

Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Análise comparativa entre isolados de *Fonsecaea sp* na modulação da resposta imune do
hospedeiro: papel das vesículas e componentes extracelulares**

LUCAS DE OLIVEIRA LAS-CASAS

Brasília – DF

Julho/2021

LUCAS DE OLIVEIRA LAS-CASAS

Análise comparativa entre isolados de *Fonsecaea sp* na modulação da resposta imune do hospedeiro: papel das vesículas e componentes extracelulares

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília – DF

Julho/2021

Agradecimentos

À toda minha família, principalmente minha mãe, meu pai e minha avó por todo amor e apoio incondicional dado ao longo desses anos.

À minha orientadora, Anamélia Lorenzetti Bocca por ter acreditado no meu trabalho e por ter me guiado durante todos os momentos em que eu estive no laboratório desde a graduação.

À professora Larissa Matos por também ter me guiado ao longo desses anos e pelas conversas que foram tão importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Sônia Nair Bão por todo auxílio com a parte de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, principalmente a Clara Luna, o Raffael Castro e a Luisa Coutinho que sempre se dispuseram a me ajudar e me incentivaram a me tornar um pesquisador melhor desde que comecei no laboratório. À Tatiana Hermann e a Camila Goersch que também trabalham com *Fonsecaea* e contribuíram com várias reflexões ao longo destes dois anos.

À todos os membros do Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) que não só me ajudaram academicamente, como me proporcionaram conversas e momentos de descontração importantes nas horas vagas no laboratório.

Aos meus amigos, especialmente, a Amanda Almeida, Maria Clara Lima, Camila Rodrigues, Lívia Novaes, Otavio Napoleão, César Bosi, Larissa Gomes e Stella Tavares que sempre me incentivaram e estiveram do meu lado.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia e Inflamação (LIMI) e Laboratório de Biofísica Molecular (BMF) por sempre estarem disponíveis para me ajudar.

Ao técnico Chico, por toda alegria e auxílio que me foi dado.

Aos professores Márcio Rodrigues, Izabela Dourado e Marcus Teixeira por terem aceitado participar da banca examinadora deste trabalho.

À CAPES e a FAP-DF pelo apoio financeiro.

Sumário

<i>Índice de Figuras</i>	7
<i>Lista de Abreviaturas</i>	9
<i>Resumo</i>	11
<i>Abstract</i>	13
1. Introdução	15
1.1 Cromoblastomicose	15
1.2 Gênero <i>Fonsecaea</i>	18
1.3 Polimorfismo fúngico	22
1.4 Vesículas extracelulares e fatores de virulência	25
1.5 Imunidade antifúngica	31
2. Objetivos	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
3. Materiais e Métodos	35
3.1 Animais	35
3.2 Obtenção de BMDMs	35
3.3 Fungos.....	36
3.4 Isolamento de vesículas e meio condicionado.....	37
3.5 Caracterização das vesículas	38
3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão	38
3.7 Ensaio de interação <i>in vitro</i>	39
3.8 Quantificação de citocinas.....	40
3.9 Ensaio de infecção <i>in vivo</i> e análise da evolução da doença.....	40
3.10 Análises estatísticas	41
4. Resultados	42
4.1 Triagem de diferentes espécies do gênero <i>Fonsecaea</i>	42

4.2 Caracterização das vesículas extracelulares	45
As EVs produzidas por diferentes morfotipos de <i>Fonsecaea</i> tendem a agir como segundo segundo sinal na ativação de IL-1 β , apesar de possuírem diferentes papéis imunoestimulatórios na produção de TNF e IL-1 β <i>in vitro</i>	52
As EVs produzidas pelas formas saprofiticas de <i>Fonsecaea</i> em meio rico estimulam mais a produção de IL-10 do que em meio mínimo na presença ou ausência de células muriformes	54
4.3 Caracterização dos meios condicionados	57
As moléculas presentes nos CMs de <i>Fonsecaea</i> isolados a partir de meio mínimo possuem maior capacidade em estimular os níveis desta citocina do que em meio rico.....	57
O CM1 produzido pelas formas saprofiticas de <i>Fonsecaea</i> agem como primeiro e/ou segundo sinal na produção de IL-1 β , enquanto o CM2 tende a inibir esta produção.....	60
As moléculas presentes nos CMs produzidos por <i>Fonsecaea</i> em meio mínimo tem maior capacidade em estimular os níveis de IL-10 do que em meio rico.....	62
Ambos os CMs produzidos por <i>Fonsecaea</i> conseguem ativar a produção de IL-1 β , em que os produzidos pelas formas saprofiticas agem como primeiro e segundo sinal, enquanto os produzidos na presença de células muriformes agem como o primeiro sinal	66
Os CMs produzidos por <i>Fonsecaea</i> possuem o mesmo padrão de produção de TNF entre si, apesar dos CMs produzidos em meio mínimo terem maior capacidade em estimular os níveis desta citocina do que os CMs em meio rico	68
Os CMs produzidos por MC- MM de <i>F. pedrosoi</i> e <i>F. erecta</i> levam à um aumento da área da lesão, nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumento na carga fúngica na região infectada em modelo experimental de CBM <i>in vivo</i>	70
5. Discussão	73
6. Conclusões	85
7. Referências Bibliográficas	87
8. Anexos	102

Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição geográfica da cromoblastomicose de acordo com os casos reportados.....	16
Figura 2. Micrografia das células muriformes de <i>Fonsecaea</i>	17
Figura 3. Árvore filogenética das espécies de <i>Fonsecaea</i> baseadas em alinhamento por espaçador interno transcrito (ITS) de sequências construídas por junção de vizinhos por MEGA 6.0.....	22
Figura 4. Micrografia de diferentes morfotipos de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	24
Figura 5. Linha do tempo mostrando evidências iniciais e descobertas recentes sobre EVs.....	28
Figura 6. Etapas no processo de filtração e isolamento de EVs.....	38
Figura 7. Cinética de infecção <i>in vivo</i> com propágulos fúngicos de <i>F. monophora</i> , <i>F. nubica</i> e <i>R. aquaspersa</i>	42
Figura 8. Medição dos valores de pH dos meios de cultura após cultivo com <i>F. pedrosoi</i> , <i>F. monophora</i> , <i>F. nubica</i> e <i>F. erecta</i>	44
Figura 9. Conteúdo de esterol e proteico nas suspensões das EVs de <i>Fonsecaea sp</i>	46
Figura 10. Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão analisado por DLS das EVs isoladas e produzidas por <i>Fonsecaea sp</i>	48
Figura 11. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das EVs produzidas por <i>Fonsecaea sp</i>	49
Figura 12. Quantificação de TNF por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas por conídios e hifas de <i>Fonsecaea sp</i>	51
Figura 13. Quantificação de IL-1 β por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas por conídios e hifas de <i>Fonsecaea</i>	52
Figura 14. Quantificação de TNF por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofíticas de <i>Fonsecaea sp</i>	53
Figura 15. Quantificação de IL-1 β por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofíticas de <i>Fonsecaea sp</i>	54
Figura 16. Quantificação de IL-10 por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas por conídios e hifas de <i>Fonsecaea sp</i>	55

Figura 17. Quantificação de IL-10 por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofiticas de <i>Fonsecaea sp.</i>	56
Figura 18. Quantificação de TNF por ELISA após co-cultura de BMDMs com o CM1 (100KDa>CM>1KDa) e com CM2 (<1kDa) produzido por conídios e hifas de <i>Fonsecaea</i>	58
Figura 19. Quantificação de IL-1 β por ELISA após co-cultura de BMDMs com CM1 (100KDa>CM>1KDa) e com CM2 (<1kDa) produzido tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofiticas de <i>Fonsecaea sp.</i>	60.
Figura 20. Quantificação de IL-10 por ELISA após co-cultura de BMDMs com o CM1 (100KDa>CM>1KDa) e com CM2 (<1kDa) produzido por conídios e hifas de <i>Fonsecaea sp.</i>	62
Figura 21. Quantificação de TNF por ELISA após co-cultura de BMDMs com CM1 (100KDa>CM>1KDa) e com CM2 (<1kDa) produzidos tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofiticas de <i>Fonsecaea sp.</i>	64
Figura 22. Quantificação de IL-1 β por ELISA após co-cultura de BMDMs com CM1 (100KDa>CM>1KDa) e com CM2 (<1kDa) produzido tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofiticas de <i>Fonsecaea sp.</i>	66
Figura 23. Quantificação de IL-10 por ELISA após co-cultura de BMDMs com CM1 (100KDa>CM>1KDa) e com CM2 (<1kDa) produzidos tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofiticas de <i>Fonsecaea sp.</i>	68
Figura 24. Cinética de infecção <i>in vivo</i> com os propágulos fúngicos de <i>F. pedrosoi</i> e <i>F. erecta</i> tratados com CM1 e CM2 produzidos em BFJ pH 6.5.....	71

Lista de Abreviaturas

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µm – Micrômetro

µL – Microlitro

µM – Micromolar

ANOVA – Análise de Variância

ATP – Adenosina trifosfato

BFJ – Meio Butterfield e Johnson

PDB – Meio batata dextrose líquido

PDA – Meio batata dextrose sólido

BMDCs – Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea

BMDMs – Macrófagos Derivados da Medula Óssea

CBM – Cromoblastomicose

CM – Meio Condicionado

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

CLRs – Receptores do tipo Lectina-C

CO₂ – Dióxido de Carbono

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Dano

DNA – Ácido Dessorribonucleico

ELISA – Ensaio de Ligação Imunoenzimático

EVs – Vesículas Extracelulares

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos

IL – Interleucina

M – Molar

MC – Célula Muriforme

mg – Miligrama

ml – Mililitro

MM – Meio Mínimo

MM- MC – Meio Mínimo na Ausência de Células Muriformes
MM+ MC – Meio Mínimo na Presença de Células Muriformes
MP – Melanina de Parede
MS – Melanina Secretada
nm – Nanômetros
NO – Óxido Nítrico
NO₂ – Nitrito
PAMPs – Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PBS – Tampão Fosfato-Salino
PFA – Paraformaldeído
pH – Potencial Hidrogeniônico
RM – Meio Rico
RNA – Ácido Ribonucleico
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
rpm – Rotações por minuto
RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute
SDB – Meio Sabouraud Dextrose líquido
SDA – Meio Sabouraud Dextrose sólido
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SFB – Soro Fetal Bovino
TLRs – Receptores do Tipo Toll
TNF – Fator de Necrose tumoral
UFC – Unidade Formadora de Colônia
kDa - Quilodalton
x g – Força Centrífuga Relativa

Resumo

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose cutânea e subcutânea crônica, causada por fungos negros, dimórficos e filamentosos da família *Dematiaceae*. *Fonsecaea pedrosoi* é considerado uma das principais espécies causadoras da doença no Brasil, apesar de que *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pugnacius* terem sido descritas como outras espécies capazes de causar CBM em humanos. Todas estas espécies possuem a capacidade de transitar entre as formas saprofiticas, conídios e hifas, e a forma patogênica do fungo, as células muriformes (MCs). Fatores de virulência produzidos por fungos, como vesículas extracelulares (EVs) e moléculas extracelulares presentes no meio condicionado (CM) vem sendo mais estudados nos últimos anos, apesar de existirem poucas informações sobre o papel destas moléculas extracelulares durante a CBM. Este trabalho visa compreender os padrões imunoestimulatórios *in vitro* e *in vivo* causados por EVs e CMs produzidos por *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* isolados a partir de conídios e hifas cultivados em meio rico (RM) e meio mínimo (MM), além de analisar o papel dessas moléculas quando produzidas na presença ou ausência de MCs. Em relação as diferentes condições nutricionais de cultivo, foi demonstrado que EVs produzidas em RM tem maior capacidade de estimular a produção de TNF, IL-1 β e IL-10 por BMDMs em comparação a EVs produzidas em MM na presença ou na ausência de MCs. Tais resultados são diferentes dos observados para EVs de *C. neoformans* produzidas em RM e MM, em que EVs isoladas de MM demonstram estimular mais a produção de citocinas pró-inflamatórias do que em RM. Já os CMs demonstram ser mais pró-inflamatórios do que as EVs, principalmente os isolados a partir de MM na ausência de MCs, aumentando os níveis de secreção das citocinas TNF, IL-1 β e IL-10 *in vitro*. Por fim, os CMs produzidos por *F. pedrosoi* e *F. erecta* foram utilizados como tratamento *in vivo* e demonstraram agravar a progressão da CBM em modelo murino, aumentando o diâmetro da área da lesão, o número de unidades formadoras de colônia e os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 β em relação ao controle positivo tratado com PBS. Já foi observado que as moléculas presentes no CM produzidos pela forma capsular de *C. neoformans* conseguem inibir a ativação do inflamassoma NLRP3 e promover a proliferação celular *in vitro*, indicando que as moléculas presentes nos CMs de fungos patogênicos possuem potencial de imunomodular a resposta imune do hospedeiro. Desta forma, observa-se que as EVs e os CMs produzidos por diferentes espécies do gênero *Fonsecaea* possuem a capacidade tanto de estimular, quanto de inibir a secreção de

citocinas importantes na resposta imune inata como TNF, IL-1 β e IL-10, demonstrando serem moléculas com capacidade de virulência e possivelmente, de modular a progressão da CBM em humanos.

Palavras-chave: Cromoblastomicose; *Fonsecaea*; Vesículas extracelulares; Meio condicionado; Resposta imune inata

Abstract

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic cutaneous and subcutaneous mycosis caused by black, dimorphic and filamentous fungi of the Dematiaceae family. *Fonsecaea pedrosoi* is considered one of the main species causing the disease, although *F. monophora*, *F. nubica* and *F. pugnacious* are considered as other species capable of causing CBM in humans. All these species have an ability to transition between saprophytic forms, such as conidia and hyphae and the pathogenic form of the fungus, the murine cells (MCs). Virulence factors produced by fungi, such as extracellular vesicles (EVs) and conditioned media (CM) have been more studied in recent years, although there is little information about the roles of these extracellular molecules during CBM. This work aims to understand the *in vitro* and *in vivo* immunostimulatory patterns caused by EVs and CMs obtained by *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* and *F. erecta* isolated from conidia and hyphae cultivated in rich medium (RM) and minimal medium (MM), in addition to analyzing the role of these molecules when produced in the presence or absence of MCs. Regarding the different nutritional conditions of cultivation, it was shown that EVs produced in RM have a greater capacity to stimulate the production of TNF, IL-1 β and IL-10 by BMDMs when compared to EVs produced in MM in the presence or absence of MCs. These results are different from those observed for EVs of *C. neoformans* produced in RM and MM, in which EVs isolated from MM are shown to stimulate more the production of pro-inflammatory cytokines than in RM. The CMs, on the other hand, demonstrate to be more pro-inflammatory than EVs, especially those isolated from MM in the absence of MCs, which increased the levels of cytokine secretion of TNF, IL-1 β and IL-10 *in vitro*. Finally, the CMs produced from *F. pedrosoi* and *F. erecta* were used as an *in vivo* treatment and were shown to aggravate the progression of CBM in a murine model, increasing the diameter of the lesion area, the number of colony forming units and the levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF and IL-1 β , compared to the positive control treated with PBS. The role of the molecules presented in the CM produced by capsular *C. neoformans* has already been observed to inhibit inflammasome NLRP3 activation and promote cell proliferation *in vitro*, indicating that these extracellular molecules produced by pathogenic fungi have the potential to immunomodulate the host's immune response. Thus, it is observed that the EVs produced by different species of the *Fonsecaea* genus have the ability to both stimulate and inhibit

important cytokines in the innate immune response, proving to be molecules with high virulence capacity and possible mediators of the CBM progression in humans.

Keywords: Chromoblastomycosis; Fonsecaea; Extracellular vesicles; Conditioned media; Innate immune response

1. Introdução

1.1 Cromoblastomicose

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose crônica e granulomatosa, cutânea e subcutânea, causada por fungos dimórficos, filamentosos e melanizados da família *Dematiaceae* (BONIFAZ, A. *et al.* 2010; MARTÍNEZ, R. L. & TOVAR, L. J. M. 2007; QUEIROZ-TELLES, F. 2015). Esta doença é caracterizada por lesões verrucosas com prevalência de células muriformes no tecido infectado e por ser de difícil tratamento (DE HOOG, G. S. *et al.* 2004; BRITO, A. C. & BITTENCOURT, M. J. S. 2018). A CBM ocorre mais comumente em indivíduos imunocompetentes por meio da inoculação traumática da forma saprofítica do fungo na pele (DE HOOG, G. S. *et al.*, 2004; BADALI, H. *et al.*, 2013; QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* 2009). Os agentes etiológicos mais comuns desta doença são *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea monophora*, *Cladophialophora carrionni* e *Rhinocladiella aquaspersa*, além de *Phialophora verrucosa* e algumas outras espécies do gênero *Exophiala* também estarem relacionadas à doença em humanos (CARRIÓN, A. L. 1950; NAJAFZADEH, M. J. *et al.*, 2009; BADALI, H. *et al.*, 2013).

Esta doença foi investigada pela primeira vez por Alexandrino Pedroso em 1911 (São Paulo, Brasil), apesar de ter sido descrita oficialmente em 1914 pelo médico alemão Max Rudolph que analisou seis casos de CBM em trabalhadores rurais de Minas Gerais, Brasil (RUDOLPH, M., 1914). A CBM pode afetar pessoas de todas as idades, apesar da manifestação clínica ocorrer majoritariamente em pessoas entre 40 e 70 anos da idade, geralmente do gênero masculino, possivelmente, por razões ocupacionais, visto que esta doença afeta principalmente trabalhadores rurais que, em sua grande maioria, são do sexo masculino (QUEIROZ-TELLES, F. 2015; BONIFAZ, A. *et al.* 2010; MARTÍNEZ, R. L. & TOVAR, L. J. M. 2007).

A CBM é considerada uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), ou seja, é enquadrada em um grupo de infecções tropicais ou subtropicais que são endêmicas em populações de baixa renda em países em desenvolvimento nos continentes africano, asiático e latino-americano. Doenças negligenciadas tropicais não possuem amplo apoio político, nem da indústria farmacêutica e os principais grupos de pessoas afetados são os que muitas vezes vivem em zonas rurais, zonas de conflito ou zonas urbanas com extrema falta de higiene (QUEIROZ-TELLES, 2015; WHO, 2013).

Apesar da CBM ser uma doença distribuída mundialmente, ela geralmente está associada à países com clima tropical e subtropical, tendo sido registrada no Brasil (SILVA S. A. C. C. M. *et al.* 1992; SILVA, J. P. *et al.* 1999; MINOTTO, R. *et al.* 2001), Madagascar (ESTERRE, P. *et al.* 1996), México (BONIFAZ, A. *et al.* 2001; SANTOS, D. W. C. L. *et al.* 2020), China (LU, S. *et al.* 2013), Cuba (BADALI, H. *et al.* 2013), Índia (ATTAPATTU, M. C. 1997), Venezuela (PEREZ-BLANCO, M. *et al.*, 2006), Austrália (QUEIROZ-TELLES, F. *et al.*, 2017, LESLIE, D. F.; BEARDMORE, G. L. 1979), entre outros (Fig. 1). No Brasil, estima-se que a incidência da doença ocorra em 3 de cada 100.000 habitantes e casos clínicos da CBM foram estudados no estado do Maranhão (Silva, M. A. C. C. *et al.*, 1992), Minas Gerais (RUDOLPH, M. 1914), Rio Grande do Sul (MINOTTO, R. *et al.*, 2001; MATTE, S. M. *et al.*, 1997), Paraná (QUEIROZ-TELLES, F. 1997) e na região Amazônica, sendo esta última considerada a principal região endêmica da doença no país com mais de 300 casos descritos (SILVA, J. P. *et al.* 1999; QUEIROZ-TELLES, *et al.* 2015). Contudo, por ser considerada uma doença negligenciada pela OMS, não há necessidade de exigir a notificação obrigatória de casos clínicos da CBM, o que dificulta gerar uma estimativa real do número de casos da doença (QUEIROZ-TELLES, 2015).

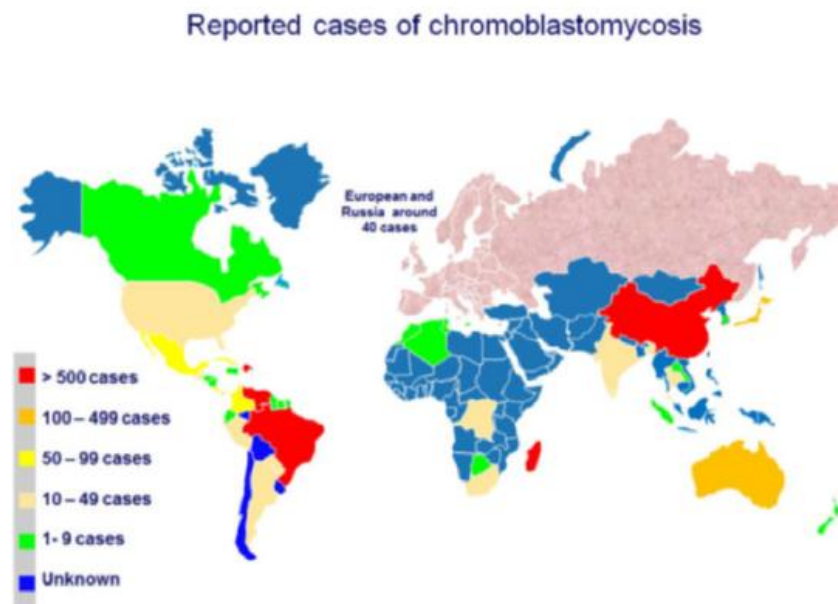


Figura 1. Distribuição geográfica da cromoblastomicose de acordo com os casos reportados (modificado de QUEIROZ-TELLES, F. 2015)

A infecção da CBM é adquirida por meio da inoculação traumática de fragmentos de hifas e conídios no tecido subcutâneo da pele do hospedeiro, geralmente causada por lascas de madeira

ou espinhos contaminados de plantas (BADALI, H. *et al.* 2014), como *Mimosa pudica* (SALGADO, C. G. *et al.* 2004) e *Orbignya phalerata*, conhecido comumente como babaçu (MARQUES, S. G, *et al.* 2006). Após instalado no tecido, o fungo adere a células epiteliais e converte-se de uma forma conidial ou filamentosa para um morfotipo patogênico, chamado de célula muriforme (MC) ou corpo esclerótico (BADALI, H. *et al.* 2014; HAMZA, S. R. *et al.* 1993; QUEIROZ-TELLES, *et al.* 2009). Essas células possuem formato globular variando entre 5 e 12 μm de diâmetro com parede celular grossa e altamente pigmentada com melanina de cor marrom-amarelada (Fig. 2) (CARRIÓN, P. 1950; ALVIANO, D. S. *et al.* 2003; MCGINNIS, M. R. 1983). Tais características promovem maior resistência à fagocitose por células do sistema imune do hospedeiro, dificultando a destruição e eliminação do fungo (SILVA, J. P. *et al.* 2002), o que favorece a cronicidade da doença (ALVIANO, D. S. *et al.* 2003; ESTERRE, P. S. *et al.* 1993).

