esse dado sugere que tanto o polo TH1 responde para esse estímulo, quanto o polo TH17. Em camundongos de linhagem BALB/c (TH2-dominante), houve a produção e o aumento de IL-4 nos linfonodos regionais. Esses achados mostram a importância da indução dos perfis Th1 e TH17 no combate à infecção dermatofítica (48).

1.4 Neutrófilos

Macrófagos e células polimorfonucleares (PMN), como os neutrófilos, são os principais fagócitos envolvidos na ingestão e na destruição de fungos. Em particular, os neutrófilos são encontrados na circulação sanguínea em maior número e chegam mais rápido ao foco da infecção, se comparados com outras células leucocitárias. Numa inflamação aguda, os neutrófilos vão até o local da injúria em resposta a fatores quimiotáticos liberados por patógenos ou por células hospedeiras (49,50).

A importância dos neutrófilos no combate de infecções fúngicas é amplamente reconhecida, pois pacientes com quadro de neutropenia estão sujeitos a contrair infecções fúngicas severas, com elevados índices de mortalidade – e casos assim são associados a indivíduos de baixa renda. Essas células possuem o núcleo lobulado e, por isso, são chamadas de células polimorfonucleares. Outra característica dessas células é a presença abundante de grânulos em seu citoplasma – os quais foram descritos por Paul Erlich no final do século XIX (51,52).

Os neutrófilos possuem três tipos de grânulos diferentes: o azurofílico, que é o grânulo primário, contendo hidrolase ácida; o grânulo específico é o secundário; e a gelatinase (grânulo terciário), que possui antimicrobianos, como as enzimas degradantes, e são importantes para a locomoção dos neutrófilos no tecido (53). Essas células ativam seus grânulos pela via dos PRR (35) e utilizam sinais quimiotáticos, como quimiocinas, citocinas e produtos de patógenos, para chegar até o local com infecção (54). A selectina presente em neutrófilos atua no processo de sua adesão à parede endotelial do vaso sanguíneo, tornando possível o rolamento do neutrófilo até o sítio infectado (55).

Quando ativados, os neutrófilos dispõem de estratégias para atacar o micro-organismo invasor. Essas estratégias são: a capacidade de fagocitar, a degranulação e a formação de armadilhas extracelulares (descritas pela primeira vez em 2004) (50). Na fagocitose, os neutrófilos têm a capacidade de reconhecer e fagocitar micro-organismos, os quais ficam aprisionados em seus fagossomos e, posteriormente, se fundem com seus grânulos, formando o fagolisossoma. Esse processo ocorre com o consumo de muito oxigênio (não mitocondrial), denominado por *burst* respiratório (53).

O neutrófilo pode utilizar mecanismos de oxigênio dependente e independente. O processo que utiliza os grânulos para aniquilar o micro-organismo é chamado de mecanismo de oxigênio independente. Porém, quando há a participação da enzima NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) oxidase, o processo é chamado de oxigênio dependente, pois são gerados altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em neutrófilos ativados. O complexo enzimático de NADPH oxidase lança elétrons através da membrana fagossomal para o oxigênio molecular, transformando-o em um superânion, que é rapidamente convertido em peróxido de

hidrogênio, pela enzima superóxido dimutase; o peróxido de hidrogênio e outro oxigênio derivativo secundário, como ácido hipocloroso e cloraminas (56), gerados pelo complexo de mieloperoxidase (MPO) (57), formam um potente sistema antimicrobiano (58).

Os grânulos contidos dentro do neutrófilo, além de terem papel de potente antimicrobianos, de proteases e de participação na produção do *burst* respiratório, também possuem ampla gama de receptores ligados à membrana e que participam na adesão endotelial, no reconhecimento de produtos bacterianos e como mediadores solúveis da inflamação. É a partir dessas organelas citoplasmáticas que o neutrófilo passivo circulante passa a ser uma célula efetora na imunidade inata (59). Os grânulos dos neutrófilos, como a mieloperoxidase, a metaloproteinase matricial, a elastase e a lactoferrina, são potentes grânulos citotóxicos regulados rigorosamente e liberados conforme a necessidade da infecção, evitando quantidade excessiva de conteúdo tóxico no tecido (60). Além da degranulação, da fagocitose, da produção de ROS e da produção de citocinas, o neutrófilo ativado por patógenos expulsa sua cromatina extracelularmente para a indução das *neutrophil extracellular traps (*NET) (49).

1.5 NET – *neutrophil extracellular traps*

Reportada pela primeira vez em 2004, por Brinkmann *et al.*, outra via utilizada pelos neutrófilos, para a eliminação de patógenos, é conhecida como mecanismo das NET. Envolve a descondensação da cromatina, junto com a desmontagem do envelope nuclear do neutrófilo (49), e o lançamento extracelular de proteínas presentes no citoplasma e de DNA nuclear do neutrófilo (50). Esse comportamento atípico dos neutrófilos foi relatado em 1996, quando pesquisadores estimularam essa célula com PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetato)* (61), potente indutor de NET) (62) e constataram algumas mudanças, que não foram observadas no processo de apoptose ou necrose dos neutrófilos. Por exemplo: a condensação da cromatina, que é comum na apoptose, não ocorreu, se tornando descompactada (61).

As NET são produzidas pelos neutrófilos em contato com vírus, bactérias, fungos, protozoários (50), PMA, IL-8, INF-ɣ, GM-CSF (*Granulocyte-macrophage*

colony-stimulating factor) e LPS (lipopolissacarídeo). Essas armadilhas extracelulares têm a capacidade de matar micro-organismos e são produzidas por eosinófilos, mastócitos, plantas, granulócitos presentes em invertebrados inferiores (62) e plaquetas (63), além do neutrófilo (52,64).

As NET ocorrem principalmente pelo processo de morte celular, chamado de NETose (65), que é diferente da apoptose e da necrose. Na **necrose**, há a desintegração da membrana e das organelas, a exposição da fosfatidilserina durante as etapas iniciais da necrose, inchaço e ruptura celular, levando a liberação do conteúdo intracelular. Para que a **apoptose** ocorra, formam-se prolongamentos da membrana celular (bolhas), há exposição da fosfatidilserina e condensação da cromatina nuclear, sem a desintegração da membrana nuclear, finalizando este processo com a morte celular programada. No processo de **NETose**, há vacuolização sem exposição de fosfatidilserina, descondensação da cromatina nuclear, com desintegração da membrana nuclear e morte celular programada (64).

As NET são compostas por filamentos suaves de aproximadamente 17nm, sendo cravejadas por domínios globulares de proteínas granulares de aproximadamente 50nm (52), formadas pelo DNA (ácido desoxirribonucleico) e pelas histonas H1, H2, H3 e H4. As fibras de DNA contêm diversas proteínas, como NE (*Neutrophil elastase*), mieloperoxidase (MPO), catepsina G, proteinase 3 (PR3), proteína nuclear HMGB1 (*hight mobility group protein* 1) e LL37 (66).