Células muriformes

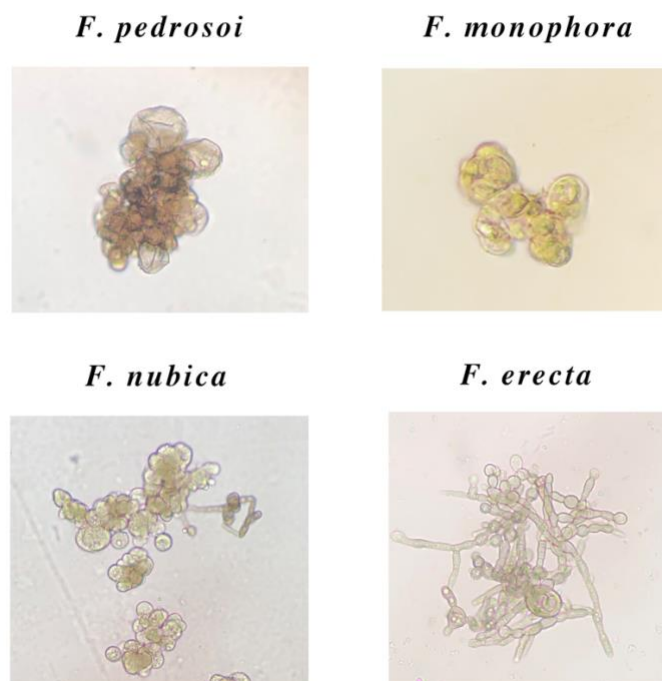


Figura 2. Micrografia das células muriformes de *Fonsecaea*. Células muriformes obtidas de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* cultivadas em meio BFJ pH 2.5 por 40 dias. Aumento de 40x. Arquivo Pessoal.

Já foi demonstrado em modelo *in vivo* que a presença de hifas e MCs na infecção promovem o estabelecimento da CBM no tecido, enquanto na presença apenas de conídios, a infecção não

progride para a fase crônica da doença (SIQUEIRA, I. M. *et al.* 2017). Apesar de serem consideradas células essenciais no estabelecimento e cronicidade da CBM, ainda existe uma defasagem na literatura sobre o papel deste tipo de célula na modulação da resposta imune do hospedeiro, visto que são de difícil obtenção, em meio de cultura em laboratório, e também não são fáceis de obter em grande quantidade, a partir do tecido infectado humano (ALVIANO, P. S. 1992).

Na CBM ocorre uma reação inflamatória granulomatosa associada a fibrose extensiva e hiperplasia pseudoepiteliomatosa, que em conjunto com estímulo antigênico persistente, dão um aspecto verrucoso as lesões (ESTERRE, 1993; URIBE, F. *et al.* 1989). Neste tipo de infecção, a resposta imune é mediada tanto pela imunidade humoral, com a presença de anticorpos específicos de IgG1, IgM e IgA, quanto pela imunidade mediada por célula, por meio de reação granulomatosa mista, principalmente, com a presença de neutrófilos e macrófagos, mas também com a presença de linfócitos, células plasmáticas, eosinófilos e células de Langerhan (QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* 2003).

Durante a infecção que cursa na CBM, há uma prevalência da resposta imune Th2 em relação a Th1, levando a uma resposta imune predominantemente humoral e apresentando um efeito menos protetor durante a infecção, em que há a presença elevada de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , além de baixa proliferação de células T, levando à um quadro mais grave da doença (SIQUEIRA, I. M. *et al.* 2012; QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* 2009; ESTERRE, P. & QUEIROZ-TELLES, F. 2006; BRITO, A. C. & BITTENCOURT, M. J. S. 2018; SIQUEIRA, I. M. *et al.* 2020). A primeira linha de defesa do organismo contra infecções fúngicas é a resposta imune inata, mediada principalmente por macrófagos. Apesar do papel da imunidade mediada por células da resposta imune inata do hospedeiro já ter sido amplamente estudada em outras infecções fúngicas, como criptococose, paracoccidiodomicose, histoplasmose, blastomicose e candidíase, pouco se sabe sobre a importância deste tipo de resposta na CBM, reforçando a necessidade em estudar mais profundamente os mecanismos da resposta imune envolvidos na CBM.

1.2 Gênero *Fonsecaea*

O *F. pedrosoi* é considerado um dos principais agentes etiológicos da CBM no Brasil (DE HOOG, G. S. *et al.* 2004; MCGINNIS, M. R. 1983; SILVA, A. C. C. M. *et al.* 1992). O gênero *Fonsecaea* é composto por ascomicetos anamorfos da família *Herpotrichilaceae* (ordem *Chaetothyriales*) e podem ser descritos por possuírem morfologia simples com conídios de tamanhos variados organizados em cadeia, fracamente ligados à conidiósporos (ATTILI, D. S. 1998; DE HOOG, G. S. *et al.* 2004; MCGINNIS, M. R.; SCHELL W. A. 1980). Contudo, este tipo de morfologia também pode ser observado em outros tipos de fungos, apontando para a inexistência de uma característica morfológica marcante neste táxon (ATTILI, D. S. 1998), como, p. ex., a cápsula glicoproteica de *C. neoformans*. A partir de dados moleculares e caracterização por sequência multilocus de agentes da CBM, considera-se que existam quatro espécies crípticas distintas, obtidas de isolados clínicos, pertencentes ao gênero *Fonsecaea*: *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pugnacius*, além de quatro espécies ambientes: *F. minima*, *F. erecta*, *F. multimorphosa*, e *F. brasiliensis* (Fig. 3) (PENG, F.; DE HOOG, G. S. 2017; CHEN, Y. *et al.* 2016).

A classificação taxonômica de fungos deste gênero permanece em discussão em grande parte pela dificuldade em classificá-los, visto que as espécies de *Fonsecaea* são morfológicamente semelhantes entre si (NAJAFZADEH, M. J. *et al.* 2009). Até meados dos anos 2000, era considerado que o gênero *Fonsecaea* englobava apenas duas espécies: *F. pedrosoi* e *F. compacta* (DE HOOG, G. S. *et al.* 2004; NAJAFZADEH, M. J. *et al.* 2009). Tais espécies foram consideradas espécies distintas pelo fato de que são observadas diferenças morfológicas na estrutura de seus conídios e conidiósporos (MCGINNIS, M. R. & SCHELL W. A. 1980). Contudo, Borelli (1980) propôs que tais diferenças não eram espécie-específico, mas que *F. compacta* era um mutante displásico de *F. pedrosoi* (DE HOOG, G. S. *et al.* 2004; NAJAFZADEH, M. J. *et al.* 2009). Posteriormente, as duas espécies foram comparadas por análises de perfis restritos de DNA e por dados de sequências do espaçador interno transcrito 1 (ITS1), sendo proposto uma revisão taxonômica do gênero *Fonsecaea* (ATTILI, D. S. *et al.* 1998).

De Hoog e colaboradores (2004) reavaliaram os limites taxonômicos de linhagens do gênero *Fonsecaea* a partir de dados de rDNA ITS por meio da análise das distâncias filogenéticas entre os grupos a partir de pequenas subunidades (SSU) de sequências de rDNA, observando dois *clusters* diferentes: um composto por *F. pedrosoi* e outro contendo *F. monophora*. As espécies *F. monophora* e *F. pedrosoi* são morfológicamente semelhantes entre si, apesar de *F. monophora*

possuir cadeias de conídios e dentículo levemente menores (DE HOOG, *et al.* 2004). Além disso, clinicamente, *F. monophora* é considerada uma espécie oportunista, visto que pode causar também infecções no cérebro, bile e linfonodos cervicais (NAJAFZDEH, M. J. *et al.* 2009; SURSAH, S. *et al.* 2005), enquanto *F. pedrosoi* causa apenas lesões cutâneas e subcutâneas.

Em 2010, uma nova espécie de *Fonsecaea* foi descrita a partir de dados de perfis de análises genômicas: *Fonsecaea nubica* (NAJAFEZDAH, M. J. *et al.* 2010). Esta espécie é morfológicamente semelhante à *F. pedrosoi* e *F. monophora*, podendo apenas ser diferenciada a partir de análises moleculares de multilocus (NAJAFEZDAH, M. J. *et al.* 2010). Clinicamente, *F. nubica* se comporta de forma parecida com *F. pedrosoi*, visto que também é associada exclusivamente à CBM, com presença de MCs no tecido (NAJAFEZDAH, M. J. *et al.* 2010). Em relação à sua distribuição geográfica, *F. nubica* assemelha-se à *F. monophora*, visto que ambas espécies são distribuídas mundialmente, enquanto *F. pedrosoi* é exclusivamente encontrado na América do Sul e América Central (YOU, Z. *et al.* 2019; ESTEERE, P. *et al.* 1996). Apesar desta espécie já ter sido observada no Brasil, China, França e África (NAJAFEZDAH, M. J. *et al.* 2010; CHEN, Y. *et al.* 2016; CATEAU, E. *et al.* 2014; RASAMOELINA, T. *et al.* 2020; GOMES, R. R. *et al.* 2017; YOU, Z. *et al.* 2019; FRANSISCA, C. *et al.* 2017), ainda existem poucas informações na literatura sobre sua manifestação clínica, histopatologia e tratamento (YOUZ, Z. *et al.* 2019).

Em 2015, outra espécie do gênero *Fonsecaea* foi descrita: *F. pugnacius* (DE AZEVEDO, C. M. P. S. *et al.* 2015). Esta espécie foi descoberta por análises de sequenciamento genômico e foi isolada tanto da pele, quanto do tecido cerebral de um paciente (DE AZEVEDO, C. M. P. S. *et al.* 2015; FENG, P. & DE HOOG, G. S. 2017). Na infecção encontrada, observou-se um padrão clínico diferente das outras espécies patogênicas de *Fonsecaea*, em que *F. pugnacius* tanto pode gerar lesões cutâneas e subcutâneas com presença de MCs, como pode disseminar-se para o cérebro em forma de hifa e gerar infecção neste órgão, podendo até levar à fatalidade (DE AZEVEDO, C. M. P. S. *et al.* 2015; BOMBASSARO, A. *et al.* 2020). Esta capacidade de alterar o sítio da infecção e de poder converter-se em diferentes morfologias patogênicas no mesmo hospedeiro é exclusiva, até a presente data, para *F. pugnacius* (BOMBASSARO, A. *et al.* 2020).

As quatro espécies ambientais deste gênero: *F. erecta*, *F. minima*, *F. brasiliensis* e *F. multimorphosa* (NAJAFZADEH, M. J. *et al.* 2011; CHEN, Y. *et al.* 2016; VICENTE, V. A. *et al.*

2013; VILLENA, C. I. F. *et al.* 2020; VICENTE, V. A. *et al.* 2012) apresentam características morfológicas semelhantes aos encontrados nas lesões humanas (VICENTE, V. A. *et al.* 2013).

Em 2011, um fungo obtido a partir de tecido cerebral de um gato infectado, originalmente descrito como *Cladosporium bantianum* foi reavaliado taxonomicamente a partir de análise de sequência multilocus e foi descrita como uma nova espécie de *Fonsecaea*, a *F. multimorphosa*, (NAJAFZADEH, M. J. *et al.* 2011). No mesmo ano, uma nova espécie do gênero *Fonsecaea* causadora de doenças em caranguejos foi descrita (VICENTE, V. A. *et al.* 2012). A partir de análises histopatológicas de diferentes tecidos de *Ucides cordatus*, conhecido como caranguejo-uçá presente em mangues brasileiros, observou-se lesões causadas por fungo, denominada *Lethargic Crab Disease* (LCD) (BOERGER, W. A. *et al.* 2005). Posteriormente, os isolados de caranguejos foram então sequenciados e notou-se que além da presença da espécie *Exophiala cancera*, comumente encontrada em lesões de LCD (DE HOOG, G. S. *et al.* 2011), havia também uma outra espécie, a *Fonsecaea brasiliensis* (VICENTE, V. A. *et al.* 2012). Vicente e colaboradores (2013) realizaram análises taxonômicas por sequenciamento genético e verificaram que, dos quarenta e cinco isolados ambientais identificados ou como *Fonsecaea* ou como *Cladophialophora*, apenas dois foram apontados como *F. pedrosoi* e um como *F. monophora*. Os outros quarenta e dois isolados foram separados em dois grupos distintos, contendo duas novas espécies: um com *F. minima* e outro com *F. erecta* (VICENTE, V. A. *et al.* 2013).

Desta forma, é possível observar que a descoberta de novos táxons pertencentes ao gênero *Fonsecaea* é algo recente e ainda há uma grande defasagem na literatura em relação à especificidade clínica, imunológica e epidemiológica de cada espécie deste grupo. Além de ser uma doença negligenciada pela OMS, a CBM acomete, relativamente, poucos pacientes, o que dificulta ainda mais a análise e isolamento destes fungos. Tais informações reiteram a importância em estudar e comparar como essas diferentes espécies agem tanto no hospedeiro, quanto no meio ambiente para que possamos obter um maior entendimento sobre a CBM.

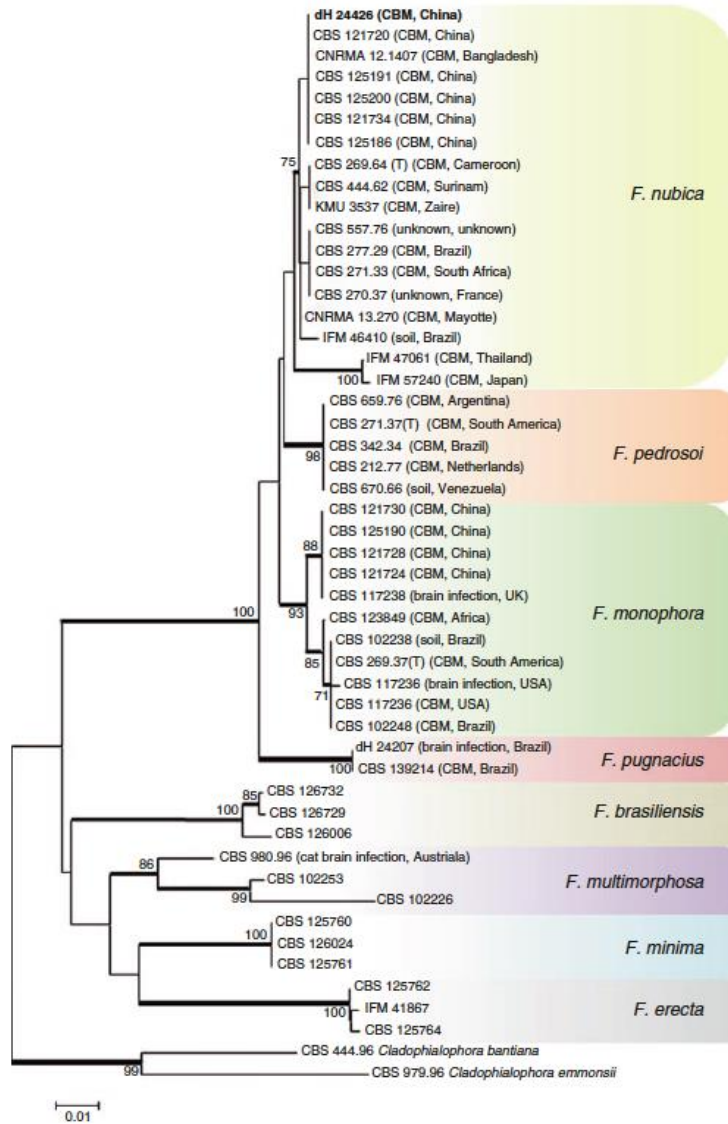


Figura 3. Árvore filogenética das espécies de *Fonsecaea* baseadas em alinhamento por espaçador interno transcrito (ITS) de seqüências construídas por junção de vizinhos por MEGA 6.0. (adaptado de CHEN, Y. *et al.* 2016)

1.3 Polimorfismo fúngico

Estima-se que existam entre 100.000 e 1.000.000 espécies de fungo habitando o planeta, contudo poucas dessas espécies são capazes de causar doenças em humanos e a maioria destas são oportunistas, infectando, geralmente, pessoas imunocomprometidas (LEVITZ, S. M. 2004; O'BRIEN, H. E. *et al.*, 2005). A maioria dos fungos possuem a capacidade de transitar

reversivelmente entre dois morfotipos distintos: levedura e hifa, sendo esta uma habilidade fundamental em sua biologia e geralmente é associada à patogenicidade fúngica (GAUTHIER, G. M. 2017; GAUTHIER, G. M. 2015). Contudo, fungos dimórficos podem apresentar mais do que duas morfologias, como esporos e células muriformes, p. ex. (GOW, 1994) (Fig. 4). Algumas famílias de fungos dimórficos pertencentes ao filo *Ascomycota* podem causar infecções tanto em mamíferos, quanto em plantas e insetos (GAUTHIER, G. M. 2015). Os principais agentes etiológicos em humanos deste filo são *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *F. pedrosoi*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, entre outros (LATGÉ, J. P. 2010; LEVITZ, S. M. 2004; ROMANI, L. 2004).

O principal fator que difere o fungo de outros eucariotos é a presença de uma parede celular rígida, sendo um fator essencial na sua proteção e em sua estrutura (LEVITZ, S. M. 2004). A estrutura e composição de parede varia de acordo com a espécie e o morfotipo e é um importante fator de virulência, assim como alterações nos lipídeos de membrana e no padrão de sinalização intracelular (GAUTHIER, G. M, 2015; BOYCE, K. J. ANDRIANOPOULOS, A. 2015). Já foi demonstrado, em diferentes modelos experimentais, que a capacidade dos fungos dimórficos em se converter em hifa ou conídio em levedura promove uma melhor adaptação no tecido do hospedeiro por meio de diferentes mecanismos moleculares (BOYCE, K. J. ANDRIANOPOULOS, A. 2015; INGLIS, D. O. *et al.* 2013; GAUTHIER, G. M. *et al.* 2010; SIQUEIRA, I.M. *et al.* 2017).

No geral, há dois momentos importantes de transição para a sobrevivência e patogenicidade destes fungos no hospedeiro: a transição para levedura e a transformação em hifa (GAUTHIER, G. M. 2017). No caso de fungos do gênero *Fonsecaea* e de outras espécies causadoras da CBM, a transição de hifa para célula muriforme é essencial para o estabelecimento e cronicidade da infecção, mas pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos neste processo. Inicialmente, propágulos fúngicos (conídios e fragmentos de hifas) se aderem em tecidos do hospedeiro e, por possuírem dimensões pequenas, são capazes de ultrapassar as barreiras de defesa do hospedeiro (INGLIS, D. O. *et al.* 2013; GAUTHIER, G. M.; BOYCE, K. J. *et al.* 2011).

Após a entrada no tecido infectado, o *Fonsecaea sp* se transforma em MCs nas lesões, diferentemente da maioria das doenças já estudadas (SALGADO, C. G. 2010; SIQUEIRA, I. M. *et al.* 2020). Wüthich e colaboradores (2015) demonstraram que o reconhecimento de conídios de *F. pedrosoi* em camundongos infectados por células da resposta imune inata ocorre

majoritariamente pelos receptores de lectina do tipo C (CLRs), Dectina-1 e Dectina-2, gerando uma resposta modulada pelos linfócitos Th17. Em 2017, foi demonstrado que hifas e MCs tem a capacidade de gerar lesões na pele de camundongos e estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, com presença principalmente de MCs no tecido, enquanto a infecção por conídios não alcança a fase crônica e nem estimula com tanta intensidade a produção de citocinas pró-inflamatórias (SIQUEIRA, I. M *et al.* 2017). Mais recentemente, Siqueira e colaboradores (2020) apresentaram que o tipo de resposta imune na CBM é modulada de acordo com os estágios de desenvolvimento da doença a partir de modelo murino, em que há a presença, primeiramente, de uma resposta do tipo Th17 mediada por Dectina-2 responsável pela geração de uma resposta crônica. No entanto, se a resposta altera o perfil de ativação dos linfócitos Th, de Th17 para Th1, culmina na cura da lesão, demonstrando que os linfócitos são células essenciais na modulação da resposta imunológica durante a CBM e a má regulação desta resposta está envolvida com a cronicidade da doença. Contudo, ainda existem poucos estudos utilizando o modelo da CBM que analisem os efeitos imunológicos de hifas e MCs no hospedeiro para compreender melhor o desenvolvimento da doença (SALGADO, C. G. 2010).

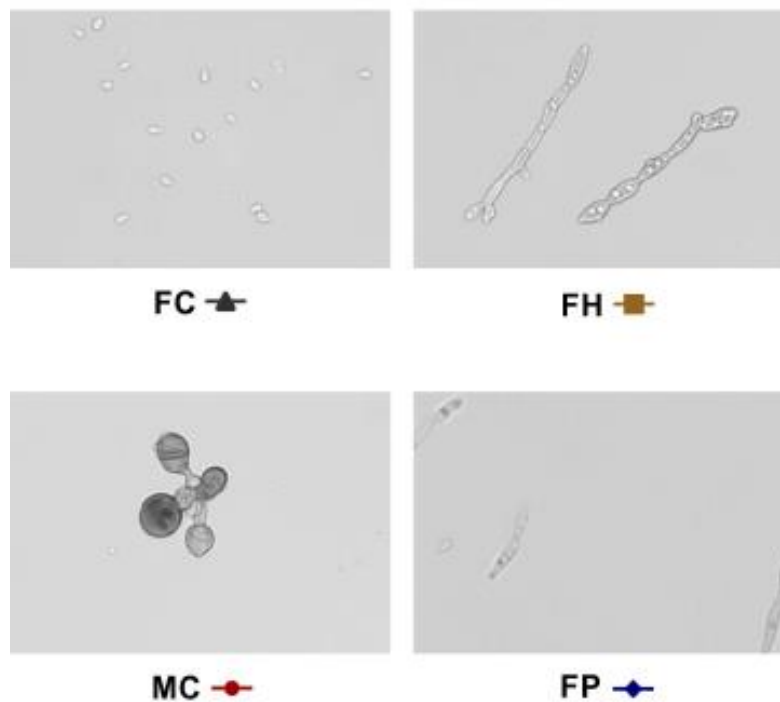


Figura 4. Micrografia de diferentes morfotipos de *Fonsecaea pedrosoi*. Conídios (FC), Hifas (FH), células muriformes (MC) e conídios e hifas (FP) sob magnificação de 400X (adaptado de CASTRO, R. J. A. *et al.* 2017)

1.4 Vesículas extracelulares e fatores de virulência

Vesículas extracelulares

Todas as células são capazes de produzir vesículas de diferentes tipos, podendo ser intra ou extracelulares e esta produção é conservada evolutivamente entre todos os reinos existentes (DEATHERAGE, B. L. & COOKSON, B. T. 2012; VAN NIEL, G. *et al.* 2018). O termo “vesículas extracelulares” (EVs) é abrangente e representa um grupo heterogêneo de estruturas membranosas formadas por bicamada lipídica que podem ser originadas a partir de diferentes vias biológicas, mas que possuem em comum a capacidade de alcançar o ambiente extracelular (VAN NIEL, G. *et al.* 2018; RIZZO, J. *et al.* 2020). Estas estruturas são, de fato, altamente heterogêneas, tanto em estrutura, podendo possuir entre 20-2.000nm de diâmetro, com uma média entre 50-500nm (RIZZO, J. *et al.* 2020; BROWN, L. *et al.* 2015; VAN NIEL, G. *et al.* 2018), quanto em função, participando de diversos tipos de eventos biológicos, desde a estruturação celular até o transporte de fatores de virulência em certas infecções (BIELSKA, E. & MAY, R. 2019; RODRIGUES, M. L. *et al.* 2008; RIZZO, *et al.* 2020).

EVs bacterianas foram descritas pela primeira vez em *Escherichia coli* nos anos 60 (BISHOP, D. G. & WORK, E. 1965) e em fungos foi proposta em 1973 em *C. neoformans* (TAKEO, K. *et al.* 1973). Embora os estudos sobre EVs terem obtido maior enfoque na literatura nas últimas décadas, ainda existem informações a serem descobertas, principalmente, sobre essas estruturas em bactéria Gram-positivas, micobactérias e fungos, especialmente os filamentosos (Fig. 5) (BROWN, L. *et al.* 2015). A dificuldade em se estudar EVs no caso dos três grupos de seres vivos supracitados está relacionada com a presença de da parede celular espessa (BROWN, L. *et al.* 2015). No caso de fungos, essa parede celular é formada, basicamente, por camadas de β -glucana, quitina, manoproteínas e em alguns casos, melanina (BOWMAN, S. M. & FREE, S. J. 2006).

Apesar de Takeo e colaboradores (1973) terem observado estruturas semelhantes às EVs em *C. neoformans* por crio-microscopia eletrônica em 2007, tais estruturas foram efetivamente descritas pela primeira vez em fungos por meio de análises de microscopia, sorológicas, bioquímicas e proteômicas, sugerindo a existência de uma população diversa de EVs contendo moléculas associadas à sobrevivência e patogenicidade de *C. neoformans* (RODRIGUES, M. L. *et al.* 2008). Desde então, essas vesículas já foram descritas em diferentes espécies de fungos como *H. capsulatum* (ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* 2008); *C. albicans* (ALBUQUERQUE, P. C. *et al.*

2008; VARGAS, G. *et al.* 2015); *Sporotrrix schenckii* (ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* 2008); *Saccharomyces cerevisiae* (OLIVEIRA, *et al.* 2010); *Paracoccidioides brasiliensis* (VALLEJO, M. C. *et al.* 2011); *Alternatia infectoria* (SILVA, B. M. A. *et al.* 2014); *Pichia fermentans* (LEONE, F. *et al.* 2017); *C. gattii* (BIELSKA, W. *et al.* 2018); *S. brasiliensis* (IKEDA, M. A. K. *et al.* 2018); *A. fumigatus* (SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019); *P. lutzii* (DA SILVA, R. P. *et al.* 2019); *A. flavus* (BRAUER, V. S. *et al.* 2020); entre outros, como apresentado na Figura 4.

EVs fúngicas carregam diversos tipos de componentes moleculares produzidos no lúmen da célula como proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, pigmentos e toxinas que possuem funções distintas, podendo agir no metabolismo, patogenicidade, transdução de sinal e estruturação celular (BROWN, L. *et al.* 2015; BIELSKA, E. *et al.* 2019). Existem diversos trabalhos demonstrando que EVs produzidas a partir de isolados clínicos possuem a capacidade de imunomodular o sistema imune do hospedeiro, agindo como possíveis fatores de virulência (BIELSKA, E. *et al.* 2019; RIZZO, J. *et al.* 2020). De forma geral, as EVs são altamente heterogêneas, variando não só em relação ao conteúdo que carrega, mas também em relação ao tamanho, densidade eletrônica e pigmentação (ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* 2008; IKEDA, M. A. K. *et al.* 2018; SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019; BIELSKA, E.; MAY, R. C. 2019).

Rodrigues e colaboradores (2008) demonstraram que EVs produzidas por *C. neoformans* carregavam moléculas envolvidas com a patogenicidade como dismutase, fosfolipase B, urease, GXM e melanina. Mais recentemente, foi observado que EVs melanizadas produzidas pelo fungo negro leveduriforme *Exophiala dermatitidis* possuem maior capacidade neurotóxica em comparação a vesículas não-melanizadas *in vitro* (LAVRIN, T. *et al.* 2020). Para *C. gattii* foi observado que as EVs produzidas por uma cepa altamente virulenta desta espécie possuem a capacidade de regular o processo de divisão de trabalho (“division of labor”) por meio da liberação de material genético e proteínas no citoplasma de macrófagos infectados por *C. gattii*, promovendo um aumento na proliferação celular dos fungos dentro dos macrófagos, favorecendo a patogenicidade e sobrevivência do patógeno (BIELSKA, E. *et al.* 2018).

As EVs obtidas de fungos leveduriformes são mais descritas quando comparado com as estruturas de fungos filamentosos. Em relação a EVs isoladas de *A. fumigatus*, uma espécie de fungo filamentoso, foram encontradas duas populações distintas de EVs, uma com vesículas entre 100 e 200nm e outra com vesículas de até 595nm (SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019). Em relação ao seu conteúdo, encontraram diferentes tipos de moléculas como diversas glucosiltransferases

envolvidas com o crescimento celular e toxinas como Asp f-1, Asp f-3, Asp f-4, Asp, f-8 e Asp f-9 relacionadas à invasão, resistência e crescimento fúngico, demonstrando serem possíveis fatores de virulência (SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019). Recentemente, foi observada a produção de EVs por *A. flavus*, o segundo maior causador de aspergilose no mundo (BRAUER, V. S. *et al.* 2020). Neste estudo observaram que as vesículas isoladas estimularam a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-1 β , melhoraram a atividade fungicida e promoveram a polarização M1 por meio do aumento dos níveis de transcrito de iNOS, um clássico marcador da resposta M1 (BRAUER, V. S. *et al.* 2020). Desta forma, pode-se observar que, apesar do interesse em estudar o papel de EVs em diferentes contextos, ainda há uma defasagem na literatura acerca da importância e funções dessas vesículas na relação parasito-hospedeiro.

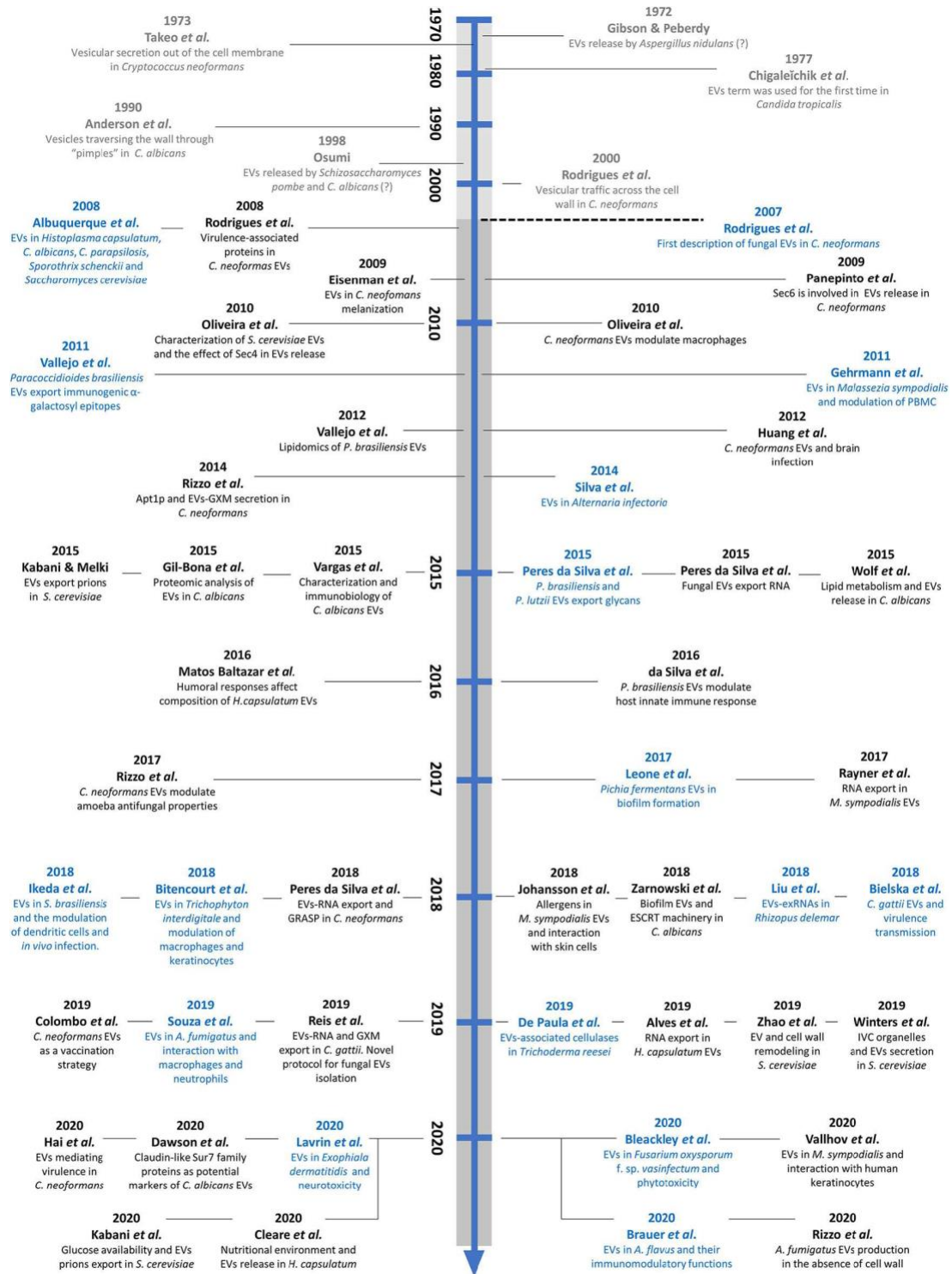


Figura 5. Linha do tempo mostrando evidências iniciais e descobertas recentes sobre EVs fúngicas. Em cinza são apresentadas sugestões iniciais sobre EVs fúngicas. A linha tracejada representa a primeira descrição de EVs. Para fungos (*C. neoformans*). Em azul são os trabalhos de caracterização inicial das EVs, enquanto os em preto são os que representam as descobertas sobre composição, metodologias e funções de EVs fúngicas (adaptado de RIZZO, J. *et al.* 2020).

Fatores de virulência

Além das vesículas extracelulares, este trabalho também possui o enfoque em outras moléculas produzidas por fungos patogênicos que podem agir como fatores de virulência. Estas moléculas podem ser de diferentes tamanhos e são secretadas durante o cultivo dos fungos em meios de cultura, chamado de “meio condicionado” (CM). A capacidade de um patógeno infectar, sobreviver e converter-se de uma forma saprofítica para uma forma patogênica dentro de um hospedeiro está relacionada à capacidade deste de produzir diferentes tipos de fatores de virulência, como proteínas, açúcares, toxinas, pigmentos e enzimas (HOGAM, L. H. *et al.* 1996; CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L. A. 2001). De acordo com as definições propostas por Casadevall & Pirofski (1999) a virulência pode ser definida como a capacidade relativa de um micro-organismo de causar dano ao hospedeiro e fator de virulência é um componente do patógeno que gera dano ao hospedeiro, podendo incluir componentes essenciais para sua viabilidade. A habilidade de crescer à 37 ° C e tolerância a diferentes tipos de pH são dois exemplos comuns de fatores de virulência encontradas em fungos patogênicos (ALVIANO, D. S. *et al.* 1992; HOGAM, L. H. *et al.* 1996).

Os tipos de danos causados por patógenos podem ser moleculares, celulares, teciduais, órgão-específico e no organismo como um todo, por meio de diferentes mecanismos como mutações, necrose, apoptose, inflamação, desregulação na produção de citocinas, entre outras (CASADEVALL, A. PIROFSKI, L. A. 2003). Em *A. fumigatus* já foi observado a produção de proteases com atividade elastinolítica (REICHARD, M. V. *et al.* 1994) como de gliotoxina, um tipo de metabólito imunossupressor que age inibindo a capacidade fagocítica de macrófagos e a ativação e proliferação de células T (MULLBACHER, A. & EICHNER, R. D. 1984) e a aflotoxina, uma toxina envolvida com a contaminação de diferentes tipos de plantios de monocultura (HOGAN, L. H. *et al.* 1996).

Já no caso de *C. neoformans*, seus principais fatores de virulência são: (a) sua cápsula polissacarídica rica em glucuronoxilomanana (GXM) e glucuroxilomanogalactana (GXMGal) que possuem diferentes moléculas como resíduos de α -1,3 manana e resíduos de α -1,6 galactana, que favorecem a evasão do sistema imune; (b) a produção de melanina que age protegendo o fungo contra o estresse oxidativo e de mudanças na temperatura; (c) a habilidade de crescer à 37°C, comum à basicamente todos fungos patogênicos; e (d) a produção de enzimas extracelulares como

DNases, lipases, ureases e proteases (RODRIGUES, M. L. *et al.* 2008; KHAJO, A. *et al.* 2011; ALMEIDA, F. *et al.* 2015).

Apesar de faltarem informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na CBM, foram descritas moléculas com potencial de agirem como fatores de virulência em *F. pedrosoi* como (a) melanina que é tanto secretada, quanto encontrada em organelas, sintetizada, principalmente, pela via 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN) (FRANZEN, *et al.* 1999; FRANZEN, *et al.* 2008), agindo na evasão do fungo durante a fagocitose e promovendo a resistência contra estresses oxidativos e fisiológicos (ALVIANO, D. S. *et al.* 1991; PALMEIRA, V. F. *et al.* 2005; BOCCA, A. L. *et al.* 2006; FRANZEN, A. *et al.* 2008; CUNHA, M. M. L. *et al.* 2010); (b) tolerância a pH ácido, semelhante ao pH encontrado nas lesões em humanos durante a CBM (ALVIANO, D. S. *et al.* 1992); (c) capacidade de crescer à 37°C (ALVIANO, D. S. *et al.* 1992) em que observa-se um aumento na produção de adesinas de parede em *F. pedrosoi* cultivado nessa temperatura em comparação ao cultivo a 28°C; (d) presença de α -1,3-glucana que, em conjunto com a melanina, tem a habilidade de perturbar a produção de óxido nítrico (NO) celular, produção de citocinas e dificultar a internalização por macrófagos e células dendríticas (NÓBREGA, Y. K. M. *et al.* 2010); (e) e secreção de enzimas como: (1) ecto-ATPases, produzidas por conídios, hifas e MCs, possivelmente favorecendo a transição morfológica e assim, a virulência (COLLOPY-JUNIOR, I. *et al.* 2006), (2) fosfatases como ectofosfatase ácida ativada por Zn^{2+} , que melhoram a aderência do fungo no tecido do hospedeiro (KNEIPP, L. F. *et al.* 2003; KNEIPP, L. F. *et al.* 2004; DE SOUZA, T. F. *et al.* 2008), (3) além de lipases, ureases e gelatinases (SOUSA, T. F. *et al.* 2008; MONTOYA, *et al.* 2020).

Bürgel e colaboradores (2020) avaliaram que as moléculas secretadas presentes no CM produzidos pela forma capsular de *C. neoformans* possuem a capacidade de inibir a via de ativação do inflamassoma NLPR3 e reduzir a eficácia antifúngica de macrófagos *in vitro*, como a capacidade fagocítica, além de terem observado baixos níveis na produção de IL-1 β , aumento nas unidades formadoras de colônia (UFC) e menor sobrevivência de camundongos tratados com o CM.

Como já foi discutido anteriormente, *F. pedrosoi* consegue produzir diferentes tipos de moléculas, muitas vezes presentes em sua parede celular, mas que podem ser encontradas no meio extracelular, como a melanina (ALVIANO, D. S. *et al.* 1992). Possivelmente, outras moléculas como moléculas associadas à patógenos (PAMPs) que são diferentes tipos de peptídeos com

importância imunológica, devem estar presentes no sobrenadante do cultivo de *Fonsecaea sp.* e podem agir como importantes moduladores da resposta imune no hospedeiro. Entretanto, não existem muitas informações sobre o papel das moléculas presentes no meio condicionado de espécies de fungos e não há registro na literatura para *Fonsecaea*, o que reitera a importância em estudar a tais moléculas durante a CBM.

1.5 Imunidade antifúngica

Em doenças causadas por fungos, a resposta imune do hospedeiro é essencial no controle da doença e quando não é devidamente balanceada, a homeostase do indivíduo pode ser comprometida, podendo levar à cronicidade de certas infecções e até ao óbito, principalmente no caso de pacientes imunocomprometidos (ROMANI, L. 2011). Com o aumento de pacientes que utilizam imunossupressores, as doenças fúngicas vem crescendo em número de casos mundialmente, principalmente em regiões altamente habitadas com pouco saneamento, altos índices de pobreza e pouco acesso à serviços médicos (ARMSTRONG, D. 1993; PAPPAS, P. G. 2010; ROMANI, L. 2011).

A primeira etapa da relação entre o fungo e o hospedeiro se dá pelo reconhecimento dos patógenos pelas células do sistema imune inato, geralmente monócitos, macrófagos e células dendríticas, que possuem receptores de reconhecimento padrão (PRRs) em sua superfície e reconhecem diversos tipos de antígenos (PATIM, E. C. *et al.* 2018). Estes antígenos próprios de patógenos são os PAMPs, que podem variar desde peptídeos sinais até material genético (RNA e mtDNA, p. ex.), envolvidos com a ativação ou inibição de diferentes vias imunológicas (MOGENSEN, T. H. 2009; HERWALD, H. & EGESTEN, A. 2016; TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2010). A família de receptores podem ser dividida em receptores de membrana: do tipo Toll (TLRs) e receptores de lectina do tipo C (CLRs) e em receptores citosólicos: do tipo NOD (NLRs), receptores do tipo RIG-I (RLRs) (MOGENSEN, T. H. 2009; TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2010) e receptores do tipo AIM-2 (ALRs) (TAVARES, A. H. *et al.* 2015).

Uma importante família de PRRs em infecções fúngicas, principalmente na CBM, são os CLRs que incluem: Dectina-1, Dectina-2, Mincle, DC-SIGN, receptor de manose e langerina (ROMANI, L. 2011). Na relação fungo-hospedeiro, o principal receptor envolvido é a Dectina-1, visto que este é o único CLR capaz de reconhecer β -glucana, o principal açúcar presente na parede

celular, e este reconhecimento leva a produção de diferentes padrões de citocinas e quimiocinas (ROMANI, L. 2011). Estes padrões de produção de citocinas podem levar à diferentes perfis da resposta imune podendo ser pró-inflamatório com presença de TNF, IL-1 β e IFN- γ ou anti-inflamatório, com presença de IL-10, IL-4 e IL-13, p. ex.

Na CBM causada por *F. pedrosoi* sabe-se que as células T possuem um papel essencial na resposta imune do hospedeiro durante a infecção, principalmente, as subpopulações de T *helper* 1 e Th1/Th17 (SOUSA, M. G. T. *et al.* 2008; CASTRO, R. J. A. *et al.* 2017; BREDA, L. C. D. *et al.* 2020). Foi observado que o reconhecimento de conídios de *F. monophora* via Mincle inibe a ativação de Dectina-1 pela degradação de IRF-1, um importante fator de remodelamento de nucleossomo envolvido com a transcrição da subunidade de IL-12: IL12A. A falta de produção da citocina pró-inflamatória IL-12 redireciona a resposta imune do tipo Th1, com produção de IFN- γ , baixos níveis de IL-10 e menos carga fúngica, para o tipo Th2, associada com a possível cronicidade da CBM (WEVERS, B. A. *et al.* 2015). Dois anos depois, Wüthrich e colaboradores (2015) observaram que esporos de *F. pedrosoi* induzem a polarização de células T em células Th17 por Dectina-2 via cascata de sinalização FcRy/Card9, mas que esta diferenciação é inibida quando ocorre o reconhecimento por Mincle em um modelo *in vivo*.

Na resposta imune inata desencadeada por fungos, três tipos de células são considerados essenciais: neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Na CBM a resposta imune se inicia com o reconhecimento pelos neutrófilos, seguido pelos macrófagos. Neutrófilos são responsáveis pela eliminação de patógenos, ou seja, tem efeito fungicida, atuando por meio da fagocitose, degranulação e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), além de produzirem IL-17, ativando linfócitos Th17, essenciais no controle da imunidade em resposta à infecção por fungos (WEAVER, C. T. *et al.* 2013; BREDA, L. C. D. *et al.* 2020). Durante a CBM, este tipo celular está no centro do granuloma e tem efeito fungicida, agindo tanto no recrutamento de células Th17, quanto na eliminação do fungo pela produção de moléculas derivadas de oxigênio e pela fagocitose via fagossomos ativada pela parede celular do fungo (ROZENTAL, S. *et al.* 1996; DONG, B. *et al.* 2014). Breda e colaboradores (2020) observaram pela primeira vez, que neutrófilos são importantes na eliminação de conídios e hifas de *F. pedrosoi* por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e que os receptores TLR2 e TLR4 são essenciais para eliminação de conídios, mas não de hifas.

Os macrófagos são importantes na resposta imune do hospedeiro durante a CBM por agir na resposta granulomatosa e sendo importante células apresentadoras de antígenos (APCs) para linfócitos T (BOCCA, A. L. *et al.* 2006). Já foi observado que macrófagos residentes de tecido não são capazes de eliminar conídios de *F. pedrosoi* e que estes se convertem em hifa no interior dos macrófagos, levando-os à morte celular (FARBIARZ, S. R. *et al.* 1990). Contudo, macrófagos pré-ativados com IFN- γ apresentam função fungistática, reduzindo o crescimento de hifas em seu interior e conseguindo se manter vivos (ROZENTAL, S. *et al.* 1992). Bocca e colaboradores (2006) observaram que macrófagos infectados com *F. pedrosoi* perdem a capacidade de produzir óxido nítrico (NO) mesmo quando estimulados com IFN- γ ou lipopolissacarídeo (LPS), indicando que tal mecanismo pode estar envolvido com a cronicidade observada na CBM. Tais dados corroboram com um estudo *in vivo* que mostrou que a ausência de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ leva à uma infecção mais severa e a um quadro mais grave de CBM (DE SOUSA, M. G. *et al.* 2006) demonstrando a importância das células T no controle da doença.