Apesar de os grânulos estarem presentes na formação dessa rede, as NET não têm como papel principal causar atividade antimicrobiana, e sim, conferir proteção e neutralização do patógeno (67). As estruturas das NET são mantidas pelo DNA, pois são degradadas por DNAse e não por proteinase (68). Existe a possibilidade de que, além do DNA cromossômico, o DNA mitocondrial poderia induzir as armadilhas extracelulares em eosinófilos e neutrófilos, sem a indução de morte celular; porém, esse mecanismo ainda precisa ser refinado (64).

Para a formação das NET, o neutrófilo ativado deve passar por eventos traumáticos. Minutos após a ativação, essas células se prendem ao substrato. Na próxima hora, perdem seus lóbulos e descondensam a cromatina. As membranas nucleares externas e internas se soltam umas das outras e os grânulos se

desintegram. Depois de 1 hora, o envelope nuclear se desfaz, com a união do nucleoplasma e do citoplasma (52). As redes saem da célula à medida que a membrana citoplasmática é rompida. Esse processo depende das ROS e da NADPH oxidase (69).

Durante a fagocitose de bactérias, por neutrófilos, o complexo da NADPH oxidase é ativado e gera ROS, que atua como bactericida. Wilkie R.P. *et al.* (2007) demonstraram, em experimentos com neutrófilos humanos normais e murinos selvagens, que não houve ativação da caspase com estimulação das células por *S. aureus.* Porém, em experimentos nos quais a caspase foi ativada, a enzima NADPH oxidase estava inibida. A caspase é uma enzima que participa da cascata de clivagem proteolítica durante a apoptose, por isso, tem seu papel considerado fundamental nesta via de morte celular (64).

A importância da NADPH oxidase para a formação das NET foi melhor elucidada quando, em experimentos com neutrófilos de indivíduos portadores da doença granulomatosa crônica (DGC), não se conseguiu formar as NET ou obteve-se uma diminuição significativa no *burst* respiratório. A DGC é caracterizada por mutações em uma das subunidades do complexo enzimático da NADPH oxidase (100).

Mesmo com evidências experimentais de que o complexo NADPH oxidase pode ser considerado indispensável para a ativação das NET, alguns trabalhos mostram que esse mecanismo pode ser ativado sem o envolvimento dessa enzima: micro-organismos, como *Staphylococcus aureus* e *Leishmania donovani*, conseguem induzir a formação dessas redes via independente de ROS (64).

A mieloperoxidase (MPO) é outra enzima importante para a produção do ácido clorídrico e na descondensação da cromatina durante a NETose (70). A MPO, em combinação com a NE, descondensa a cromatina independentemente de sua atividade enzimática (65). A inibição da MPO retarda a NETose, o que sugere que sua atividade limitada ainda consegue produzir as NET (70). Cloraminas geradas após a reação de ácido hiplocloroso produzido por MPO, pela reação de *crosslink* de proteínas, aumentam a estabilidade e a integridade das NET em capturar o antígeno.

Essa reação (*crosslink*) pode explicar a maior duração das proteínas das NET em relação ao DNA (seguido por administração de DNAse I, *in vivo*) (65).

Por ser relativamente “novo” para a imunologia, algumas perguntas estão em aberto sobre o mecanismo e sobre os estímulos sofridos pelos neutrófilos, para gerarem as NET. Inicialmente, a compreensão das NEToses se referia ao processo de morte celular na liberação das armadilhas celulares compostas por fatores antimicrobianos do neutrófilo formadas após a descondensação da cromatina. Porém, alguns autores descrevem que, dependendo do estímulo do patógeno, após o lançamento dessas redes, o neutrófilo ainda consegue fagocitar (66,71).

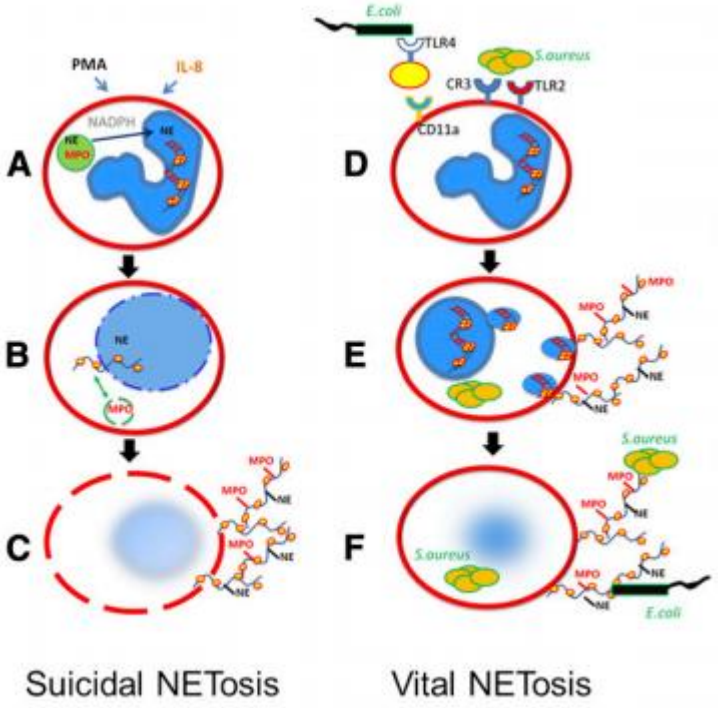
Atualmente, a comunidade científica propõe duas vias para a NETose, sendo elas: NETose suicida e NETose vital. A diferença entre ambas seria o estímulo recebido pelo neutrófilo. Na NETose suicida, o estímulo seria o PMA, enquanto, na NETose vital, seu estímulo estaria relacionado com os PAMP reconhecidos por receptores do tipo *Toll* (72).

Foi demonstrado que os neutrófilos, após a formação das NET, não necessariamente sofrem morte celular, mas podem preservar suas funções de quimiotaxia e fagocitose. Este tipo de NETose seria denominado por NETose vital (72). Estimulados por LPS (lipolissacarídeos), os neutrófilos que sofreram NETose continuaram impermeáveis, na tentativa de coloração por *Sytox green*, indicando que a célula se manteve estruturalmente estável (66).

A NETose suicida é caracterizada pelo estímulo inicial por PMA, um ativador da proteína quinase-C (PKC). Hakkim *et al*. (2010) sugeriram que a via raf-MERK-ERK inibe a apoptose para induzir a NETose, pois essa via induz a expressão de proteínas antiapoptóticas que permitem aos neutrófilos bloquear a apoptose para que a NETose ocorra (8). A enzima NADPH é responsável pela produção de ROS e superóxido, derivado do *burst* respiratório, que irá contribuir na descondensação da cromatina do neutrófilo através da serina e da elastase (73,74,75). A enzima PAD-4 é importante na citrulinação das histonas que induzem a descondensação do DNA. Posteriormente, a mistura desse DNA com os grânulos característicos do neutrófilo sairá da célula, com a formação de rupturas ou “poros” na membrana (72). Essa ruptura da membrana definirá a forma de NETose suicida; este mesmo evento –

ruptura de membrana – é observado tanto em células vermelhas, quanto em leucócitos quando estimulados por *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*, que produzem proteínas hemolíticas e leucocitárias capazes de causar rupturas em tais células. É através desses poros na membrana celular que as armadilhas são expostas extracelularmente; com isso, o neutrófilo também perde suas funcionalidades características, como a capacidade fagocítica, o recrutamento de leucócitos e a quimiotaxia (75).