Células dendríticas (DCs) também são importantes fagócitos e são os principais apresentadores de antígenos responsáveis pela ativação de células T CD4⁺ (WEVERS, B. A. *et al.* 2014), sendo de extrema importância na transição da resposta imune inata para adaptativa (ROMANI, 2011). Contudo, há poucas informações sobre o papel de DCs durante a infecção por *Fonsecaea* e ainda mais sobre seu papel na resposta imune adaptativa, que é de grande interesse para o entendimento da progressão da CBM em humanos, visto que esta é uma doença crônica e tal cronicidade provavelmente está envolvida com a falta de uma resposta robusta de células T e B. Recentemente, foi observado que conídios de *F. pedrosoi* induzem a ativação de DCs em um modelo murino e que esta ativação leva a um aumento de células CD11c⁺ (KIMURA, T. F. E. *et al.* 2020), células essenciais na transição entre a resposta imune inata e adaptativa (SCUMPIA, P. O. *et al.* 2005). Além disso, Siqueira e colaboradores (2017) demonstraram que macrófagos e DCs infectadas por MCs de *F. pedrosoi* produzem citocinas envolvidas com a resposta Th17 e com a supressão da resposta do tipo Th1, com alta produção de IL-6 e IL-1 β e baixa produção de IL-12.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Analisar o papel de moléculas extracelulares produzidas, tanto as EVs quanto os CMs, por células muriformes, hifas e conídios de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* na modulação da resposta imune inata em modelo *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar as EVs produzidas por células muriformes, hifas e conídios de quatro espécies do gênero *Fonsecaea* por meio da quantificação de proteínas e conteúdo esterol, além de analisar seus diâmetros e morfologia, por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), respectivamente.
2. Comparar os padrões imunomodulatórios das EVs e dos CMs produzidos pelas diferentes espécies do gênero *Fonsecaea* a partir de condições nutricionais de cultivo e morfotipos (células muriformes, hifas e conídios) pela dosagem de citocinas via ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA);
3. Investigar o potencial modulador dos CMs de *F. pedrosoi* e *F. erecta* na progressão da CBM por meio de modelo experimental *in vivo* com camundongos Black C.57 WT.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados, neste estudo, camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 (*Mus musculus*) com 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram mantidos em condições sanitárias apropriadas com fornecimento de água e ração *ad libitum*, no biotério do Instituto de Biologia – UnB. Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com as diretrizes do CONCEA e foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Uso Animal da UnB (Protocolo n.º 46/2017).

3.2 Obtenção de BMDMs

Utilizou-se, no decorrer deste estudo, células primárias, mais especificamente macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs). A diferenciação das BMDMs foi realizada a partir de uma cultura de células tronco hematopoiéticas de camundongos da linhagem C57BL/6. Para a extração de células precursoras da medula óssea, o interior de fêmures e tíbias dos camundongos foi lavado com meio RPMI-1649 (Sigma-Aldrich) com o auxílio de uma seringa para a liberação das células da medula. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 300 x g durante 5 minutos e após o descarte do sobrenadante, o precipitado celular foi submetido à ação de uma solução de lise de hemácias (8,3 g/l de cloreto de amônio em 0,01 M de tampão Tris-HCl) (Sigma-Aldrich). Após a remoção do sobrenadante por centrifugação, 2×10^6 células foram ressuspensas em 10 ml de meio para diferenciação composto por RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), além de 20 ng/ml do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos GM-CSF (BioAlbra), 50 μ M de B-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e gentamicina (Gibco). A suspensão foi colocada em placas de petri e acondicionado em estufa à 37 ° C sob atmosfera de 5 % de CO₂.

No terceiro dia de cultivo foram adicionadas mais 10 ml de meio suplementado. No sexto dia de cultivo, metade do volume da placa foi retirado e centrifugado à 300 x g durante 5 minutos, sendo o precipitado celular obtido ressuspensado em 10 ml de meio novo para diferenciação e as células devolvidas à placa de origem. Após oito dias de cultura celular, a monocamada de células aderidas a superfícies da placa (BMDMs) foi recoberta com uma solução enzimática denominada “TrypLE Express” (Invitrogen), durante 20 minutos em estufa a 37 ° C para promover o

desprendimento celular da superfície da placa. Após contagem das células em corante de exclusão azul de tripan (para avaliar viabilidade celular), as BMDMs foram ressuspensas em meio de experimentação (RPMI-1640 acrescido de 10% de SFB) e colocadas em placas de cultura para aderir durante 24 horas. Após este período, o meio foi renovado e deu-se início aos experimentos.

3.3 Fungos

Foram utilizadas quatro espécies distintas do fungo do gênero *Fonsecaea*: *F. erecta*, *F. monophora* (CFP185), *F. nubica* (IAL03) e *F. pedrosoi* (CBS271.37). Todos os fungos foram cultivados em três meios para comparação: meio caldo Batata Dextrose (PDB) em pH 5.6 e meio Butterfield and Johnson tanto em pH 6.5 quanto em pH 2.5 suplementados com 100 mg/l de cloranfenicol a 28°C sob agitação em 120 rpm. A composição do meio BFJ para 1L é: 1,5g de NHNO_3 , 5mL de glicerol 100%, 0,1g de MgSO_4 e 1,8g de KH_2PO_4 , 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de biotina e 0,10 $\mu\text{g/ml}$ de tiamina e no caso do meio BFJ pH 2.5, suplementa-se também com 800 μM de DL-propranolol de propranolol (ALVIANO, D.S. 2003). Para obter propágulos fúngicos com maior capacidade de virulência, os fungos foram cultivados a partir do estoque em meio PDB pH 6.5 por 20 dias em *shaker* a 28° C sob 120 rpm. Após este período os fungos passaram por uma série de filtrações para obtenção de hifas e conídios para infecção *in vivo*. Primeiramente, a massa fúngica foi separada com o auxílio da base do êmbolo de uma seringa, em filtro celular de nylon com poros de 70 μm de tamanho (BD) e lavado com tampão fosfato-salino (PBS,). Em seguida, a suspensão de fungos obtida desta etapa de filtração foi transferida para um filtro celular de nylon com poros de 40 μm de tamanho (BD). O fungo retido neste último filtro foi lavado repetidas vezes com PBS até que esse fungo retido atingisse a proporção 1:3 de (1 de conídios para 3 de hifas), e assim, utilizado como inóculo de propágulos fúngicos. A suspensão celular de fragmentos de hifas e conídios foram centrifugadas a 4000 x g por 5 minutos e em seguida lavada com PBS 1x duas vezes para uso nos experimentos. Após 15 dias de infecção, os animais foram eutanasiados por asfixia em câmara de CO_2 , o tecido do coxim plantar foi coletado e a partir dele feito a recuperação dos fungos viáveis (CFU – *Colony Forming Unit*) em placas de petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (PDA). Após 10 dias de cultivo em estufa a 30 ° C, os fungos foram coletados e cultivados em meio Sabouraud Dextrose Broth (SDB) por 15 dias. Depois foram isolados e

armazenados no estoque de fungos a -80°C do laboratório em uma solução composta por 70% de meio SDB (KASVI) e 30% glicerol 100% (Vetec).

A partir deste estoque foram feitos os cultivos para obtenção das EVs e CMs. Os inóculos do estoque foram adicionados em meio PDA e acondicionados em estufa à 30°C por 10 dias. Após este período, foi feita raspagem das placas seguido da adição de 2 ml de PBS por placa para ressuspensão dos conídios e fragmentos de hifas. Entre 1-2 ml do material ressuspendido foi adicionado em erlenmeyer contendo 250 ml de meio SDB pH 6.5 por 10 dias à 28°C e rotação de 120 rpm. Para obtenção de conídios e hifas, o sobrenadante produzido em SDB pH 6.5 foi então centrifugado e lavado duas vezes com PBS 1x e 1×10^6 células foram adicionadas em 500 mL de PDB pH 5.6 por 20 dias e em 500 mL de BFJ pH 6.5 por 25 dias, ambos à 28°C e rotação de 120 rpm. Para obtenção de células muriformes, o sobrenadante produzido em BFJ pH 6.5 após 25 dias foi então centrifugado e lavado duas vezes com PBS 1x e 1×10^9 células foram adicionadas em 500 mL de BFJ pH 2.5 por 40 dias à 28°C e rotação de 120 rpm.

3.4 Isolamento de vesículas e meio condicionado

Para a obtenção das EVs e dos CMs produzidos pelos fungos, foram utilizados o sobrenadante dos os três meios supracitados PDB pH 5.6, BFJ pH 6.5 e BFJ pH 2.5 cultivados por 20 dias, 25 dias e 40 dias, respectivamente. Tanto o meio PDB pH 5.6 quanto meio BFJ pH 6.5 estimulam o crescimento fúngico tanto na forma conidial quanto na forma filamentosa, formas estas que estão envolvidas com os estágios iniciais da CBM. Já o meio BFJ pH 2.5 promoveu o crescimento de células escleróticas, conhecidas como células muriformes (MC) que representam a forma patogênica do fungo e que está associada aos estágios crônicos da doença. Após os cultivos realizados em diferentes tempos, as células dos fungos foram separadas do sobrenadante por centrifugação à $5000 \times g$ por 15 minutos. O sobrenadante coletado foi filtrado duas vezes por membranas de $0,8 \mu\text{m}$ e $0,45 \mu\text{m}$, respectivamente, para remoção de debris celulares. Em seguida, o filtrado passou por duas ultrafiltrações no Amicon (Sigma-Aldrich) em membranas de 100 kDa e 1kDa (Sigma-Aldrich), respectivamente (Fig.6). O sobrenadante retido na membrana de 100 kDa é rico em EVs e melanina secretada; o filtrado retido entre a membrana de 100 kDa e de 1 kDa representa o CM1 com moléculas secretadas; e o filtrado da membrana de 1 kDa representa o CM2, provavelmente, rico em PAMPs de diferentes pesos moleculares. Para coletar as EVs

presentes no sobrenadante retido na membrana de 100 kDa, o material foi ultracentrifugado a 100.000 x g por 1 hora e o *pellet* formado foi ressuscitado em 300 μ L de PBS. Após o isolamento de ambos os meios condicionados, estes foram armazenados em freezer à -20 ° C por 1 mês e depois em freezer -80 ° C por até 6 meses.

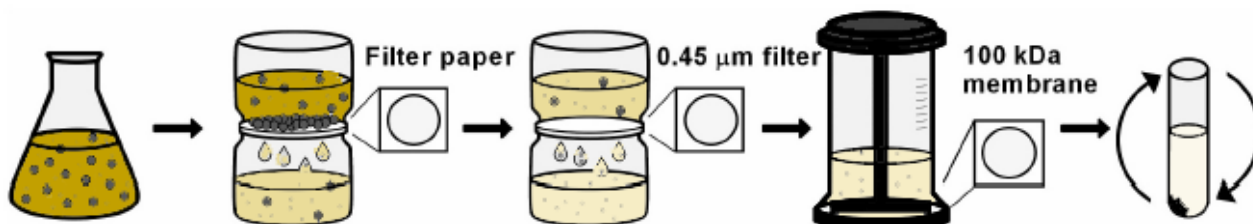


Figura 6 – Etapas no processo de filtração e isolamento de EVs (modificado de Souza, J. A. M. *et al.* 2019).

3.5 Caracterização das vesículas

As EVs foram indiretamente quantificadas por dosagem do conteúdo esterol e proteico por meio de testes colorimétricos como o kit Amplex Red Cholesterol para quantificação de esterol e o kit de Micro BCA para quantificação de proteínas (ambos da Thermofisher Scientific), a partir de protocolo do fabricante. Para ambos os kits, foi realizado uma curva com concentrações padrão de colesterol e albumina sérica bovina (BSA), respectivamente, em uma placa de 96 poços e então foi adicionado as amostras em cada poço e posteriormente adicionou-se a solução coquetel de cada kit, que foi detectada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de fluorescência com excitação em 540 nm e emissão 590 nm para Amplex Red Cholesterol e de absorbância em 562 nm para o kit de Micro BCA.

As EVs foram também caracterizadas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) “Zetasizer Nano ZS” para analisar seus diâmetros hidrodinâmicos e por Microscopia de Transmissão pelo Laboratório de Microscopia e Microanálise da UnB coordenado pela Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão.

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Entre 3-5 mL do sobrenadante contendo as vesículas isoladas, a partir dos diferentes cultivos com *Fonsecaea*, foram ultracentrifugados à 100.000 g por uma hora e ressuscitadas em 50 a 100 μ L de Solução Karnovsky (2% paraformaldeído e 2% glutaraldeído em tampão fosfato 0,1M) para

concentrar as vesículas, por um período mínimo de 24 horas. Como descrito por Karnosvky, 1965, este tampão é utilizado como pré-fixador das proteínas presentes em amostras biológicas para que não ocorra a rápida degradação destas por enzimas. Uma gota desta suspensão foi adicionada sobre uma tela de microscopia de cobre e esperou-se 10 minutos até o material sedimentar. Depois transferiu-se as telas para uma gota de acetato de uranila por mais 10 minutos, que é um metal pesado que irá agir como o contrastante de amostra, gerando a cor preta por meio de elétrons elasticamente espalhados. Após as amostras estarem devidamente secas, foram levadas ao microscópio e as imagens foram obtidas pelo microscópio eletrônico de transmissão “Jeol JEM-1011” com aumento de 15.000 x e 25.000 x de aumento. Todos os reagentes utilizados foram disponibilizados pelo Laboratório de Microscopia e Microanálise da UnB coordenado pela Profa. Dra. Sônia Nair Bão.

3.7 Ensaio de interação *in vitro*

BMDMs (1×10^6 células/ml) foram incubadas a 37 ° C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ em placas de 96 orifícios. As células foram estimuladas, ou não, com LPS (500ng/ml) por 24 horas. Adicionalmente, as células foram estimuladas, também por 24 horas, com EVs ou CMs. A concentração utilizada para EVs é de 80 ng/mL por poço e ressuspende-se os CMs liofilizados em um volume de PBS 1x 10x maior do que o volume original, de acordo com protocolo estabelecido no laboratório. Em ambos os casos, o volume utilizado deve ser 10% do volume total por poço. As EVs foram produzidas a partir dos diferentes meios (PDB pH 5.6; BFJ pH 6.5; BFJ pH 2.5) e por diferentes espécies do gênero *Fonsecaea* (*F. erecta*; *F. monophora*; *F. nubica*; *F. pedrosoi*). Os CM são os obtidos das diferentes membranas, sendo o CM1 o obtido entre 1 e 100 kDa, produzido nos 3 diferentes meios de cultura e pelas 4 espécies estudadas neste trabalho (12 grupos) ou o CM2, obtido do filtrado menor que 1 kDa produzido nos 3 diferentes meios e pelas 4 espécies estudadas neste trabalho (12 grupos) (totalizando 36 grupos). Os estímulos e grupos estão descritos nas legendas das figuras. A partir das 24 horas, alguns grupos de células foram tratadas com 20 µM de nigericina (Invitrogen) por 40 minutos para promover a secreção de IL-1β. Por fim, sobrenadantes foram coletados para quantificação de citocinas por ensaio de ELISA.

3.8 Quantificação de citocinas

Os sobrenadantes obtidos a partir dos ensaios de interação entre macrófagos ou células dendríticas *in vitro* e as EVs ou os CMs foram submetidos a técnicas de ELISA do tipo sanduíche a fim de avaliar os níveis de citocinas TNF, IL-1 β e IL-10, demonstrado em valores absolutos (pg/ml). Foram utilizados kits comerciais Mouse IL-1 β ELISA Ready-SET-Go![®], Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go![®] e Mouse IL-10 Ready-SET-Go![®], todos da Invitrogen, seguindo as recomendações do fabricante. Após a reação colorimétrica entre os reagentes do kit e as amostras, as placas de 96 poços foram analisadas no espectrofotômetro de placa “MultiskanTM FC Microplate Photometer” (ThermoFischer Scientific) no comprimento de onda de 450 nm—A concentração foi determinada comparando a D.O. com uma curva de concentração conhecida da citocina, de acordo com os padrões presentes em cada kit. Dados considerados significativos foram demonstrados com *, quando $P < 0,05$; com **, quando $P < 0,01$; com ***, quando $P < 0,001$; com ****, quando $P < 0,0001$; e com ns, quando $P > 0,05$, em relação ao grupo controle positivo tratado com LPS (TNF e IL-10) ou em relação ao grupo controle positivo tratado com LPS e nigericina (IL-1 β).

3.9 Ensaio de infecção *in vivo* e análise da evolução da doença

Camundongos C57Bl/6 foram infectados, por via subcutânea no coxim plantar com 50 μ L de PBS contendo 10⁶ propágulos fúngicos na proporção 1 de conídios para 3 de fragmentos de hifas (1:3) de *F. pedrosoi* e *F. erecta*. A análise da evolução da doença foi realizada pela avaliação morfométria da lesão formada, feita por meio da medição do diâmetro da lesão duas vezes por semana, com auxílio de paquímetro digital; bem como pela coleta de amostras de tecido infectado para determinação da carga fúngica pela contagem de UFC; e também pela dosagem de TNF e IL-1 β *ex vivo* por ELISA. A partir dos resultados encontrados *in vitro* em relação ao potencial imunoestimulatório dos CMs isolados de *Fonsecaea*, os animais foram tratados no 7^o. e 14^o. dias após a infecção com 25 μ L CM1, CM2 e PBS por pata na área da lesão, sendo eutanasiados após 21 dias pós-infecção. Foram utilizados 3 animais por grupo (n=3 por grupo). Para determinação da carga fúngica das lesões, os fragmentos das área lesionadas foram centrifugados a 1000 x g, ressuspendidos em PBS 1x e posteriormente plaqueados em meio SDA suplementado com

gentamicina mantidas em estufa à 30°C de 7 a 10 dias. A quantidade de células viáveis foi determinadas pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Dados considerados significativos foram demonstrados com *, quando $P < 0,0,5$; com **, quando $P < 0,01$; com ***, quando $P < 0,001$; com ****, quando $P < 0,0001$; e com ns, quando $P > 0,05$, em relação ao grupo controle tratado com PBS.

3.10 Análises estatísticas

Os resultados dos experimentos foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Turkey, sendo os dados obtidos nesses experimentos expressos como a média +- SEM de um experimento representativos de dois ou três experimentos conduzidos em triplicatas. Os experimentos *in vivo* foram analisados por two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Turkey, sendo os dados obtidos nesses experimentos expressos como a média +- SD de um experimento. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prsim versão 9.0. Dados considerados significativos foram demonstrados com *, quando $P < 0,0,5$; com **, quando $P < 0,01$; com ***, quando $P < 0,001$; com ****, quando $P < 0,0001$; e com ns, quando $P > 0,05$.

4. Resultados

4.1 Triagem de diferentes espécies do gênero *Fonsecaea*

Para o início deste trabalho, foram recebidos doze isolados clínicos descritos como *Fonsecaea pedrosoi* com potencial de serem utilizados para análises, tanto do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, como do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto – São Paulo. Após o sequenciamento genético, observou-se que nenhuma das doze espécies eram de fato *F. pedrosoi* e sim, outras espécies do gênero *Fonsecaea*. Três das doze linhagens foram escolhidas para uma primeira triagem *in vivo*: CFP185 (*F. monophora*); IAL03 (*F. nubica*); e DMABH (*Rhinochlaidiella aquaspersa*). A partir da análise de UFC demonstrou-se que *F. nubica* apresentou a melhor capacidade de crescimento em tecido animal do que *F. monophora* e *R. aquaspersa*, apesar das três espécies terem obtido valores semelhantes de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama (Fig. 7B). Além disto, não houve diferença estatística entre as análises de morfometria do coxim plantar (Fig. 7^a), demonstrando que todas as espécies recebidas são virulentas e assim, podem ser utilizadas como modelos de estudo.

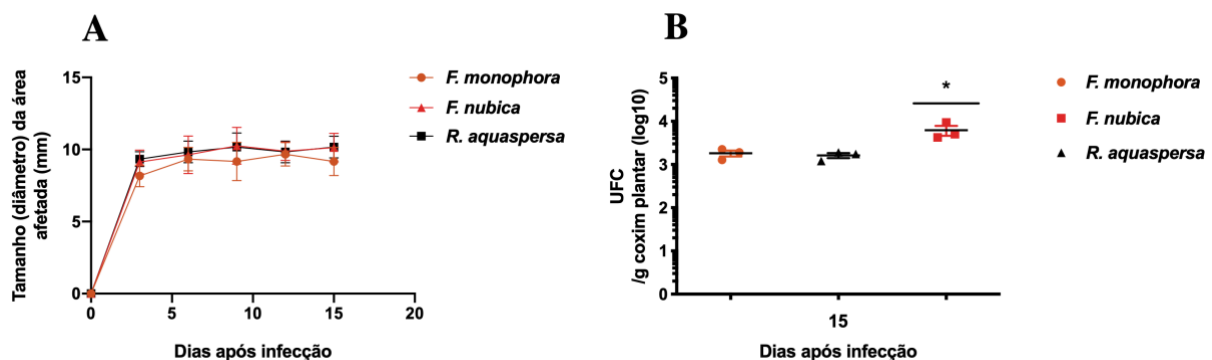


Figura 7. Cinética de infecção *in vivo* com propágulos fúngicos de *F. monophora*, *F. nubica* e *R. aquaspersa*. **(A)** Diâmetro da área da lesão (mm) medido a cada 3 dias. **(B)** Quantificação da carga fúngica no coxim plantar 15 dias após a infecção por meio da cultura do homogenato do tecido em placas de Sabouraud ágar por 10 dias e contagem das unidades de colônia por placa, expressas como UFC/g do tecido lesionado. Os dados são provenientes de um único

ensaio de infecção onde foram utilizados 3 animais/grupo (n=3). * $p \leq 0,05$, em referência à comparação entre cada espécie.

Considerando a capacidade de crescimento das duas amostras testadas anteriormente, estas foram selecionadas para dar continuidade aos experimentos deste estudo, e além disso, foram selecionadas a espécie *Fonsecaea pedrosoi* (CBS 271.37), que é a espécie do gênero *Fonsecaea* mais estudada na literatura para CBM, e o *F. erecta*, que é a única das quatro espécies que foi obtida, originalmente, do meio ambiente e não de isolados clínicos. Ambas as linhagens foram disponibilizadas pelo banco de fungos da UFPR, sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Vânia A. Vicente

Posteriormente, para avaliar a resposta de diferentes morfotipos dos fungos, estes foram cultivados em diferentes condições nutricionais, com diferentes pH, como em caldo batata dextrose (PDB) pH 5.6, Butterfield and Johnson (BFJ) pH 6.5 e BFJ pH 2.5, após 20 dias, 25 dias e 40 dias de cultivo, respectivamente. O meio PDB e o meio BFJ pH 6.5 são utilizados para gerar as formas saprofíticas de *Fonsecaea*, enquanto o meio BFJ pH 2.5 produz a forma patogênica, as células muriformes (MCs). Apesar destes dados não darem informações suficientes para discutir as razões nas diferenças na mudança de pH nos meios de cultura, estes dados demonstram que em todas as situações, o pH não permanece o mesmo do original (Fig. 8). Além disso, o meio PDB e o BFJ pH 6.5 apresentam maiores variações de pH após o cultivo entre as espécies do que em comparação ao meio BFJ pH 2.5. Também pode-se observar que todos os sobrenadantes do meio BFJ pH 5.6 se tornaram mais ácidos após o cultivo dos fungos, enquanto os cultivos no meio PDB se tornaram mais alcalinos (Fig. 8 A-B), independente do isolado cultivado. O meio BFJ pH 2.5 se tornou mais ácido apenas após o crescimento do *F. erecta* e *F. monophora* (Fig. 8C).

Analisando as espécies de *Fonsecaea* de forma independente, estas apresentaram capacidades diferentes, entre si, em modular o pH dos meios em que foram cultivados (Fig. 8). *F. pedrosoi* demonstrou modular menos o pH em todas as condições, obtendo valores semelhantes entre as medições iniciais e finais de pH quando cultivado em meio BFJ, enquanto que a *F. erecta* cultivado no mesmo meio demonstrou ser a que mais modulou os valores do pH, apesar de quando cultivado em PDB é o que menos modulou o pH do meio. Os isolados *F. monophora* e *F. nubica* obtiveram valores do pH semelhantes entre si em RM, levando à uma maior alcalinização do meio (Fig. 8A). Já *F. monophora* e *F. pedrosoi* em BFJ apresentaram valores de pH semelhantes aos iniciais (Fig. 8B e Fig. 8C). Desta forma, podemos observar que as diferentes espécies de *Fonsecaea* promovem

diferentes modulações do pH dos meios de cultura (acidificando ou alcalinizando), em que não se observa um padrão claro entre estas espécies.

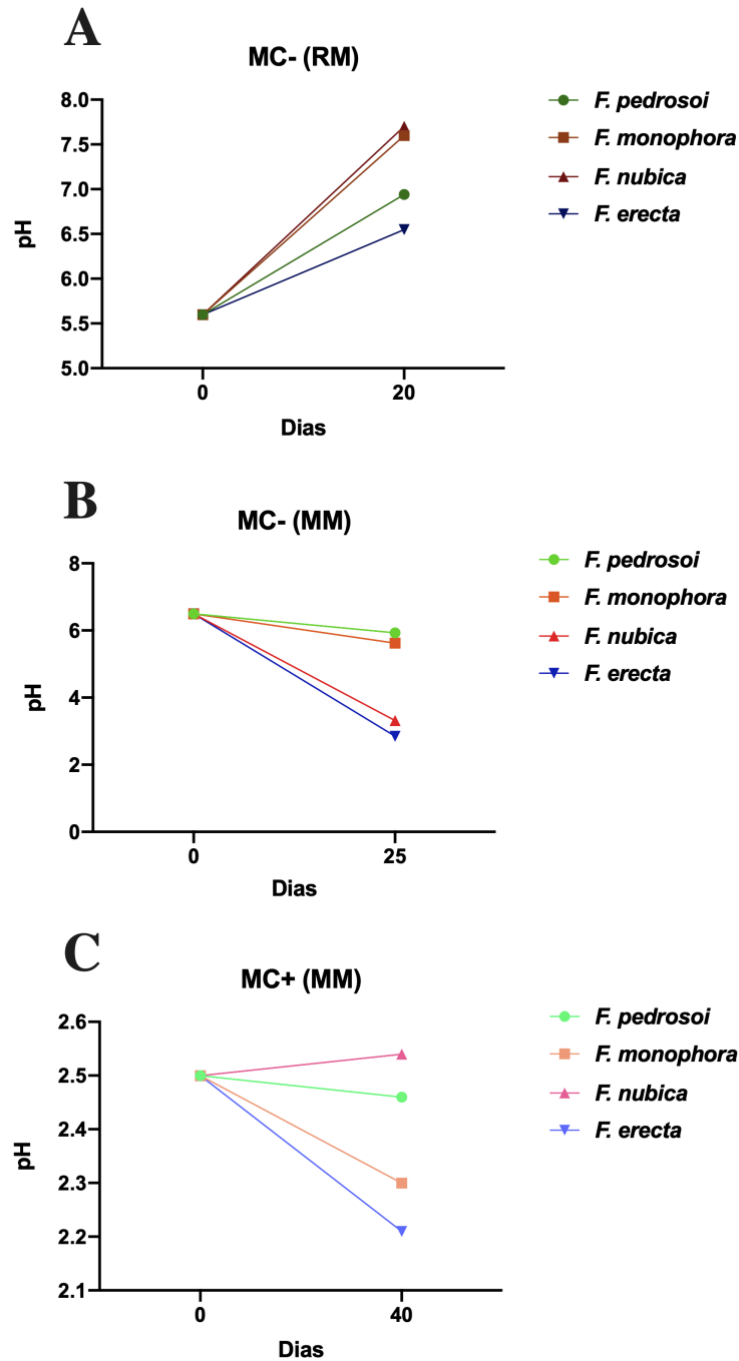


Figura 8. Medição dos valores de pH dos meios de cultura após cultivo com *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta*. Valores de pH dos meios (A) PDB pH 5.6 (RM); (B) BFJ pH 6.5 (MM) ; e (C) BFJ pH 2.5 (MM) após 20 dias, 25 dias e 40 dias de cultivo, respectivamente.

4.2 Caracterização das vesículas extracelulares

Os resultados referentes ao papel imunomodulador na resposta imune inata das moléculas produzidas (EVs e CMs) por *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* foram analisados sob duas perspectivas distintas. A primeira foi em relação a condição nutricional de cultivo, em que foram comparados os efeitos das EVs e CMs produzidos em RM e MM, que apresentaram o crescimento dos isolados nas formas de conídios e hifas. O crescimento ocorreu em meio PDB pH 5.6, que é um meio rico não-definido, descrito aqui como MC- (RM), ou seja, meio rico sem a presença de células muriformes (MCs), ou em meio BFJ pH 6.5 (meio mínimo definido), representado por MC- (MM), ou seja, meio mínimo sem a presença de MCs. Em um segundo momento, o pH foi modificado permitindo a presença dos morfotipos de *Fonsecaea* presentes somente no meio BFJ (MM). No pH 6.5 observou-se somente as formas saprofitas, principalmente conídios, sendo designado MC- MM e outro com pH 2.5 onde observou-se as formas patogênicas do fungo (MCs), e também a presença de conídios e hifas, denominado por MC+ MM, ou seja, meio mínimo com presença de MCs.

Após a obtenção e isolamento das EVs, conforme descrito na metodologia, as mesmas foram caracterizadas, primeiramente, em relação ao seu conteúdo de esterol e de proteínas em ng/mL por dosagem com kit Amplex Red Cholesterol e kit de Micro BCA, respectivamente; ao seu diâmetro (nm), por espalhamento dinâmico de luz (DLS); e pelos seus aspectos visuais, por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A quantificação de esterol e de proteínas, indicadores indiretos da produção de EVs, apontam que as espécies de *Fonsecaea* produziram uma maior quantidade de EVs quando cultivadas em MC- (RM) em relação a quando foram cultivadas em MM, com ou sem a presença de MCs (Fig. 9A e Fig. 9B). Dentre as espécies estudadas, *F. erecta*, no geral, demonstra ser a melhor produtora de EVs, obtendo altas concentrações, tanto de esterol quanto de proteínas, em todas as condições (Fig. 9A e Fig. 9B). Por ser a única espécie originalmente ambiental, possivelmente *F. erecta* possui maior facilidade em crescer em meio de cultura, e assim, produzir EVs, do que quando comparada com as outras três espécies que foram obtidas a partir de isolados clínicos.

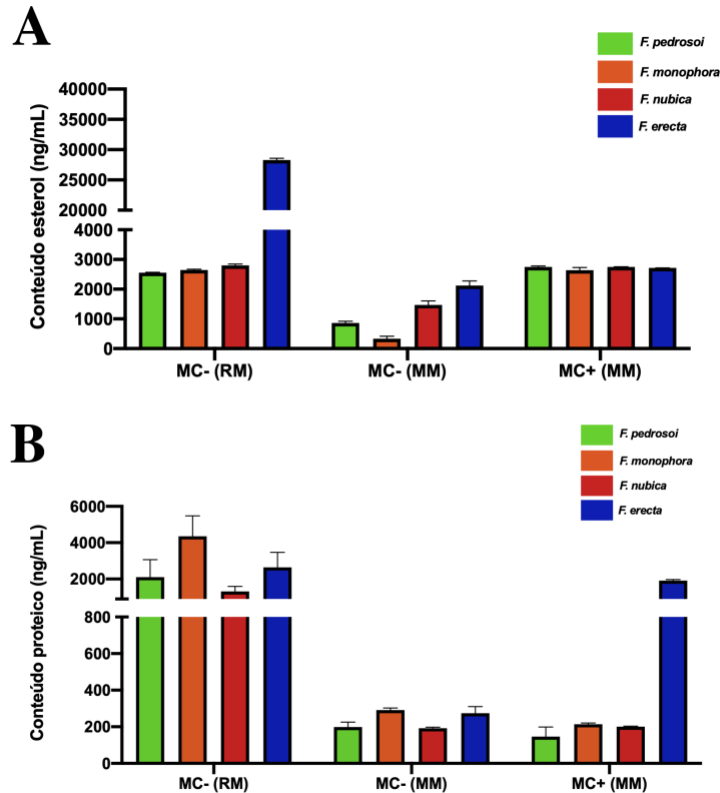


Figura 9. Conteúdo de esterol e proteico nas suspensões das EVs de *Fonsecaea*. *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* foram cultivados em meio PDB pH 6.5, BFJ pH 6.5 e BFJ pH 2.5 por 20 dias, 25 dias e 40 dias, respectivamente. As EVs foram quantificadas em relação ao (A) seu conteúdo de esterol em ng/mL e (B) ao seu conteúdo de proteínas em ng/mL.

A análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi utilizada para verificar as diferenças hidrodinâmicas e na polidispersão das EVs presentes nas amostras. Em relação as diferenças hidrodinâmicas das EVs entre as espécies de *Fonsecaea*, observamos que em todas as condições de cultivo, as EVs produzidas apresentaram, no geral, entre dois (*F. monophora* e *F. nubica*) e três (*F. pedrosoi* e *F. erecta*) picos de intensidade (%), indicando que estas espécies produzem EVs que podem ser divididas em três grupos de acordo com seu tamanho, variando entre 10-150nm, 200-600nm e 650-1500nm (Fig. 10A-D). Na literatura, existem vários trabalhos indicam que as EVs produzidas por fungos podem variar consideravelmente não só em função, mas em dimensão, sendo observadas, majoritariamente, EVs com tamanhos entre 50-800nm, o que corrobora com os dados encontrados neste trabalho (revisado por BIELSKA, E. & MAY, R. C. 2019). As EVs

maiores que 400nm são, possivelmente, aglomerados de EVs e não EVs isoladas, como indicado pela MET (Fig. 11) em que se pode verificar que estas vesículas tendem a permanecer juntas na amostra. Ainda mais, o tamanho das EVs, no geral, apresenta grande heterogeneidade tanto entre as espécies (Fig. 10A-D), quanto entre as condições em que foram produzidas (Fig. 10E-G). Entre as espécies estudadas, *F. pedrosoi* e *F. erecta* (três picos de intensidade) apresentam ter uma população de EVs mais heterogêneas do que as de *F. monophora* e *F. nubica* (dois picos de intensidade), que possuem, principalmente, EVs com diâmetros entre 50-600nm (Fig. 10A-D).

Quando o tamanho destas EVs é comparado em relação as condições em que foram produzidas (MC- RM x MC- MM x MC+ MM), observamos que as vesículas produzidas por MC+ MM são as mais homogêneas em dimensão comparadas as dos outros grupos (Fig. 10 G). Já quando são produzidas em MM na ausência de MCs, as EVs apresentam maior heterogeneidade de tamanho em relação à MC- (RM) e MC+ (MM) (Fig. 10F). As EVs produzidas por MC- (RM) parecem ter variações de tamanho intermediárias (Fig. 10E), entre o que foi observado para MC+ (MM) (menos heterogêneas) (Fig. 10G) e para MC- (MM) (mais heterogêneas) (Fig. 10F). Além disso, as EVs produzidas a partir de MC- (RM) e MC+ (MM), principalmente esta última, demonstram possuir dimensões menores e EVs produzidas por MC- (MM), dimensões maiores. Desta forma, EVs produzidas em RM sem a presença de MCs e em MM com a presença de MCs, tendem a produzir EVs menores, enquanto estas são maiores quando produzidas a partir de MM sem a presença de muriformes. Por fim, *F. pedrosoi* demonstra ter EVs com tamanhos entre 50-200nm; entre 250-700nm; e entre 750-1.500nm. *F. monophora* apresenta EVs com dimensões entre 10-100nm e entre 150-500nm. *F. nubica* possui EVs com tamanhos entre 10-100nm e entre 150-500nm. Já *F. erecta* demonstra possuir EVs com dimensões entre 10-150nm; entre 200-500nm; e entre 500-1500nm

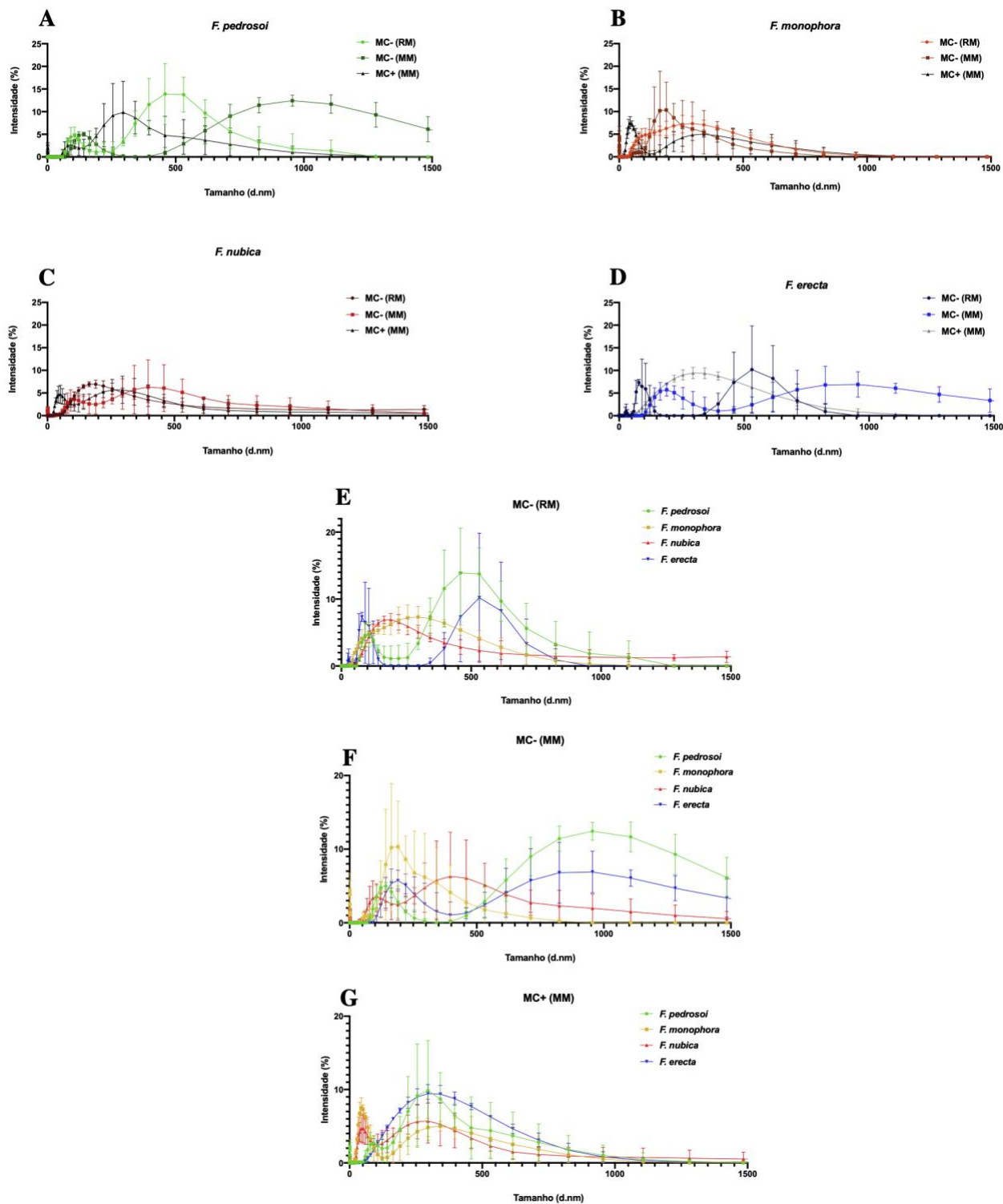


Figura 10. Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão analisado por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das EVs isoladas e produzidas por *Fonsecaea*. Picos de intensidade (%) para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta*, quando cultivadas a partir de (E) MC- (RM) (PDB pH 5.6), (F) MC- (MM) (BFJ pH 6.5) e MC+ (MM) (BFJ pH 2.5), por 20, 25 e 40 dias, respectivamente.

Corroborando com os dados supracitados referentes à heterogeneidade nas dimensões das EVs produzidas por *Fonsecaea*, a MET permitiu visualisarmos que realmente há uma grande variação nos tamanhos e formatos das vesículas isoladas de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* em diferentes condições (Fig. 11A-D).. Além disso, a MET permitiu observar que, aparentemente, existem diferentes tipos de EVs, algumas com formato menos definido, menores, formando aglomerados (Fig. 11A referente à MC- RM e Fig. 11D referente a MC- MM e MC+ MM); outras com o formato mais bem definido e com tamanhos variados, em que visualiza-se a membrana plasmática dobrada (como as de *F. pedrosoi* MC- MM e as de *F. monophora* MC+ MM, p. ex.) (Fig. 11A-B); algumas com um formato mais arredondado e dimensões mais variadas (como as de *F. nubica* em MC- MM e as de *F. erecta* em MC- MM, p. ex.) (Fig. 11C-D); e outras associadas à moléculas que não são EVs, que serão abordadas na discussão (como as de *F. pedrosoi* em MC+ MM (Fig. 11A). Além disso, a MET demonstrou, em todos os casos, que há a presença de melanina associada às EVs (Fig. 11A-D) e de aglomerados de EVs presentes nas amostras.

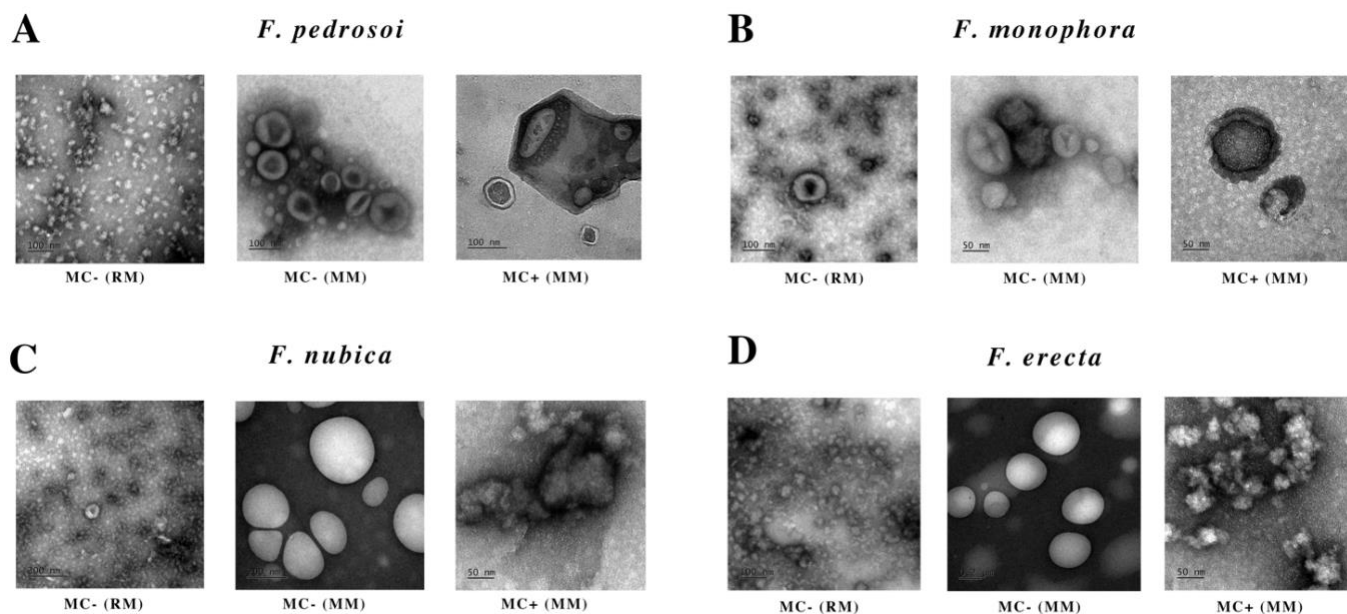


Figura 11. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das EVs produzidas por *Fonsecaea*. EVs de (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* quando cultivadas a partir de (E) MC- (RM) (PDB pH 5.6), (F) MC- (MM) (BFJ pH 6.5) e MC+ (MM) (BFJ pH 2.5), por 20, 25 e 40 dias, respectivamente (as escalas estão presentes nas fotografias).

EVs produzidas pelas formas saprofíticas de *Fonsecaea* em meio rico possuem maior capacidade de ativar uma resposta pró-inflamatória *in vitro* comparadas com EVs produzidas em meio mínimo

Verificou-se primeiro se as EVs produzidas por *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* produzidas por conídios e hifas possuem a capacidade de estimular a produção de TNF, IL-1 β e IL-10 *in vitro*. O TNF e a IL-1 β são duas citocinas pró-inflamatórias essenciais na modulação da resposta imune inata do hospedeiro e estão relacionadas com o estabelecimento do processo inflamatório e a transição para a resposta imune adaptativa. Também se associam com o estabelecimento das resposta inflamatória crônica de certas doenças fúngicas em humanos (GAZENDAM, R. P. *et al.* 2016).