Figura 2 - NETose suicida e NETose vital: NETose suicida estimulada com PMA, com perfuração da membrana no final do processo, e NETose vital reconhecendo PAMP, pelo receptor do tipo *Toll*, com a membrana intacta após NETose (Yipp and Kubbes. 2013).



1.6 Fatores de virulência de patógenos que interferem nas atividades das NET

As NET são compostas por DNA e histonas, presentes nas armadilhas extracelulares quando lançadas contra o micro-organismo (76). O GAS

(*Streptococcus* Grupo A) possui DNAse (Sda1) e está associado com infecções invasivas (fasciite necrosante). Buchanan *et al.* (2006) relacionaram a presença dessa DNAse como um fator de virulência – o que explicaria a resistência dessa bactéria frente às armadilhas extracelulares. A Sda1 consegue degradar as NET, facilitando o escape das armadilhas por este grupo específico de *Streptococcus*. Todas as bactérias pertencentes ao GAS expressam um ou dois tipos de gene de DNAse (77).

Em infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, são observados abcessos compostos por essas bactérias, por fibrina e por células imunes do hospedeiro. Posteriormente, tem-se a infiltração de neutrófilos que lançam armadilhas para tentar conter essa infecção (NETose). Thammavongsa *et al.* (2013), em seu modelo experimental, constataram que o *S. aureus* consegue converter as NET em deoxiadenosina (dAdo), pois estas bactérias secretam as enzimas adenosina sintase A (adsA) e nuclease. Outro fator que implica na virulência desta bactéria está relacionado com o fato de a produção de deoxiadenosina induzir a apoptose de macrófagos ativados via caspase 3 (78). Com este mecanismo, o *S. aureus* escapa das armadilhas extracelulares e, também, evita sua fagocitose por macrófagos (76).

1.7 As NET em infecções fúngicas

Desde 2004, quando Brinkmann e colaboradores apresentaram uma nova especificidade dos neutrófilos – a de aprisionar patógenos, em particular bactérias Gram positivas e Gram negativas, com sua rede de fibras formadas por grânulos de proteínas e cromatina –, a comunidade científica começou a desenvolver trabalhos para estudar mais a fundo esta nova artilharia (79).

Os neutrófilos possuem papel importante nas infecções fúngicas. A capacidade de tais células fagocitarem e se mostrarem disponíveis em grande número, para conter o crescimento de diversos patógenos, vem sendo apresentada por diversos trabalhos – inclusive em experimentos envolvendo *Candida* spp. e *Aspergillus* spp (80). As NET também estão envolvidas em infecções fúngicas, como as ceratites (infecção fúngica na córnea ocular). Em um estudo com 14 pacientes, as NET foram

encontradas em todos os raspados oculares junto com hifas (culturas das lesões oculares mostraram presença de *Aspergillus* spp., *Candida* spp. e *Fusarium* spp.). Mostrando-se importantes durante todo o processo infeccioso, as armadilhas extracelulares foram observadas em diferentes estágios, do dia 2 ao dia 22 pós-infecção, demonstrando que a NETose pode ter papel crucial na resposta contra a ceratite (81).

Urban *et al.* (2006) demonstraram que as NET induzidas por *Candida albicans* conseguiram capturar e matar o fungo, tanto na forma de hifas como de leveduras. O estudo sugeriu que os neutrófilos são incapazes de matar este fungo, por conta de seu tamanho, e não conseguem fagocitá-lo. Já as NET conseguem capturá-lo na formação das redes (82). *In vitro*, foi constatado que os neutrófilos, em contato com *Aspergillus fumigatus*, desenvolvem as NET para o aprisionamento do fungo, mas não o suficiente para causar a morte dele. Nesse modelo, houve o processo de NETose contra as hifas de *A. fumigatus*, porém, esse processo foi reduzido com a participação de conídios. A hydrophobina RodA, presente na parede celular do *Aspergillus fumigatus*, é apontada como um componente capaz de deixar o conídio "inerte", sem causar respostas ao sistema imune adaptativo. O estudo sugere que a RodA pode ser responsável por suprimir a formação das NET nesse tipo de estímulo (83).

A enzima NADPH, além de ser importante para a geração de ROS, também participa na liberação do DNA durante a formação das armadilhas extracelulares dos neutrófilos. A descondensação da cromatina ocorre através da proteína PAD4, durante a citrulinação da histona. A NADPH facilita o processo de ativação da PAD4 e da NE estimulado pela MPO. Foi avaliado, por Wu *et al.* (2019), como a inibição da NADPH interferiu na capacidade de o neutrófilo promover NETose, contribuindo para a disseminação de *C. albicans* na infecção peritoneal em camundongos. O grupo também avaliou a dectina-2. Na ausência desse receptor, percebeu-se a redução na formação das NET, aumentando a propagação de *C. albicans* (84).

Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* induziram a formação de NET em lesões tegumentares de pacientes. Elas, inclusive, participaram no processo inicial da formação das NET, através da translocação do DNA nuclear, com o auxílio da elastase, para o núcleo que atuou com as histonas no processo de descondensação

da cromatina. *In vitro*, as cepas Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis* induziram armadilhas, mas com um perfil diferente do padrão das NET. A cepa Pb18 induziu armadilhas extracelulares com uma estrutura “frouxa”, com os elementos dessa rede mais espalhados, comparados com as NET formadas pelo estímulo da cepa Pb265 – que se mostrou mais compacta. O trabalho de Coletta *et al.* (2015) sugere que a presença de duas proteínas no genoma da cepa Pb18 (PADG_11161- Gene ID: 22587058 e PADG_08285- Gene ID: 22586608) possa atuar como uma enzima DNAse, na degradação das NET, da mesma forma descrita por Buchanan *et al*. (2006) no mecanismo de escape utilizado pelo *Streptococcus* Grupo A.

A *Aspergillus fumigatus* induz a formação de NET, na forma de conídios e tubos germinativos. Neutrófilos fagocitam os conídios independentemente das NET, mas utilizam esse mecanismo como armadilhas para aprisionar os tubos germinativos, impedindo seu crescimento e reduzindo a propagação desse fungo (85).