A produção destas citocinas foram analisadas a partir da interação de BMDMs co-cultivados com EVs e CMs (CM1 e CM2) isolados de *Fonsecaea* por 24h, conforme descrito na metodologia. O padrão na produção TNF a partir de BMDMs co-cultivados com EVs produzidas pelas formas saprofíticas de *F. pedrosoi*, *F. nubica* e *F. monophora*, e *F. erecta*, em meio RM demonstraram maior capacidade em induzir a produção de TNF em níveis similares aos BMDMs estimulados com LPS. As EVs em MM do *F. pedrosoi* induziram menores níveis de produção de TNF quando comparados com as EV obtidas do RM, no entanto em níveis maiores que os macrófagos não estimulados (Fig. 12A). As EVs em MM do *F. monophora* apresentaram o mesmo padrão de ativação dos macrófagos que as EVs obtidas do RM em que em ambos os casos suas EVs são capazes de estimular a produção de TNF sem a presença de LPS (Fig. 12B). Já as EVs de *F. nubica* em RM conseguiram estimular a produção de TNF, enquanto em MM, não (Fig. 12C). Por fim, as EVs de *F. erecta* demonstraram não serem capazes de estimular a produção de TNF nem quando isoladas de RM, nem de MM (Fig. 12D). Assim, EVs de *Fonsecaea* obtidas de RM demonstraram estimular a produção de TNF por si só e quando são isoladas de MM não conseguem promover a produção desta citocina.

Em relação a produção de IL-1 β , observa-se que as EVs produzidas por *Fonsecaea*, com exceção de *F. erecta*, tanto a partir de RM quanto a partir de MM conseguiram ativar a produção desta citocina na ausência de LPS (Fig. 13A-D), indicando que as EVs produzidas pelas formas saprofíticas, independente da condição nutricional de cultivo, possuem a capacidade de agir como o primeiro sinal, ou seja, o sinal extracelular na ativação da produção de IL-1 β . Além disso,

observa-se que as EVs produzidas por *F. erecta* não possuíram a capacidade nem de ativar, nem de inibir a produção de IL-1 β , indicando que talvez as EVs de espécies ambientais de *Fonsecaea* não possuam a capacidade de ativar o inflamassoma, diferentemente das espécies patogênicas. Assim, as EVs produzidas por *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica* em RM estimulam a produção de TNF e agem como primeiro sinal na produção de IL-1 β , enquanto EVs produzidas pelas mesmas espécies em MM apresentam uma menor produção de TNF na presença de LPS e agem como primeiro sinal na produção de IL-1 β . Por fim, as EVs de *F. erecta* não possuem capacidade de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*.

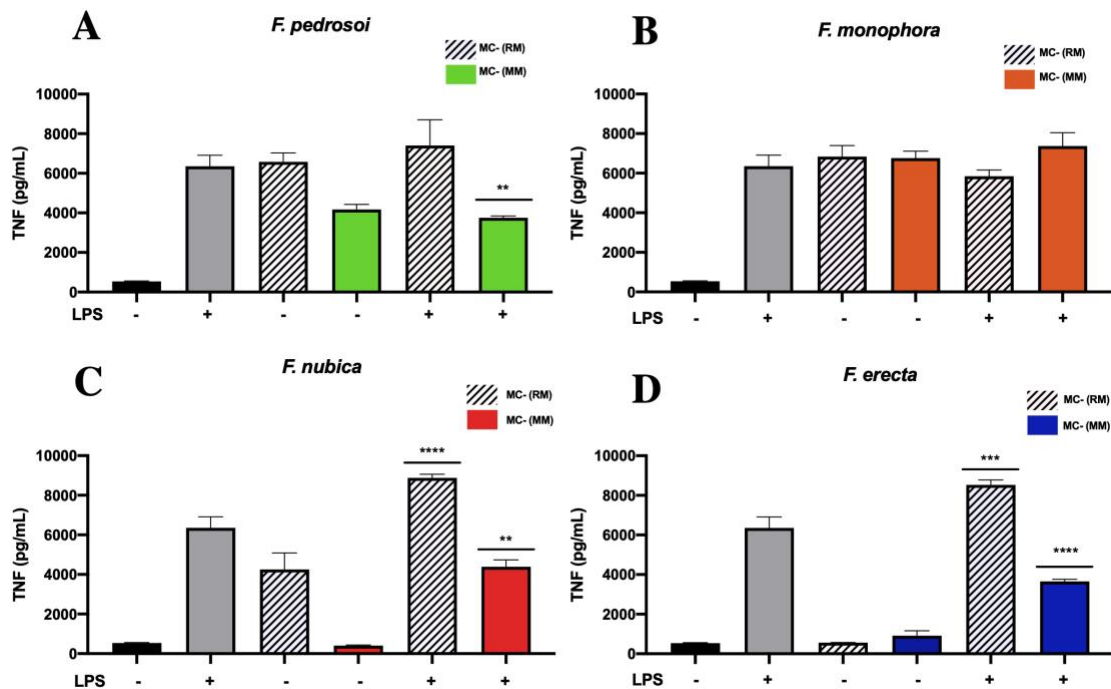


Figura 12 – Quantificação de TNF por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas por conídios e hifas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de TNF para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* cultivados a partir de meio PDB pH 5.6 (RM) e meio BFJ pH 6.5 (MM) após 24h de interação, estimuladas com ou sem LPS. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS *P< 0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

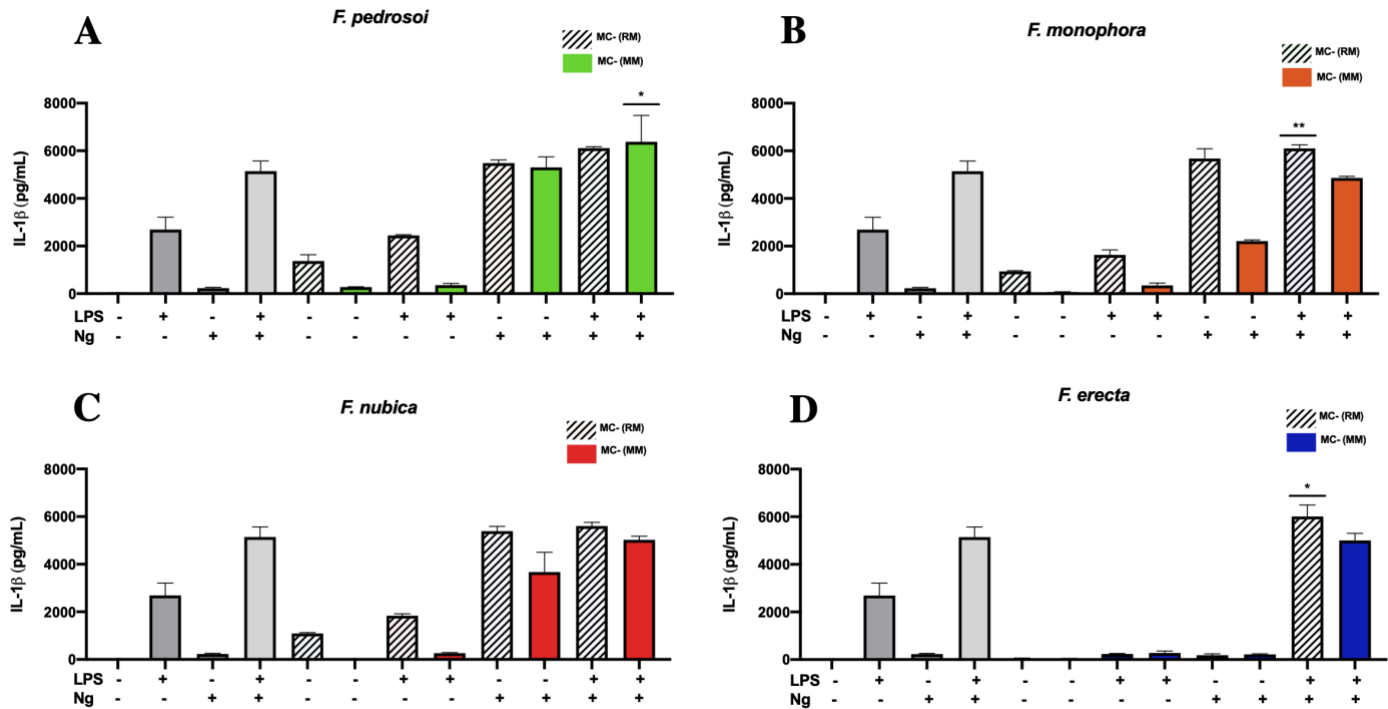


Figura 13 – Quantificação de IL-1 β por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas por conídios e hifas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de IL-1 β para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* cultivados a partir de meio PDB pH 5.6 (RM) e meio BFJ pH 6.5 (MM) após 24h de interação, estimulados com ou sem LPS e/ou nigericina. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS+NG *P<0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

As EVs produzidas por diferentes morfotipos de *Fonsecaea* tendem a agir como segundo segundo sinal na ativação de IL-1 β , apesar de possuírem diferentes papéis imunoestimulatórios na produção de TNF e IL-1 β *in vitro*

A produção de citocinas induzidas pelas EVs produzidas somente pelas formas saprofíticas (MC- MM) e de EVs produzidas pela forma patogênica em conjunto com conídios e hifas de *Fonsecaea* (MC+ MM) em MM foram analisadas e, em relação a produção de TNF, verificou-se que apenas as EVs de *F. pedrosoi* produzidas por MC-(MM) conseguiram estimular a produção desta citocina sem a presença de LPS. Ainda mais, pode-se observar que, com exceção do *F. pedrosoi*, as EVs produzidas nos dois meios testados não ativaram a produção de TNF (Fig. 14A-D). Vale ressaltar que de acordo com os dados encontrados na Figura 11, por meio da MET, que existem fragmentos, possivelmente, de parede celular melanizados em conjunto com as EVs

obtidas de MCs, e tais estruturas também podem ter algum papel na produção das citocinas analisadas, apesar de que não foi estudado o papel das EVs e destes fragmentos isoladamente.

As EVs produzidas por MC+MM de *F. nubica* e *F. erecta* reduziram a produção desta citocina, mesmo na presença de de LPS (Figura 14C-D). Estes dados indicam que, no geral, as EVs produzidas tanto pelas formas saprofiticas, quanto pelas formas patogênicas em MM não apresentam capacidade de estimular a produção de TNF.

Em relação a produção de IL-1 β , podemos observar que, no geral, as EVs produzidas em MM tenderam a agir como o segundo sinal (sem a presença de NG, mas com a presença de LPS) na ativação de IL-1 β entre todas as espécies, apesar dos níveis de produção desta citocina não serem tão altos quanto o controle positivo (com LPS e NG) (Fig. 15). Já para *F. pedrosoi*, a presença de EVs produzidas a partir de MC+ (MM) com LPS + NG inibiram a produção de IL-1 β , enquanto este mesmo efeito é observado com as EVs *F. monophora* e *F. erecta* isoladas de MC- (MM) (Fig. 15A-D). Em conjunto com os resultados encontrados para TNF, os dados indicam que as EVs produzidas por diferentes morfotipos de *Fonsecaea* possuem padrões de imunomodulação de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* variados e que, no geral, tendem a inibir a produção de IL-1 β , e TNF.

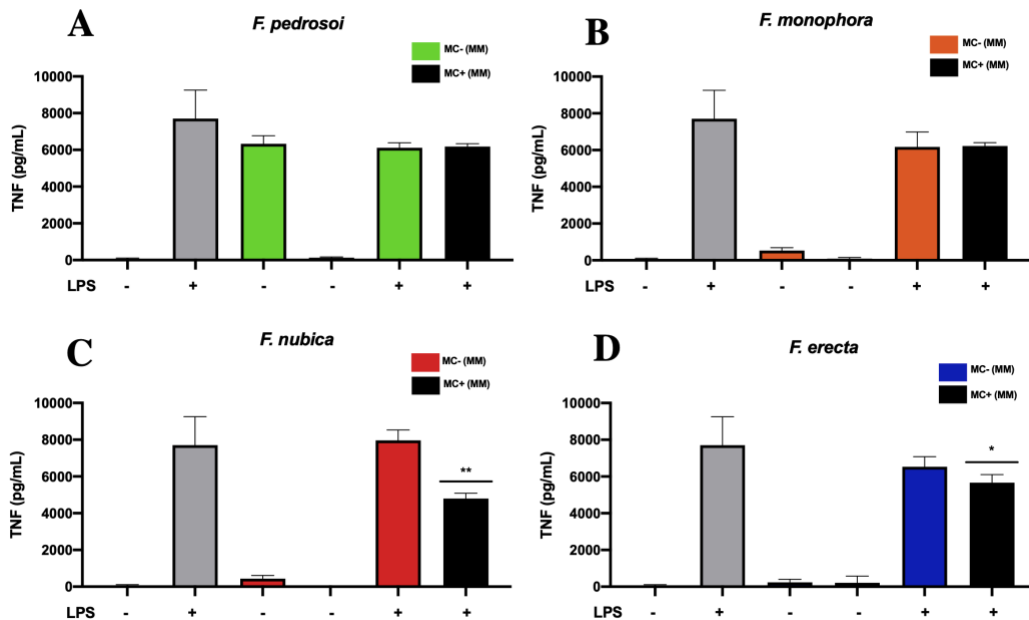


Figura 14 – Quantificação de TNF por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofiticas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de IL-

10 para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* cultivados a partir de meio BFJ pH 6.5 (MM) e em meio BFJ pH 2.5 (MM pH 2.5) após 24h de interação, estimuladas com ou sem LPS. representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS *P< 0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

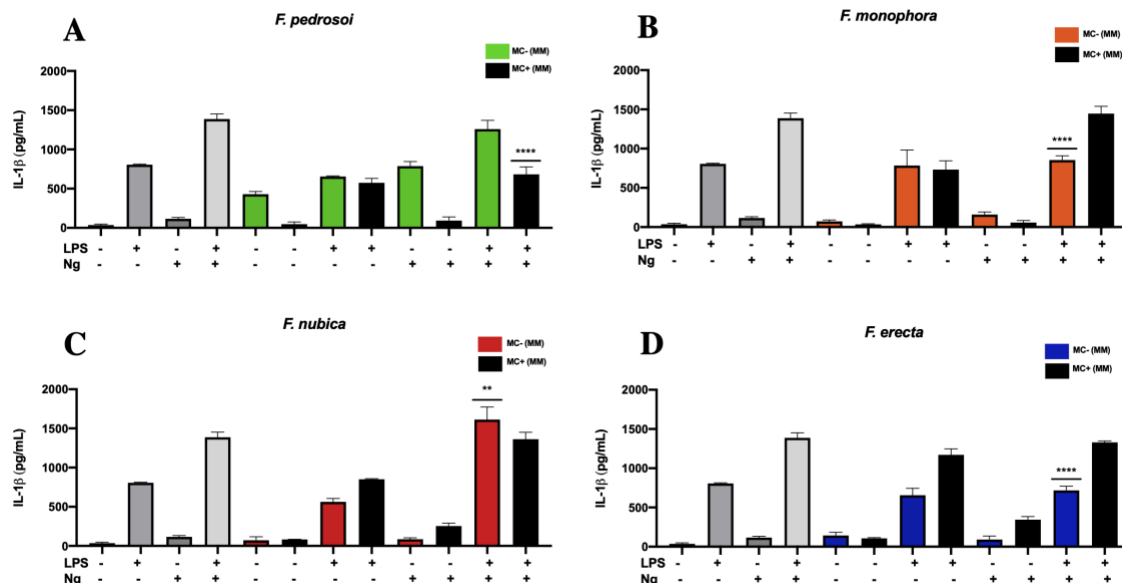


Figura 15 – Quantificação de IL-1β por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofíticas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de IL-1β para *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* cultivados a partir de meio BFJ pH 6.5 (MM) e em meio BFJ pH 2.5 (MM pH 2.5) após 24h de interação, estimuladas com ou sem LPS e/ou nigericina. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS+ NG *P< 0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

As EVs produzidas pelas formas saprofíticas de *Fonsecaea* em meio rico estimulam mais a produção de IL-10 do que em meio mínimo na presença ou ausência de células muriformes

Após verificar os padrões nos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1β, a partir da interação de BMDMs com EVs produzidas tanto em condições nutricionais diferentes, quanto por morfotipos do fungo distintos, analisamos a produção de IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória envolvida com o controle de doenças. Esta citocina também está relacionada ao desbalanço da resposta imune do hospedeiro, como já foi observado para pacientes infectados e que apresentaram a forma mais severa da CBM, em que notou-se altos níveis de produção de IL-10 e baixos de IFN-γ, além de baixa proliferação de células T (GIMENES, V. M. F. *et al.* 2006).

Quando comparamos o papel das EVs produzidas a partir de RM e MM, os resultados demonstraram um padrão semelhante entre todas as espécies, em que as EVs produzidas em RM conseguiram ativar a produção de IL-10 (Fig. 16A-D), enquanto as EVs isoladas de MM, com exceção de *F. monophora*, também demonstraram ativar a produção de IL-10 em níveis semelhantes ao controle com LPS, porém em níveis menores do que EVs produzidas em RM (Fig. 16A-D). Esses resultados indicam que as EVs produzidas pelas formas saprofíticas de *Fonsecaea* tanto em RM, quanto em MM, ativam a produção de IL-10, apesar de que as EVs obtidas de RM demonstraram serem as que mais promovem níveis significativos da produção desta citocina.

A produção de IL-10 entre as EVs, quando comparadas em relação ao morfotipo e não a condição nutricional, ou seja, entre EVs geradas por MC- (MM) e por MC+ (MM), apontaram que as EVs produzidas por *F. pedrosoi* e *F. nubica* tanto na ausência, quanto na presença de MCs, ativaram a produção de IL-10 (Fig. 17A e Fig. 17C). As EVs de *F. erecta* obtidas por MC- (MM) também conseguiram estimular a produção de IL-10, enquanto por MC+ (MM) não (Fig. 17D). Já as EVs isoladas de *F. monophora* tanto por MC- (MM), quanto por MC+ (MM) não estimularam a produção desta citocina por BMDMs (Fig. 17B). Tais dados demonstram que EVs produzidas pelas formas saprofíticas de *Fonsecaea* em RM e em MM, principalmente em RM, levam a produção significativa de IL-10 e que as EVs isoladas a partir de MM na presença de MCs, estimulam menos a produção desta citocina. Assim, em conjunto com os dados observados anteriormente para TNF e IL-1 β , as EVs em RM demonstram ser as vesículas com maior capacidade de estimular a resposta imune inata em comparação as EVs obtidas em MM, visto que são as que mais estimulam a produção destas citocinas *in vitro*.

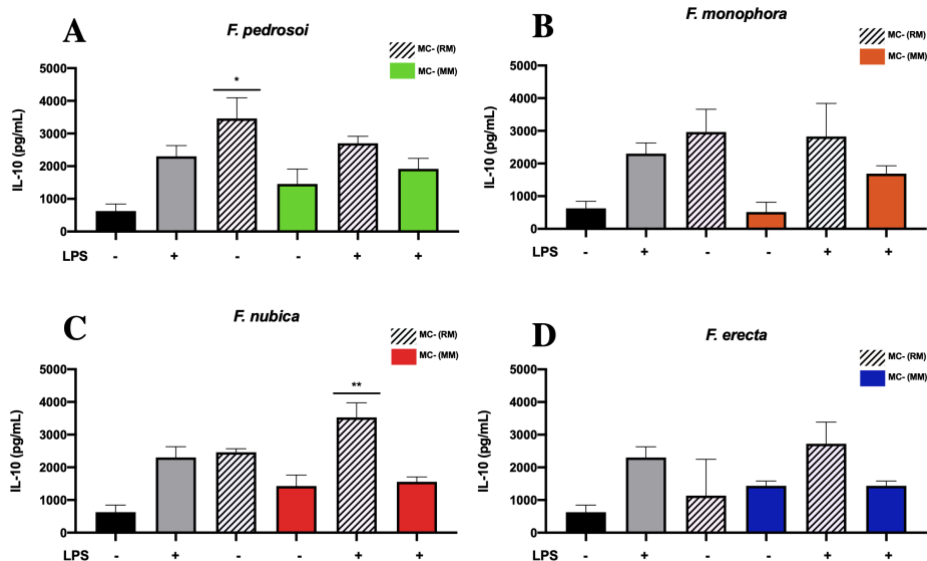


Figura 16 – Quantificação de IL-10 por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas por conídios e hifas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de IL-10 para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* cultivados a partir de meio PDB pH 5.6 (RM) e meio BFJ pH 6.5 (MM) após 24h de interação, estimuladas com ou sem LPS. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS *P< 0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

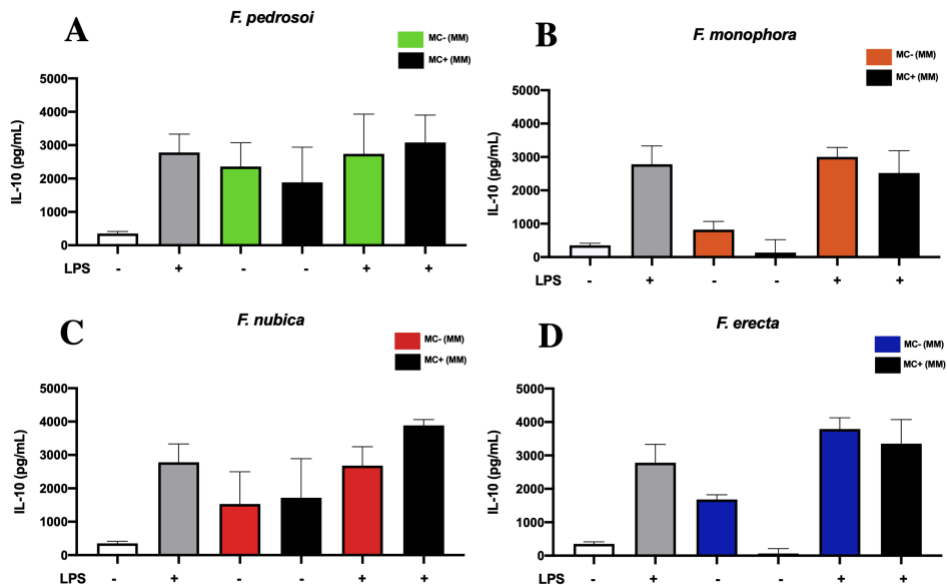


Figura 17 – Quantificação de IL-10 por ELISA após co-cultura de BMDMs com EVs produzidas tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofiticas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de IL-10 para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* cultivados a partir de meio BFJ pH 6.5

(MM) e em meio BFJ pH 2.5 (MM pH 2.5) após 24h de interação, estimuladas com ou sem LPS. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS *P< 0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

4.3 Caracterização dos meios condicionados

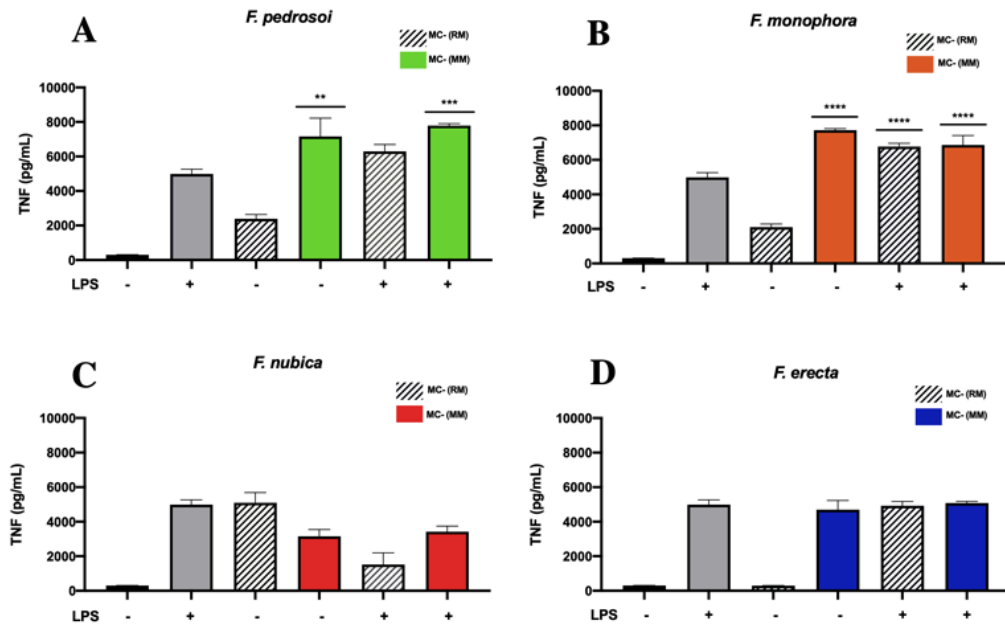
Nesta etapa do trabalho foi analisada a capacidade dos meios condicionados (CMs) produzidos por *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* em estimular a produção de TNF, IL-1 β e IL-10 *in vitro*. O CM foi categorizado em dois tipos: o CM1 (100kDa>CM>1kDa) e o CM2 (CM2<1kDa). Em um primeiro momento, foram comparados os papéis dos CMs produzidos pelas formas saprofiticas de *Fonsecaea* cultivados em condições nutricionais diferentes: ou em RM (PDB pH 5.6) ou em MM (BFJ pH 6.5) na produção de TNF, IL-1 β e IL-10 por BMDMs *in vitro*. Depois, analisou-se o papel destes CMs quando produzidos por diferentes morfotipos de *Fonsecaea*: ou na ausência (MC- MM) ou na presença de células muriformes (MC+ MM).