1.8 Participação das interleucinas em infecções

Em qualquer processo infeccioso, é fundamental a participação dos elementos necessários para uma resposta imunológica efetiva; assim, nas dermatofitoses, este processo se inicia com os queratinócitos (primeira linha de defesa) e com a ativação dos receptores do tipo *Toll-like*, como os TLR2, TLR4, TLR6 e as beta-defensina-1 e 2, dos receptores de lectina C, manose, dectina-1 e 2. Estes dois grupos de receptores trabalham reconhecendo a parede fúngica, sinalizando outras células da imunidade inata, como macrófagos e PMN, que promoverão a liberação de citocinas inflamatórias, como as interleucinas IL-1β e IL-8, para conter o fungo (26,92).

A IL-1β é uma citocina inflamatória, pertencente à família IL-1, sendo os membros: IL-1α, IL-1β, IL-1 receptor antagonista (IL-1Ra), IL-18, IL-33 e IL-1F5. A família IL-1 sinaliza através de receptores relacionados; esses receptores contêm domínios extracelulares, sendo: uma porção de domínio de imunoglobulina (IL-1) e outra do receptor *Toll* (formando TIR) na porção citoplasmática. O início da resposta acontece quando a interleucina se liga na subunidade de seu receptor primário do tipo 1; por exemplo: a IL-1 liga-se no receptor IL-1R1. A IL-1α e a IL-1β respondem ao mesmo complexo de receptor e possuem as mesmas habilidades biológicas na resposta imune, contudo, existem algumas diferenças entre ambas; a IL-1β, quando

secretada, circula sistemicamente, enquanto que a IL-1α geralmente é associada à membrana plasmática da célula e age no local (93).

Essas citocinas promovem atividade microbicida das células mieloides – como a indução de fagocitose e produção de citocinas por macrófagos, o recrutamento de neutrófilos e a regulação de ROS – e induzem a liberação de enzimas. Por ter uma resposta potente inflamatória, tais citocinas estão sob rigoroso controle em sua produção; o receptor IL 1-R2 age como regulador na neutralização da resposta das citocinas de IL-1.

Yoshikawa *et al.* (2015) demonstram o papel da IL-1β produzida por macrófagos em resposta ao *T. rubrum*. Este processo é dependente na via clássica de inflamossoma (NLRP3) e a produção de IL-1 se faz necessária para atrasar o desenvolvimento do fungo na forma de hifas e, também, para modular a resposta da IL-17.

A IL-17 atua na regulação do equilíbrio entre o hospedeiro e a microbiota em tecidos de barreira, como, por exemplo, no intestino; a IL-17 é produzida por células T CD4+ em resposta a micro-organismos comensais, prevenindo o crescimento excessivo de micróbios no epitélio intestinal. Um defeito genético raro na via de IL-17, como o apresentado por pacientes portadores da candidíase mucocutânea crônica (CMC), leva à produção reduzida de IL-17 e IL-22 (94).

A IL-6 tem um papel notável na indução de reações na fase aguda. Frequentemente, é induzida junto com as citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1. Por ter sua participação na modulação de reações na fase aguda, ainda não está esclarecido se esta citocina participa ativamente em respostas que provoquem o recrutamento de outras citocinas e infiltração de tecido inflamatório (95). Sabe-se que a IL-6 é uma citocina reguladora da resposta celular durante infecção, sendo, geralmente, considerada uma citocina anti-inflamatória, pois bloqueia a linfopoiese e pode afetar as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias das células T. Pode ter efeito pró-inflamatório e inibir a atividade das células T reguladoras CD4+ e CD25+, ou no papel da diferenciação de linfócito T em células T, produtoras de IL-17, associadas a doenças autoimunes (96).

A IL-10 é uma citocina que regula algumas funções de células mieloides e linfoides. É produzida por linfócitos TH2, macrófagos e células B. Algumas funções da IL-10 são a desregulação da ativação de células T e a produção de interferon-ɣ, além de produção de citocinas pró-inflamatória, como IL-1, TNF-α, IL-5 e quimiocinas. Também inibe a produção de óxido nítrico, suprime a ativação, a proliferação e a função do macrófago. Na aspergilose sistêmica, camundongos com deficiência de IL-10 possuem uma resistência inata à infecção por aspergilose, já os camundongos controles apresentaram maior quantidade de fungo (*A. fumigatus*) no rim e no cérebro e apresentaram também maior grau de dano tecidual – se comparados com os camundongos *knockout* (deficientes em IL-10) (97).

O TNF tem papel importante na defesa do hospedeiro e na regulação da resposta imune – como, por exemplo, em infecções fúngicas por *C. albicans*. O TNF-α é liberado e estimula a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão leucocitária, levando ao recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, fagocitose aumentada e morte de fungos por essas células (98). Louie A. *et al.* (1994) demonstraram em camundongos que a falta da produção de TNF-α levou ao crescimento de *C. Albicans* nos rins e no baço dos animais, acelerando a sua morte após a infecção (99).

Neutrófilos, quando estimulados por conídios de *Trichophyton rubrum*, induzem a formação de NET, *in vitro*, sugerindo que essas armadilhas possuem papel importante na resposta imune do hospedeiro. Pouco se tem publicado mostrando as vias de interação entre o *T. rubrum* e as NET. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo explorar a formação das NET desafiadas por *T. rubrum*, bem como a geração de ROS presente neste processo, além de estudar o reconhecimento dos receptores de lectina C.

2. JUSTIFICATIVA

As dermatofitoses são infecções que acometem de 20 a 25% da população mundial (44); entretanto, pouco se sabe sobre a ação da imunidade inata frente a este tipo de infecção (2). O *Trichophyton rubrum* é responsável por cerca de 90% casos (6).

Frente a esses dados, nota-se que as dermatofitoses ainda são negligenciadas e precisam ser mais estudadas, principalmente nos indivíduos que desenvolvem resposta crônica ou nos casos de ausência de resposta – situação que permite que a manifestação do fungo se propague pela pele, como, por exemplo, nos indivíduos aidéticos, diabéticos e imunossuprimidos. Nessas circunstâncias, existe deficiência em algum fator ou processo imunológico que não consegue responder à infecção de forma eficiente. Estudos questionam sobre alguns polimorfismos genéticos, defeitos em receptores ou falta de receptores que possam interferir no sucesso de uma resposta contra o invasor.

Este trabalho propõe o estudo dos mecanismos imunológicos da infecção causada pelo *T. rubrum* e o papel da resposta mediada pelas células polimorfonucleares, em especial os neutrófilos, que respondem rapidamente à sinalização, por intermédio de quimiocinas e citocinas liberadas por células do sistema imune e células epiteliais em resposta ao processo de invasão de micro-organismos.

Os neutrófilos são as células mais abundantes na corrente sanguínea, possuem receptores tipo *Toll* importantes no reconhecimento dos PAMP, conseguem fagocitar os patógenos em fagossomos e realizar a NETose, para tentar combater de forma eficiente o invasor. Todos esses mecanismos, pertencentes aos neutrófilos, podem contribuir para conduzir uma resposta satisfatória e assertiva durante uma infecção.

Neste contexto, o modelo de estudo é realizado nas PMN de indivíduos saudáveis, com o propósito de compreender seu funcionamento, na resposta contra os dermatófitos, e determinar as funções específicas do papel dos PRR, como os receptores *Toll-like* citados neste estudo – sempre comparando os resultados de células com receptores funcionais ou na ausência deles. Essas análises podem contribuir para o desenvolvimento de tratamentos que atuem diretamente nos processos de reconhecimento do patógeno e na modulação de uma resposta eficaz nos indivíduos com imunidade comprometida, possibilitando compreensão para as diversas respostas encontradas na clínica das dermatofitoses.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o papel dos receptores de lectina do tipo C – mincle, dectina-1 ou manose – envolvidos no reconhecimento de conídios de *T. rubrum* e, também, a capacidade deste fungo de induzir a formação das NET em neutrófilos de indivíduos saudáveis.

Objetivos específicos

Avaliar a participação dos receptores da imunidade inata (mincle, dectina-1 ou manose), utilizando os respectivos anticorpos monoclonais bloqueadores, medindo-se a produção de citocinas (IL-6, IL-1β, IL-10 e TNF-α) e espécies reativas de oxigênio (ROS) após a interação *in vitro* dessas células com hifas de *T. rubrum.*

Analisar, por meio de ensaios *in vitro*, se o *T. rubrum* é capaz de induzir a formação de NET nos neutrófilos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo do *Tricophyton rubrum*

A amostra fúngica foi obtida através da Micoteca Prof. Carlos da Silva Lacaz, do Laboratório de Micologia Médica – Laboratório de Investigação Médica – 53 (LIM-53), pertencente ao Instituto de Medicina Tropical (IMT) da FMUSP. A cepa de *Trichophyton rubrum*, denominada IMT-20 (ATCC), foi mantida, para seu crescimento, em meio ágar batata (BD Biosciences, USA) durante 15 dias e acondicionada em estufa na temperatura de 25ºC.

4.2 Preparo dos conídios

Após o crescimento das colônias, foram adicionados 10mL de solução salina 0,9%. Com a haste de uma alça microbiológica estéril, as colônias de *T. rubrum* foram raspadas, com o auxílio de pipeta *Pasteur*, para que se soltassem do ágar. Essa

suspensão de soro fisiológico 0,9%, junto com o fungo, foi transferida para um tubo cônico (Falcon 50ml) e centrifugada a 2.000 rpm, por 10 minutos. Logo após, a suspensão foi filtrada com *cell strainer* (Falcon, Glendale, AZ, USA) de 40µm, para a separação efetiva dos conídios e de outros elementos interferentes, como o próprio ágar batata. A suspensão com as hifas separadas foi contada na câmara de Neubauer (Inlab, Brasil*)* e ajustada numa concentração de $3x10^5$ de hifas, segundo o protocolo de Sousa *et al*. (2015).

4.3 Grupo avaliado

Os experimentos foram realizados com indivíduos controles (saudáveis), para a caracterização dos receptores após o reconhecimento do *T. rubrum*. Critérios para exclusão do grupo controle: possuir lesões 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 20 mL de sangue periférico de cada indivíduo, utilizando tubos com heparina *(Vacuette)*. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP – CAPPesq (CAAE 91420018.3.0000.0068).

4.4 Separação das células PMN (neutrófilos)

A separação foi realizada por gradiente de densidade, conforme descrito por Cruz, WMA (2010). Os 20 mL de sangue periférico foram diluídos (volume: volume) em dextran 6% estéril (Sigma-Aldrich, Brasil). O tubo foi homogeneizado e incubado de 20 a 25 minutos em estufa de 37ºC, para a sedimentação das hemácias. Após este tempo, as hemácias foram separadas, formando um sobrenadante mais claro.

Foram adicionados, cuidadosamente, 12 mL de *Ficoll-hypaque™ PLUS* (*GE Healthcare*) à camada mais clara do sobrenadante (composta por sangue e dextran 6%). Este tubo foi centrifugado a 900rpm, por 20 minutos, em temperatura ambiente (25ºC). Após a centrifugação, as camadas superiores apresentadas (camada composta por plasmas, PBMC e *Ficoll*) foram descartadas, mantendo-se somente as hemácias e as células granulocíticas.

Para separar as hemácias das células granulocíticas, foram adicionados 3mL de água estéril gelada, homogeneizada com a pipeta *Pasteur*, sendo adicionados 10mL de PBS (InLab – Brasil) aquecido. O tubo foi centrifugado a 600rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de neutrófilos foi ressuspenso em 1mL de meio RPMI 1640 *(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)* (1640 sem vermelho de fenol). Foi realizada a contagem de células na câmara de Neubauer (*Inlab-Brasil*) e feito o ajuste da concentração $3x10^5$ de células para o experimento.

4.5 Fagocitose

Uma placa de 24 poços (*Corning™, Thermo Fisher Scientific Inc. USA*), foi utilizada para realizar o processo de fagocitose dos neutrófilos previamente separados (item 4.4). Em cada poço, foi adicionada uma lamínula estéril e, em seguida, foram inseridos o meio R10 (constituído por 90% de meio RPMI – *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), 10% de SFA – Soro Fetal Bovino (*Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) e as PMN, numa concentração de $3x10^5$ de células. Foi designado que o volume final para cada poço deveria ser de 500 µL, sendo o maior volume do meio de R10, para que, no período de incubação, o meio evaporado dentro da estufa de CO_2 não interferisse na viabilidade das células. As placas foram incubadas pelo período de 1 hora em estufa de CO_2 a 37ºC.

Após a incubação, foram adicionados ao poço 4µL, dos anticorpos monoclonais estudados (anti-hMincle (10µg/mL), anti-hDectin-1 (10µg/mL) e MAb-hMR(5µg/mL)). As placas foram fechadas e acondicionadas no gelo para o bloqueio do anticorpo. Todos os anticorpos são InVivoGen (San Diego, CA, USA).

Após o período de incubação, os conídios foram adicionados nos poços, numa concentração de $15x10^5$ (MOI 1:5). As placas foram incubadas novamente por 3 horas, a 37°C, em estufa de CO_2. Após esse tempo, as lamínulas foram retiradas, coradas com Giemsa e fixadas com resina para lâminas (*ERV-MOUNT–CasaLab - Brasil*), para posterior visualização em microscópio óptico (*Nikon Eclipse E200*).

4.6 Formação das NET

Previamente, os neutrófilos foram separados conforme o item 4.4 e ajustados numa concentração de $2x10^5$ de células.

Na placa de 24 poços, foram adicionadas lamínulas redondas (13mm) e, logo em seguida, foi inserida em cada poço a concentração de $2x10^5$ de células em volume final de 500µL de RPMI (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), sem vermelho de fenol. A placa foi incubada por 1 hora, a 37°C, em estufa de CO_2, para as células decantarem.