As moléculas presentes nos CMs de *Fonsecaea* isolados a partir de meio mínimo possuem maior capacidade em estimular os níveis desta citocina do que em meio rico

Para observar se estes CMs possuem a capacidade de imunomodular a resposta imune inata *in vitro*, dosou-se a quantidade de TNF a partir da interação das moléculas presentes no CM1 e CM2 de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* co-cultivados com BMDMs por 24h (Fig. 18A-H). Pode-se observar que há um padrão semelhante em relação a produção de TNF entre o CM1 e o CM2 de todas as espécies, em que as moléculas presentes nos CMs gerados a partir de MM conseguiram estimular a produção desta citocina sem a presença de LPS em níveis semelhantes ao controle positivo, enquanto os CMs produzidos a partir de RM não conseguiriam promover a produção desta citocina (Fig. 18). Contudo, as moléculas presentes nos CMs de *F. nubica* demonstraram ativar a produção de TNF tanto quando obtidos de RM, quanto de MM, diferentemente das outras espécies estudadas quando comparadas ao controle positivo (Fig. 18C e Fig. 18D). Desta forma, as moléculas extracelulares presentes no CM1 e CM2 de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* em MM conseguem promover a produção de TNF por BMDMs sem a presença de LPS, demonstrando terem papel pró-inflamatório. Em relação as moléculas produzidas em RM, apenas o CM1 e CM2 de *F. nubica* conseguem estimular a produção de TNF

por si só, enquanto os CMs das outras espécies nesta mesma condição não conseguem. Indicando que os CMs produzidos por *Fonsecaea sp* a partir de MM tem maior capacidade de estimular a produção de TNF do que em RM.

CM1



CM2

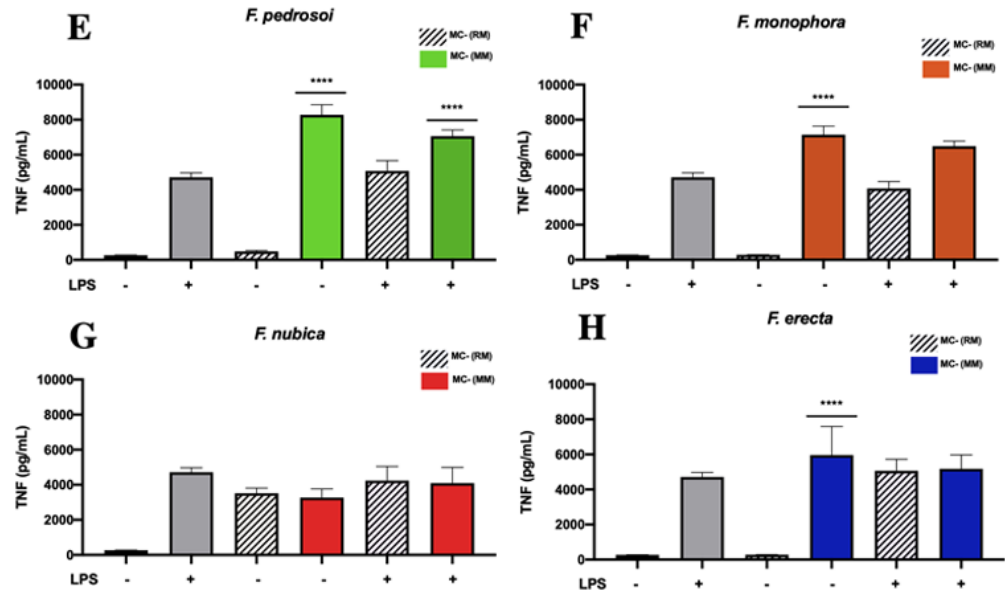


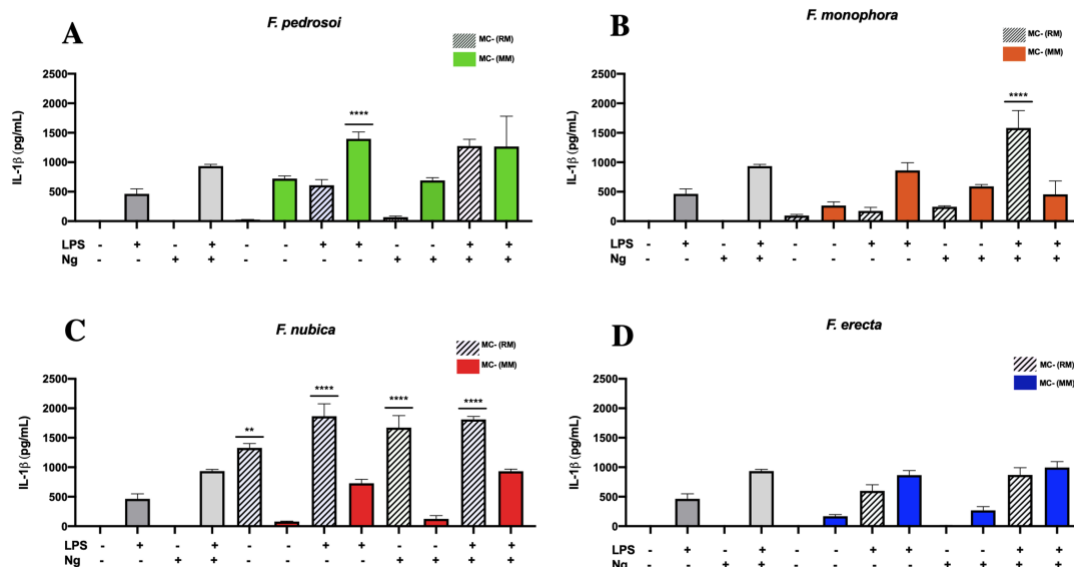
Figura 18 – Quantificação de TNF por ELISA após co-cultura de BMDMs com o CM1 (100kDa>CM>1kDa) e com CM2 (<1kDa) produzido por conídios e hifas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de TNF para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* e com o CM2 (E-H) cultivados a partir de meio PDB pH 5.6 (RM) e meio BFJ pH 6.5 (MM) após 24h de interação, estimuladas com ou sem LPS. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS *P< 0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

O CM1 produzido pelas formas saprofíticas de *Fonsecaea* agem como primeiro e/ou segundo sinal na produção de IL-1 β , enquanto o CM2 tende a inibir esta produção

Em relação a produção de IL-1 β a partir da interação de BMDMs com o CM1 (100kDa>CM<1kDa), observa-se que o CM1 de *F. pedrosoi*, produzido a partir de MC- MM agiu como primeiro e segundo sinal (com ou sem a presença de LPS e/ou de NG) (Fig. 19A), da mesma forma que foi observado para o CM2 desta espécie (Fig. 19E), enquanto em RM, os CMs de *F. pedrosoi* conseguiram agir somente como o segundo sinal (na ausência de NG). As moléculas presentes nos CM1 de *F. monophora* e *F. erecta* obtidos de MM também conseguiram estimular a produção de IL-1 β sem a necessidade de NG, agindo como segundo sinal na produção dessa citocina (Fig. 19B e Fig. 19D). Tais resultados são opostos aos observados para *F. nubica*, em que o CM1 produzido em RM promoveu a produção de IL-1 β com ou sem a presença de LPS e/ou NG, agindo como primeiro e segundo sinal na ativação desta citocina e quando obtido de MM, agiu somente como segundo sinal (Fig. 19C). Desta forma, o CM1 obtido a partir de MM de *F. pedrosoi* age como primeiro e segundo sinal na produção de IL-1 β , enquanto o CM1 de *F. monophora* e *F. erecta* na mesma condição agem apenas como segundo sinal. Já o CM1 de *F. nubica* obtido a partir de RM, e não em MM, age como primeiro e segundo sinal na produção de IL-1 β . Assim, pode-se observar que, com exceção de *F. nubica*, o CM1 em MM tende a aumentar os níveis de IL-1 β em comparação ao CM1 obtido de RM.

As moléculas presentes no CM2 (<1KDa) obtidos tanto de RM, quanto de MM, com exceção de *F. pedrosoi*, apresentaram um padrão de secreção diferente de IL-1 β (Fig. 19E-H). O CM2 de *F. pedrosoi* é o único que estimulou a produção desta citocina mesmo com ou sem a presença de LPS e/ou NG, apontando que o CM2 de *F. pedrosoi* também consegue agir como primeiro e segundo sinal na ativação de IL-1 β , semelhante ao padrão observado para o CM1 isolado desta espécie. No geral, as moléculas presentes no CM2 de *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta*, e não *F. pedrosoi*, demonstram não conseguir gerar níveis significativos de IL-1 β e que tendem a inibir a produção desta citocina na presença de LPS e NG (Fig. 19E-H). Desta forma, o CM2 apresentar ter capacidade mais inibitória em relação a produção de IL-1 β quando comparado com as moléculas presentes no CM1 das espécies de *Fonsecaea* estudadas.

CM1



CM2

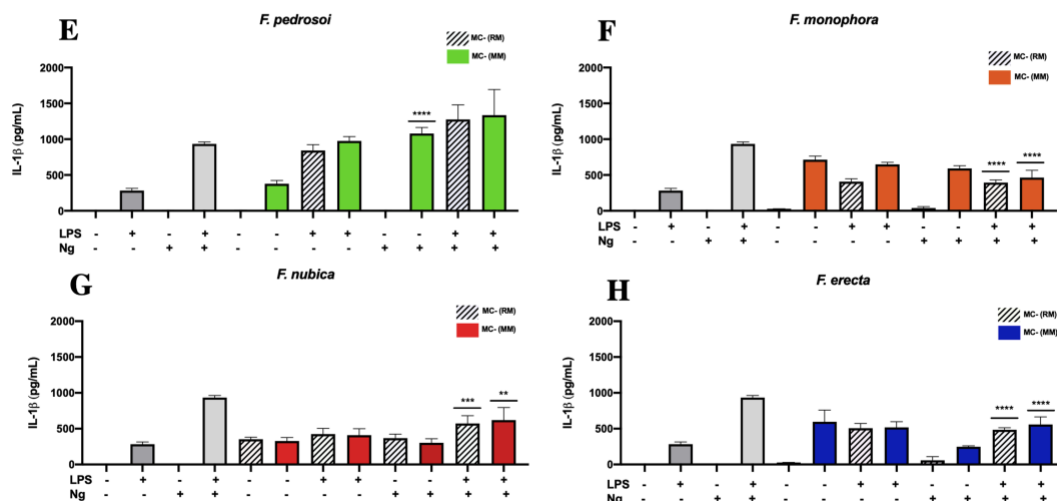


Figura 19 – Quantificação de IL-1 β por ELISA após co-cultura de BMDMs com CM1 (100kDa>CM>1kDa) e com CM2 (<1kDa) produzido tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprófitas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de IL-1 β para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* e com o CM2 (E-H) cultivados a partir de meio BFJ pH 6.5 (MM) e em meio BFJ pH 2.5 (MM pH 2.5) após 24h de interação, estimulados com ou sem LPS e/ou nigericina. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS+NG *P<0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

As moléculas presentes nos CMs produzidos por *Fonsecaea* em meio mínimo tem maior capacidade em estimular os níveis de IL-10 do que em meio rico

As moléculas presentes no CM1 e no CM2 obtidos de MM por *F. pedrosoi* e *F. monophora* tem o mesmo padrão de ativação de IL-10 entre si (Fig. 20). Os CMs isolados de RM de *F. pedrosoi* não foram capazes de induzir a secreção de IL-10 na ausência de LPS, diferentemente do MC-MM (fig 20^a, E). Este padrão do MC-RM sozinho foi observado também para o *F. monophora* e *F. erecta* (Fig 20 B, D, F e H). O CM1 e CM2 apresentaram o padrão inverso quando obtidos do *F. nubica* que elevou a produção significativa de IL-10 em MC-RM, enquanto em MM não (Fig. 20C e Fig. 20G). O CM1 obtido a partir de MM de *F. nubica* e *F. erecta* levaram a inibição de IL-10 na presença de LPS (Fig. 20F). As moléculas presentes no CM2 isolados de MM por *F. nubica*, *F. monophora* e *F. erecta* inibiram a produção de IL-10 na presença de LPS (Fig. 20F-H). Estes dados indicam que os CMs produzidos por *Fonsecaea* em MM, no geral, estimulam a produção de IL-10 por si só. Assim, pode-se observar que as moléculas presentes nos CMs isolados a partir de MM ativam mais produção de IL-10 quando comparados com os CMs produzidos em RM.

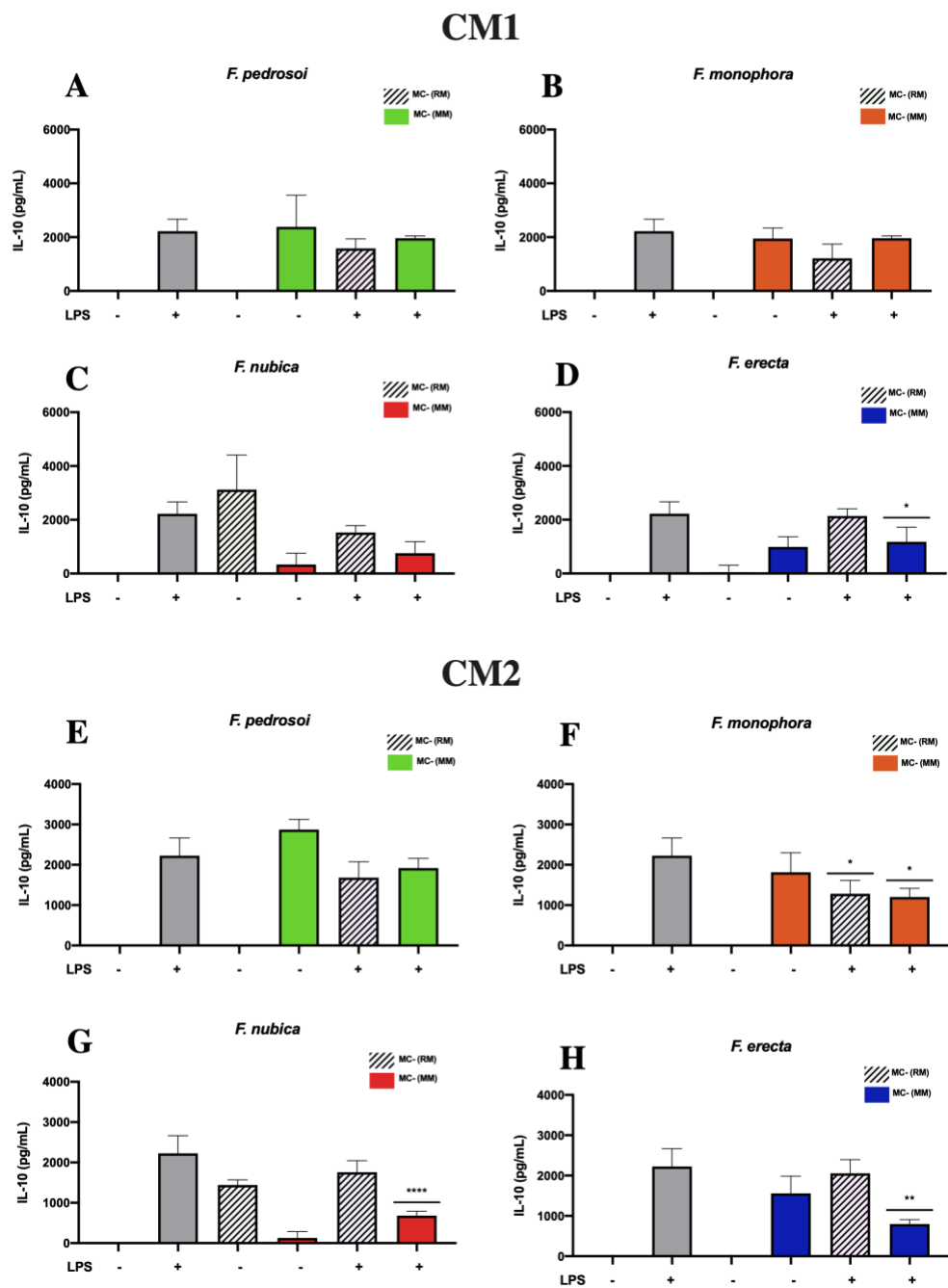


Figura 20 - Quantificação de IL-10 por ELISA após co-cultura de BMDMs com o CM1 (100kDa>CM>1kDa) e com CM2 (<1kDa) produzido por conídios e hifas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de IL-10 para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* e com o CM2 (E-H) produzidos a partir de meio PDB pH 5.6 (RM) e meio BFJ pH 6.5 (MM) após 24h de interação, estimuladas com ou sem LPS. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS *P< 0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

Os CMs produzidos apenas pelas formas saprofíticas de *Fonsecaea* levam a produção de TNF, enquanto os CMs produzidos na presença de células muriformes não

O padrão de produção dos níveis de TNF por BMDMs co-cultivados com CMs gerados na presença ou na ausência de MCs (MC- MM x MC+ MM) foram semelhantes entre si, em que tanto as moléculas presentes no CM1 quanto no CM2 de todas as espécies produzidos por, somente, as formas saprofíticas do fungo conseguiram levar a produção de TNF por si só, enquanto os CMs isolados a partir do cultivo com MCs não conseguiram ativar a produção de TNF (Fig. 21A-H). As moléculas presentes nos CMs de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* obtidos por MC- (MM) ativaram a produção de TNF, enquanto as moléculas extracelulares dos CMs obtidos por MC+ MM não conseguiram levar a produção dessa citocina. Podemos observar também que os CMs produzidos pela forma patogênica em conjunto com conídios e hifas de *F. erecta* (MC+ MM) não só não levaram a produção de TNF, como levaram a sua inibição na presença de LPS, como para *F. pedrosoi* (Fig. 21E) e *F. erecta* (Fig. 21D e Fig. 21H). Desta forma, esses resultados apontam que os CMs produzidos exclusivamente pelas formas saprofíticas de *Fonsecaea* tem capacidade de estimular a produção de TNF *in vitro* em comparação aos CMs produzidos na presença de MCs, que não só não conseguem estimular a produção de TNF, mas que também a inibem, como para *F. pedrosoi* e *F. erecta*.