Enquanto a placa foi incubada, microtubos (eppendorf) foram utilizados para colocar os estímulos bloqueadores de mincle, dectina-1 ou manose; o PMA foi utilizado como controle positivo (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), enquanto células sem estímulos foram utilizadas como controle negativo. Foram empregados os respectivos anticorpos monoclonais: anti-hMincle (10µg/mL), MAb-hMR (5µg/mL), anti-hDectin-1 (10µg/mL) – todos da InVivoGen (San Diego, CA, USA). Esses microtubos permaneceram durante 1 hora no gelo, para o bloqueio.

Estímulo de células: após 1 hora da incubação da placa no gelo, os estímulos (mincle, dectina-1 ou manose – bloqueados no gelo) foram inseridos em poços pré-designados e a placa foi incubada novamente por 40 minutos, no gelo. Após este tempo, foram adicionados 50nM de PMA (controle positivo), $2x10^5$ de células de PMN, sem estímulo, para controle negativo, e os conídios de *T. rubrum* numa proporção de 1:5 (1 célula de PMN: 5 conídios); esta placa foi incubada novamente, por período de 3 horas, a 37°C, em estufa de CO_2. Após as 3 horas, 350 µl do sobrenadante foram guardados em microtubos e armazenados em freezer a -80ºC, para serem utilizados na quantificação das NET. Em cada poço da placa, foram adicionados 350 µl de PBS (*Phosphate-buffered saline* – InLab – Brasil) e 500 µl de formol 4%.

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

Citocinas produzidas no sobrenadante da cultura de neutrófilos, após 18 horas de incubação, foram dosadas pela técnica de ELISA, seguindo as recomendações do fabricante (BD Biosciences – San Jose, CA, USA). Placas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em tampão de carbonato e

armazenadas a 4ºC, de um dia para o outro. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS (0,5% de Tween 20 – InLab – Brasil) e foram bloqueadas com 200µL de PBS e 10% SFB (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes e incubadas com as amostras, por 2 horas, em temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram lavadas 3 vezes e incubadas com anticorpo de detecção e conjugado estreptavidina – ambos diluídos em PBS+10%SFB, por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, após 3 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, na qual as concentrações variaram de 3,91 a 250 pg/mL, para IL-1β, e de 9,38 a 600 pg/mL, para IL-6. Foram utilizados lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* (100ng/mL) e zimosan (8 µg/mL) como controles positivos, para a liberação de citocinas (ambos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4.8 Ensaio de quimioluminescência – produção de ROS

Em uma placa de 96 poços (de fundo chato) (Corning Incorporated, USA), foram adicionados $1x10^5$ de células PMN e em seguida, foi acrescentado PBS, completando 180 µL por poço. Também foram adicionados 20 µL do substrato luminol ou lucigenina (100µM) e 2 µL de PMA, 50nM) em cada poço, totalizando o volume final de 200 µL. A placa foi armazenada protegida da luz e a leitura foi realizada em aproximadamente 130 ciclos, programados no equipamento fluorímetro – Modelo FilterMax F5 (Molecular Devices) (LIM 49 – FMUSP).

4.9 Quantificação das NET – Complexo MPO-DNA

A quantificação do complexo de MPO-DNA foi obtida através da cultura das NET obtida pelo protocolo de Colón *et al*. (2019). Adiciona-se $1x10^5$ células de neutrófilos em uma placa de 96 poços, e em seguida, o anti-MPO (AB25989) (5 µg/mL; Abcam, Cambridge, Reino Unido). Através dessa cultura, o sobrenadante é utilizado para mensurar a quantidade de MPO-DNA, utilizando o kit Quant-iTTM PicoGreen® (Invitrogen, Waltham, MA,EUA), de acordo com as instruções do

fabricante. A intensidade de fluorescência foi quantificada em um leitor de placas FlexStation 3 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) e a faixa de intensidade aplicada foi de 488nm e emissão em 525nm.

4.10 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o *software* GraphPad Prism – versão 3 para Windows (San Diego, CA, USA – www.graphpad.com). Os resultados foram obtidos com média *s.e.m. One Way (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni, sendo o valor de $p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

Dados protegidos.

6. DISCUSSÃO

Dados protegidos.

7. CONCLUSÃO

Dados protegidos.

8. REFERÊNCIAS

1. Petrucelli M, Peronni K, Sanches P, Komoto T, Matsuda J, Silva W, et al. Dual RNA-Seq Analysis of Trichophyton rubrum and HaCat Keratinocyte Co-Culture Highlights Important Genes for Fungal-Host Interaction. Genes. 19 de julho de 2018;9 (7):362.
2. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev. abril de 1995;8 (2):240–59.
3. Zhan P, Liu W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. Mycopathologia. fevereiro de 2017;182 (1–2):77–86.
4. Faway É, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. In vitro models of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations. Exp Dermatol. agosto de 2018;27 (8):915–22.
5. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses. setembro de 2008;51:2–15.
6. Kaushik N, Pujalte GGA, Reese ST. Superficial Fungal Infections. Prim Care Clin Off Pract. dezembro de 2015;42 (4):501–16.
7. Rinaldi MG. Dermatophytosis: Epidemiological and microbiological update. J Am Acad Dermatol. novembro de 2000;43 (5):S120–4.
8. Peres NT de A, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. An Bras Dermatol. outubro de 2010;85 (5):657–67.
9. García-Romero MT, Arenas R. New Insights into Genes, Immunity, and the Occurrence of Dermatophytosis. J Invest Dermatol. março de 2015;135 (3):655–7.
10. Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B. Pathogenesis of Dermatophytosis. Mycopathologia. novembro de 2008;166 (5–6):267–75.
11. Kaviarasan PK, Jaisankar TJ, Thappa DM, Sujatha S. Clinical variations in dermatophytosis in HIV infected patients. Indian J Dermatol Venereol Leprol. agosto de 2002;68 (4):213–6.
12. 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. fevereiro de 2020;47 (2):166–70.
13. Degreef H. Clinical Forms of Dermatophytosis (Ringworm Infection). Mycopathologia. novembro de 2008;166 (5–6):257–65.

14. Rezabek GH, Friedman AD. Superficial Fungal Infections of the Skin: Diagnosis and Current Treatment Recommendations. Drugs. maio de 1992;43 (5):674–82.
15. Hay RJ. Tinea Capitis: Current Status. Mycopathologia. fevereiro de 2017;182 (1–2):87–93.
16. Masri-Fridling GD. DERMATOPHYTOSIS OF THE FEET. Dermatol Clin. janeiro de 1996;14 (1):33–40.
17. Begum J, Mir NA, Lingaraju MC, Buyamayum B, Dev K. Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. J Basic Microbiol. abril de 2020;60 (4):293–303.
18. Dias MFRG, Quaresma-Santos MVP, Bernardes-Filho F, Amorim AG da F, Schechtman RC, Azulay DR. Update on therapy for superficial mycoses: review article part I. An Bras Dermatol. outubro de 2013;88 (5):764–74.
19. Tani K, Adachi M, Nakamura Y, Kano R, Makimura K, Hasegawa A, et al. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. Arch Dermatol Res. outubro de 2007;299 (8):381–7.
20. Samdani AJ. Dermatophyte growth and degradation of human stratum corneum in vitro (pathogenesis of dermatophytosis). J Ayub Med Coll Abbottabad JAMC. dezembro de 2005;17 (4):19–21.
21. Tainwala R, Sharma Y. Pathogenesis of dermatophytoses. Indian J Dermatol. maio de 2011;56 (3):259–61.
22. López-García B, Lee PHA, Gallo RL. Expression and potential function of cathelicidin antimicrobial peptides in dermatophytosis and tinea versicolor. J Antimicrob Chemother. maio de 2006;57 (5):877–82.
23. Jansen PAM, Rodijk-Olthuis D, Hollox EJ, Kamsteeg M, Tjabringa GS, de Jongh GJ, et al. Beta-defensin-2 protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin. PloS One. 2009;4 (3):e4725.
24. Baldo A, Monod M, Mathy A, Cambier L, Bagut ET, Defaweux V, et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. Mycoses. maio de 2012;55 (3):218–23.
25. Zurita J, Hay RJ. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes in vitro. J Invest Dermatol. novembro de 1987;89 (5):529–34.
26. García-Madrid L, Huizar-López M, Flores-Romo L, Islas-Rodríguez A. Trichophyton rubrum manipulates the innate immune functions of human keratinocytes. Open Life Sci. 1º de dezembro de 2011;6 (6):902–10.
27. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. Annu Rev Immunol. 21 de março de 2015;33 (1):257–90.
28. Drummond RA, Collar AL, Swamydas M, Rodriguez CA, Lim JK, Mendez LM, et al. CARD9-Dependent Neutrophil Recruitment Protects against Fungal Invasion of the Central Nervous System. May RC, organizador. PLOS Pathog. 17 de dezembro de 2015;11 (12):e1005293.

29. Tang J, Lin G, Langdon WY, Tao L, Zhang J. Regulation of C-Type Lectin Receptor-Mediated Antifungal Immunity. Front Immunol. 1º de fevereiro de 2018;9:123.
30. Tang C, Makusheva Y, Sun H, Han W, Iwakura Y. Myeloid C-type lectin receptors in skin/mucoepithelial diseases and tumors. J Leukoc Biol. outubro de 2019;106 (4):903–17.
31. Hadebe S, Brombacher F, Brown GD. C-Type Lectin Receptors in Asthma. Front Immunol. 11 de abril de 2018;9:733.
32. Vautier S, Sousa M da G, Brown GD. C-type lectins, fungi and Th17 responses. Cytokine Growth Factor Rev. dezembro de 2010;21 (6):405–12.
33. Grumach AS, de Queiroz-Telles F, Migaud M, Lanternier F, Filho NR, Palma SMU, et al. A Homozygous CARD9 Mutation in a Brazilian Patient with Deep Dermatophytosis. J Clin Immunol. julho de 2015;35 (5):486–90.
34. Rosentul DC, Plantinga TS, Oosting M, Scott WK, Velez Edwards DR, Smith PB, et al. Genetic Variation in the Dectin-1/CARD9 Recognition Pathway and Susceptibility to Candidemia. J Infect Dis. 1º de outubro de 2011;204 (7):1138–45.
35. Gow NAR, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, et al. Immune Recognition of *Candida albicans* β-glucan by Dectin-1. J Infect Dis. 15 de novembro de 2007;196 (10):1565–71.
36. Dennehy KM, Willment JA, Williams DL, Brown GD. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. Eur J Immunol. maio de 2009;39 (5):1379–86.
37. Sato K, Yang X, Yudate T, Chung J-S, Wu J, Luby-Phelps K, et al. Dectin-2 Is a Pattern Recognition Receptor for Fungi That Couples with the Fc Receptor γ Chain to Induce Innate Immune Responses. J Biol Chem. dezembro de 2006;281 (50):38854–66.
38. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunol Lett. 22 de janeiro de 2003;85 (2):85–95.
39. Criado PR, Oliveira CB de, Dantas KC, Takiguti FA, Benini LV, Vasconcellos C. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. An Bras Dermatol. agosto de 2011;86 (4):726–31.
40. Celestrino GA, Reis APC, Criado PR, Benard G, Sousa MGT. Trichophyton rubrum Elicits Phagocytic and Pro-inflammatory Responses in Human Monocytes Through Toll-Like Receptor 2. Front Microbiol. 21 de novembro de 2019;10:2589.
41. Li Y, Chen J, Wan M-J, Lai W, Zheng Y, Li M-R, et al. [The immune response of human keratinocytes to Trichophyton rubrum conidia is partially mediated by toll-like receptor-2, 4, dectin-1 and cytokines]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. abril de 2011;31 (4):678–81.
42. Brasch J, Mörig A, Neumann B, Proksch E. Expression of antimicrobial peptides and toll-like receptors is increased in tinea and pityriasis versicolor. Mycoses. março de 2014;57 (3):147–52.

43. Campos MRM, Russo M, Gomes E, Almeida SR. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with Trichophyton rubrum. Microbes Infect. fevereiro de 2006;8 (2):372–9.
44. 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 São Paulo. 2019;61:e56.
45. 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. julho de 2016;22 (5):316–24.
46. Baltazar L de M, Santos PC, de 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-1β and reactive oxygen species. Med Mycol. 1º de abril de 2014;52 (3):293–302.
47. Heinen M-P, 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. março de 2019;139 (3):626–37.
48. Nakamura T, Nishibu A, Yasoshima M, Tanoue C, Yoshida N, Hatta J, et al. Analysis of Trichophyton antigen-induced contact hypersensitivity in mouse. J Dermatol Sci. maio de 2012;66 (2):144–53.
49. Urban CF, Nett JE. Neutrophil extracellular traps in fungal infection. Semin Cell Dev Biol. maio de 2019;89:47–57.
50. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. Acta Biochim Pol. 2013;60 (3):277–84.
51. Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. Dev Cell. março de 2018;44 (5):542–53.
52. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? J Cell Biol. 3 de setembro de 2012;198 (5):773–83.
53. Ermert D, Zychlinsky A, Urban C. Fungal and Bacterial Killing by Neutrophils. In: Rupp S, Sohn K, organizadores. Host-Pathogen Interactions [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [citado 8 de junho de 2021]. p. 293–312. (Walker JM. Methods in Molecular Biology; vol. 470). Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-204-5_21
54. Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. Microbes Infect. novembro de 2003;5 (14):1337–44.
55. Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. Inflamm Res. 1º de outubro de 1997;46 (10):382–91.
56. McGuinness WA, Kobayashi SD, DeLeo FR. Evasion of Neutrophil Killing by Staphylococcus aureus. Pathog Basel Switz. 17 de março de 2016;5 (1).
57. Thieblemont N, Wright HL, Edwards SW, Witko-Sarsat V. Human neutrophils in auto-immunity. Semin Immunol. abril de 2016;28 (2):159–73.

58. Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. J Leukoc Biol. 1º de fevereiro de 2013;93 (2):185–98.
59. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Microbes Infect. novembro de 2003;5 (14):1317–27.
60. Ran T, Geng S, Li L. Neutrophil programming dynamics and its disease relevance. Sci China Life Sci. novembro de 2017;60 (11):1168–77.
61. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. J Leukoc Biol. fevereiro de 1996;59 (2):229–40.
62. Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. eLife. 2 de junho de 2017;6:e24437.
63. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat Med. abril de 2007;13 (4):463–9.
64. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. Front Immunol [Internet]. 2013 [citado 8 de junho de 2021];3. Disponível em: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00420/abstract
65. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Nat Rev Immunol. fevereiro de 2018;18 (2):134–47.
66. Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. Front Immunol [Internet]. 12 de agosto de 2016 [citado 8 de junho de 2021];7. Disponível em: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00302/abstract
67. Hazeldine J, Harris P, Chapple IL, Grant M, Greenwood H, Livesey A, et al. Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the innate immune system of aged individuals. Aging Cell. agosto de 2014;13 (4):690–8.
68. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms. Cell Microbiol. abril de 2006;8 (4):668–76.
69. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 15 de janeiro de 2007;176 (2):231–41.
70. Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. Annu Rev Cell Dev Biol. 6 de outubro de 2020;36 (1):191–218.
71. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. Nat Med. março de 2017;23 (3):279–87.

72. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. Clin Chim Acta. agosto de 2016;459:89–93.
73. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. Cell Death Differ. abril de 2011;18 (4):581–8.
74. Khan MA, Farahvash A, Douda DN, Licht J-C, Grasemann H, Sweezey N, et al. JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. Sci Rep. dezembro de 2017;7 (1):3409.
75. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? Blood. 17 de outubro de 2013;122 (16):2784–94.
76. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. J Innate Immun. 2018;10 (5–6):414–21.
77. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase Expression Allows the Pathogen Group A Streptococcus to Escape Killing in Neutrophil Extracellular Traps. Curr Biol. fevereiro de 2006;16 (4):396–400.
78. Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. Staphylococcus aureus Degrades Neutrophil Extracellular Traps to Promote Immune Cell Death. Science. 15 de novembro de 2013;342 (6160):863–6.
79. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science. 5 de março de 2004;303 (5663):1532–5.
80. Urban CF, Nett JE. Neutrophil extracellular traps in fungal infection. Semin Cell Dev Biol. maio de 2019;89:47–57.
82. Jin X, Zhao Y, Zhang F, Wan T, Fan F, Xie X, et al. Neutrophil extracellular traps involvement in corneal fungal infection. Mol Vis. 2016;22:944–52.
83. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimanianda V, Nietzsche S, Thywißen A, et al. Production of Extracellular Traps against Aspergillus fumigatus In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA. Filler SG, organizador. PLoS Pathog. 29 de abril de 2010;6 (4):e1000873.
84. Wu S-Y, Weng C-L, Jheng M-J, Kan H-W, Hsieh S-T, Liu F-T, et al. Candida albicans triggers NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular traps through dectin-2. Hohl TM, organizador. PLOS Pathog. 6 de novembro de 2019;15 (11):e1008096.
85. McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold Aspergillus fumigatus. Microbes Infect. novembro de 2010;12 (12–13):928–36.
86. Leal SM, Cowden S, Hsia Y-C, Ghannoum MA, Momany M, Pearlman E. Distinct Roles for Dectin-1 and TLR4 in the Pathogenesis of Aspergillus fumigatus Keratitis. Levitz SM, organizador. PLoS Pathog. 1º de julho de 2010;6 (7):e1000976.
87. Yuan K, Zhao G, Che C, Li C, Lin J, Zhu G, et al. Dectin-1 is essential for IL-1β production through JNK activation and apoptosis in Aspergillus fumigatus keratitis. Int Immunopharmacol. novembro de 2017;52:168–75.

88. Brummer E, Capilla J, Bythadka L, Stevens DA. Production of IL-6, in contrast to other cytokines and chemokines, in macrophage innate immune responses: Effect of serum and fungal (Blastomyces) challenge. Cytokine. setembro de 2007;39 (3):163–70.
89. Oliveira CB de, 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 São Paulo. fevereiro de 2015;57(1):57–61.
90. de Sousa M da GT, 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.
91. Tani K, Adachi M, Nakamura Y, Kano R, Makimura K, Hasegawa A, et al. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. Arch Dermatol Res. outubro de 2007;299(8):381–7.
92. Yoshikawa, F. S. Y., & De Almeida, S. R. (2016). The Role of Phagocytes and NETs in Dermatophytosis. Mycopathologia, 182(1-2), 263–272.
93. Sims, J. E., & Smith, D. E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. Nature Reviews Immunology, 10(2), 89–102. doi:10.1038/nri2691.
94. Sparber, F., & LeibundGut-Landmann, S. (2019). Interleukin-17 in Antifungal Immunity. Pathogens, 8(2), 54. doi:10.3390/pathogens8020054
95. Xing, Z; Gauldie, J; Cox, G; Baumann, H; Jordana, M; Lei, X F; Achong, M K (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses.. Journal of Clinical Investigation, 101(2), 311–320.
96. Elmer Brummer; Javier Capilla; Lakshmi Bythadka; David A. Stevens (2007). Production of IL-6, in contrast to other cytokines and chemokines, in macrophage innate immune responses: Effect of serum and fungal (Blastomyces) challenge. , 39(3), 0–170.
97. Clemons, K V et al. “Role of IL-10 in invasive aspergillosis: increased resistance of IL-10 gene knockout mice to lethal systemic aspergillosis.” Clinical and experimental immunology vol. 122,2 (2000): 186-91.
98. Scott G. Filler, Michael R. Yeaman, Donald C. Sheppard, Tumor Necrosis Factor Inhibition and Invasive Fungal Infections, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 41, Issue Supplement_3, August 2005, Pages S208–S212
99. Louie, A et al. “Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis.” Infection and immunity vol. 62,7 (1994): 2761-72
100. Knaus, Ulla G.; Leto, Thomas L. (2019). [Methods in Molecular Biology] NADPH Oxidases Volume 1982 (Methods and Protocols) || Neutrophil Extracellular Traps. , 10.1007/978-1-4939-9424-3(Chapter 31), 517–528.
101. Saijo, S.; Iwakura, Y. (2011). Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. International Immunology, 23(8), 467–472.
102. Kenno, Samyr; Perito, Stefano; Mosci, Paolo; Vecchiarelli, Anna; Monari, Claudia (2016). Autophagy and Reactive Oxygen Species Are Involved in Neutrophil

Extracellular Traps Release Induced by C. albicans Morphotypes. Frontiers in Microbiology, 7
103. Futosi, K., Fodor, S., & Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. International Immunopharmacology, 17(3), 638–650. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.034
104. Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., & Zychlinsky, A. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. Blood, 117(3), 953–959. https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-290171