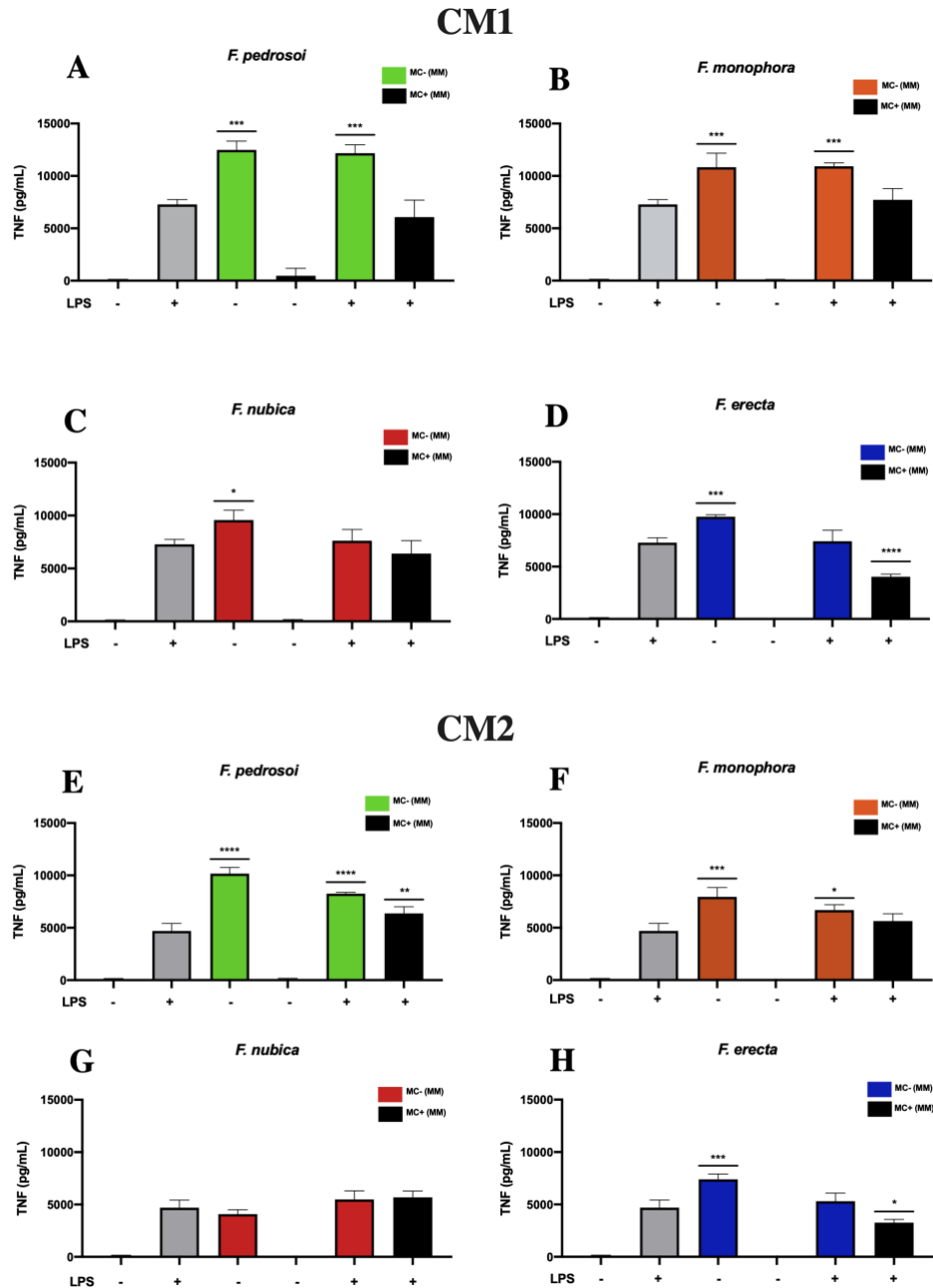


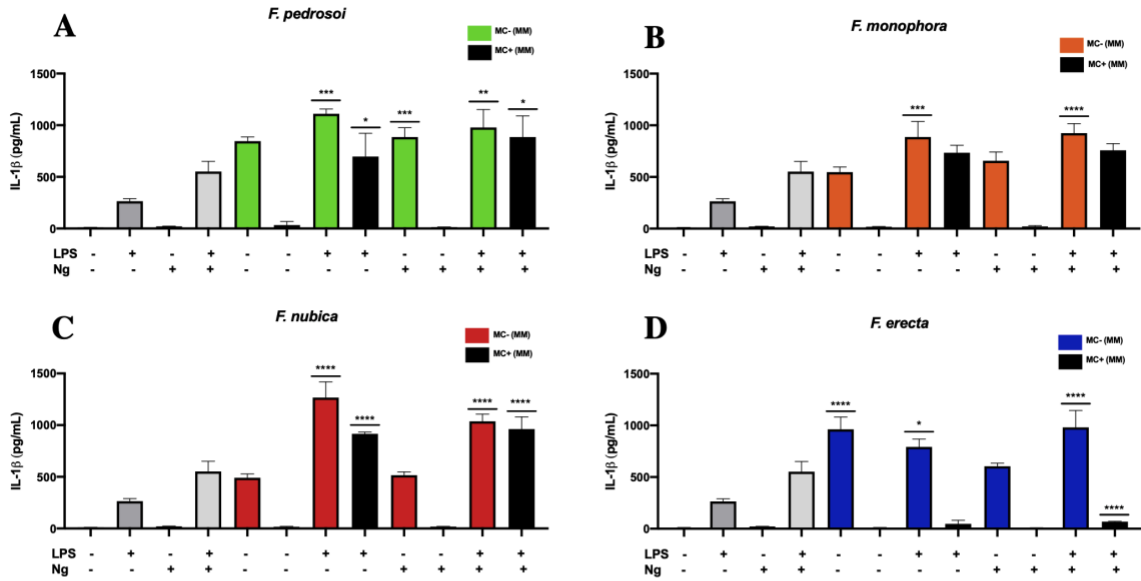
Figura 21 – Quantificação de TNF por ELISA após co-cultura de BMDMs com CM1 (100kDa>CM>1kDa) e com CM2 (<1kDa) produzidos tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofíticas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de TNF para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* cultivados a partir de meio BFJ pH 6.5 (MM) e em meio BFJ pH 2.5 (MM pH 2.5) após 24h de interação, estimulados com ou sem LPS. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS *P<0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

Ambos os CMs produzidos por *Fonsecaea* conseguem ativar a produção de IL-1 β , em que os produzidos pelas formas saprofíticas agem como primeiro e segundo sinal, enquanto os produzidos na presença de células muriformes agem como o primeiro sinal

O padrão de produção de IL-1 β pelas BMDMs co-cultivadas com os CMs foi semelhante tanto entre a interação com o CM1, quanto com o CM2, apesar de que os níveis na produção de IL-1 β terem sido, no geral, menores para o CM2 do que os para o CM1, indicando que o CM1 estimula mais a produção desta citocina do que o CM2 *in vitro*. Os CM1 e CM2 produzidos somente pelas formas saprofíticas de *Fonsecaea* estimularam a produção de IL-1 β tanto por si só, tanto na presença ou não de LPS e/ou NG (Fig. 22). Isto indica que estes CMs conseguem agir tanto como o sinal extracelular (primeiro sinal), quanto o sinal intracelular (segundo sinal) na produção de IL-1 β (Fig. 22A-D). Com exceção de *F. erecta*, os CM1 e CM2 produzidos por MC+ MM de *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*, também possuíram a capacidade de estimular a produção de IL-1 β , mas somente agindo como segundo sinal (sem a presença de NG) (Fig. 22E-H), diferentemente do observado para os CMs obtidos em MM na ausência de MCs.

Desta forma, tanto o CM1 quanto o CM2 produzidos somente pelas formas saprofíticas (MC- MM) de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* demonstram serem capazes de ativar a produção IL-1 β agindo como primeiro e segundo sinal. Já as moléculas presentes nos CMs obtidos por MC+ MM, menos as de *F. erecta*, agem apenas como segundo sinal na produção de IL-1 β . Por fim, o CM1 apresenta ter maior capacidade em produzir IL-1 β em comparação com o CM2, mesmo que ambos tenham padrões semelhantes de ativação desta citocina.

CM1



CM2

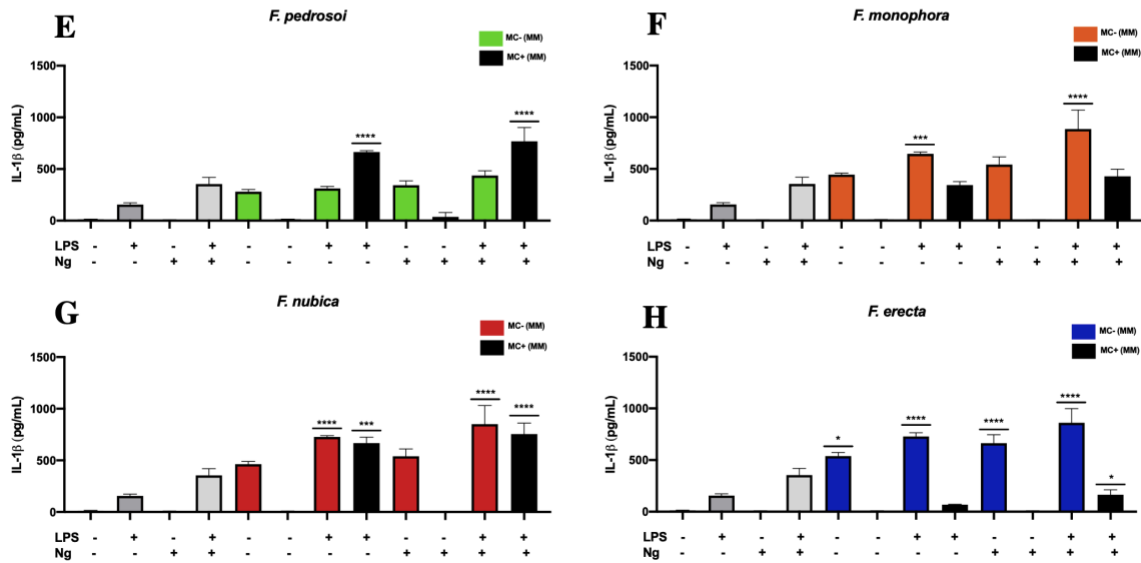


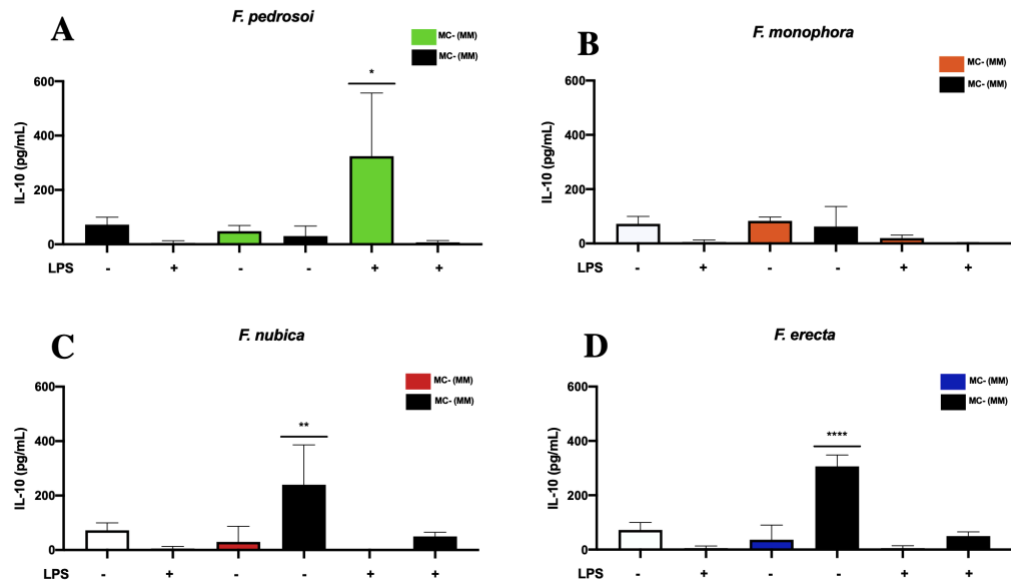
Figura 22 – Quantificação de IL-1 β por ELISA após co-cultura de BMDMs com CM1 (100KDa>CM>1KDa) e com CM2 (<1kDa) produzido tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofíticas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de IL-1 β para (A) *F. pedrosoi*, (B) *F. monophora*, (C) *F. nubica* e (D) *F. erecta* cultivados a partir de meio BFJ pH 6.5 (MM) e em meio BFJ pH 2.5 (MM pH 2.5) após 24h de interação, estimulados com ou sem LPS e/ou nigericina. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS+NG *P< 0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

Os CMs produzidos por *Fonsecaea* possuem o mesmo padrão de produção de TNF entre si, apesar dos CMs produzidos em meio mínimo terem maior capacidade em estimular os níveis desta citocina do que os CMs em meio rico

Em relação a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 a partir da interação de BMDMs co-cultivados com os CM1 de *Fonsecaea* por MC- MM e MC+ MM, demonstrou que as moléculas presentes no CM1 de *F. pedrosoi* obtidos por MC- MM foram as únicas capazes de ativar a produção de IL-10 na presença de LPS, enquanto para as outras espécies, os CMs obtidos nesta condição não possuíram tal capacidade mesmo após o estímulo com o controle positivo (Fig. 23A-D). Já as moléculas presentes nos CM1 de *F. nubica* e *F. erecta* por MC+ MM conseguiram ativar a produção desta citocina sem nenhum estímulo, diferentemente do observado para *F. pedrosoi*. Além disso, o CM1 de *F. monophora* demonstrou não ativar nem inibir a produção de IL-10. Desta forma, os CM1 de *F. nubica* e *F. erecta* obtidos de MC+ MM são capazes de estimular a produção de IL-10, enquanto as moléculas presentes nos CMs isolados de *F. pedrosoi* e *F. monophora* não ativam a produção desta citocina.

Já as moléculas presentes nos CM2 de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* obtidos por MC- MM conseguiram levar a produção de forma significativa de IL-10 por macrófagos, enquanto os CMs obtidos por MC+ MM, com exceção do de *F. nubica*, não conseguiram estimular a produção desta citocina (Fig. 23E-H). Assim, o CM2 de *F. nubica* obtido por MC+ MM demonstrou ser o único capaz de aumentar os níveis de produção de IL-10 nesta condição (Fig. 23G). Desta forma, podemos observar que as moléculas presentes nos CM2 obtidos por MC- MM de *Fonsecaea* conseguem estimular a produção de IL-10, enquanto este mesmo padrão para MC+ MM só é observado para *F. nubica*. O estímulo com LPS não aumentou a produção desta citocina em nenhum dos grupos analisados. Vale ressaltar que as moléculas presentes nos CM2 de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* estimulam mais a os níveis de produção de IL-10 do que os CM1 das mesmas espécies, indicando que o CM2 tem papel mais anti-inflamatório do que o CM1.

CM1



CM2

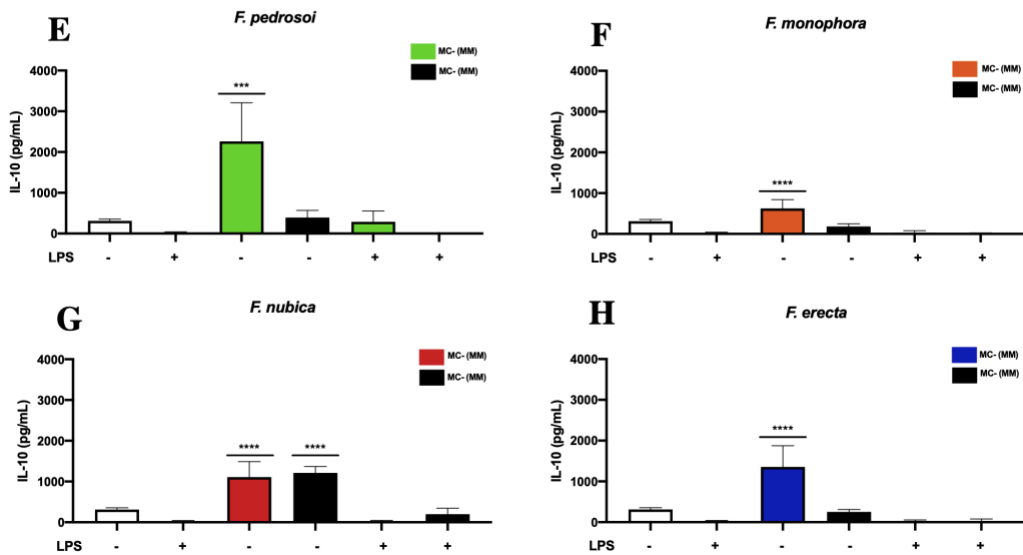


Figura 23 – Quantificação de IL-10 por ELISA após co-cultura de BMDMs com CM1 (100kDa>CM>1kDa) e com CM2 (<1kDa) produzidos tanto por conídios e hifas, quanto pela forma patogênica em conjunto com as formas saprofíticas de *Fonsecaea*. Valores em pg/mL de IL-10 para *F. pedrosoi* (A e E), *F. monophora* (B e F), *F. nubica* (C e G) e *F. erecta* (De H) cultivados a partir de meio BFJ pH 6.5 (MM) e em meio BFJ pH 2.5 (MM pH 2.5) após 24h de interação, estimulados com ou sem LPS. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle positivo com LPS *P<0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

Os CMs produzidos por MC- MM de *F. pedrosoi* e *F. erecta* levam à um aumento da área da lesão, nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumento na carga fúngica na região infectada em modelo experimental de CBM *in vivo*

Após a dosagem de citocinas *in vitro* por ELISA a partir da interação dos CMs isolados com BMDMs, decidimos investigar o potencial imunoestimulatório destas moléculas durante um modelo experimental de CBM murina. Camundongos Black C.57 (WT) foram infectados com hifas e conídios de *F. pedrosoi* e *F. erecta* e estimulados com o CM1 e CM2 produzidos por ambas espécies em MM sem a presença de MCs (MC- MM) para verificarmos o papel modulador das moléculas presentes nestes CMs *in vivo*.

Como já demonstrado anteriormente, *F. pedrosoi* e *F. erecta* apresentaram cinéticas de infecção diferentes (VICENTE, V. *et al.* 2017. A espécie *F. pedrosoi* é uma das mais estudadas para CBM, é amplamente encontrada na América do Sul (ESTEERE, P. *et al.* 1996), vem sendo analisada por membros do nosso laboratório há anos e demonstrou produzir moléculas extracelulares com alta capacidade imunoestimulatório *in vitro*, por isso foi escolhida como uma das espécies para o experimento *in vivo*. Além disso, *F. erecta* foi escolhida por ser uma espécie ambiental (VICENTE, V. A. *et al.* 2013) e por já ter sido demonstrado que mesmo sendo uma espécie ambiental, ela possui a capacidade de gerar lesões em camundongos (VICENTE, V. *et al.* 2017). Desta forma, estas as espécies foram escolhidas para a infecção *in vivo* para facilitar a comparação entre elas e compreender melhor as diferenças de virulência entre linhagens clínicas (*F. pedrosoi*) e ambientais (*F. erecta*) em gerar lesões em camundongos.

Apesar das moléculas extracelulares produzidas em RM terem demonstrado serem mais pró-inflamatórias do que em MM, a escolha em utilizar os CMs obtidos a partir de MC- MM está relacionado com o fato de que o meio PDB não é um meio definido e isto dificulta reproduzir a obtenção e isolamento destas moléculas para experimentos. Além do mais, os CMs produzidos na ausência de MCs demonstraram ser mais estimulatório do que os isolados na presença de MCs em MM.

Para acompanhar a cinética da lesão, a área foi medida em mm, duas vezes por semana por meio do uso de paquímetro digital por 21 dias. No 7º e no 14º dia, os animais foram tratados diretamente na lesão com 25 µL de PBS, 25 µL de CM1 ou 25µL de CM2 em cada pata. Tanto o CM1, quanto o CM2 produzidos pelas duas espécies de *Fonsecaea*, aumentaram a área lesionada

(mm) quando comparados com o grupo controle tratado com PBS, indicando um possível aumento do processo inflamatório na região afetada (Fig. 24A). De acordo com este dado, foi demonstrado que ambos os CMs possuíram grande capacidade de estimular a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 β *ex vivo*, que são duas citocinas importantes na ativação da resposta imune inata. Tal informação demonstra que as moléculas extracelulares produzidas por *Fonsecaea* presentes nos seus CMs são importantes na modulação da resposta imune do hospedeiro durante a CBM, estimulando o processo inflamatório *in vivo* (Fig. 24B).

Em concordância com estes resultados, observou-se que tanto o CM1 quanto o CM2 produzidos por ambas as espécies levaram ao aumento no número de unidades formadoras de colônia (UFC), indicando que as moléculas presentes nestes CMs conseguem, também, estimular a proliferação celular durante a progressão da CBM murina, aumentando a carga fúngica na lesão (Fig. 24C). Desta forma, esses resultados *in vivo* reforçam o que foi observado nos ensaios *in vitro*, demonstrando que as moléculas presentes nos CMs produzidos por diferentes espécies de *Fonsecaea* conseguem agir como fatores de virulência durante a infecção, promovendo uma resposta mais pró-inflamatória, semelhante ao que foi observado para o CM1 e CM2 produzidos por MC-MM de *F. pedrosoi* e *F. erecta in vitro*, em que as moléculas presentes nos CMs de ambas as espécies foram capazes de estimular a produção de TNF e IL-1 β por BMDMs.

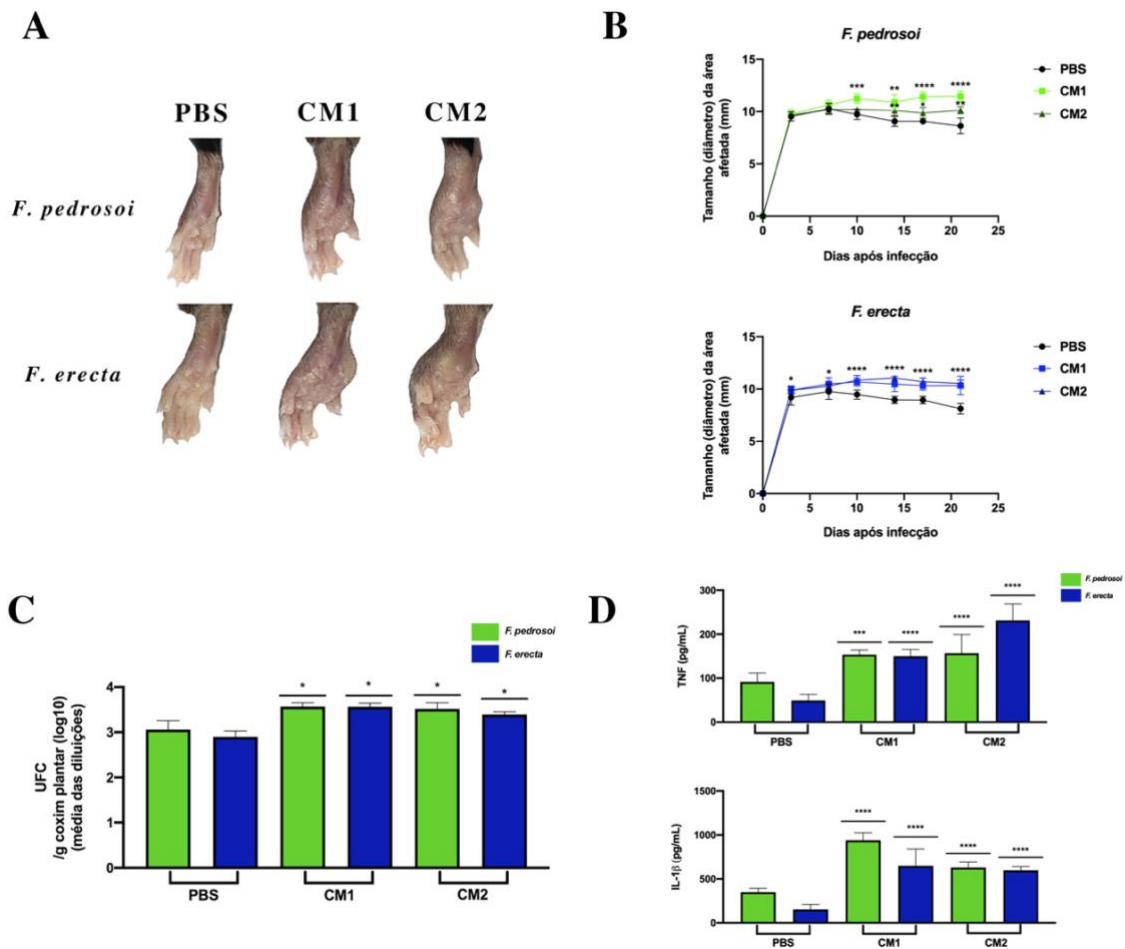


Figura 24 - Cinética de infecção *in vivo* com os propágulos fúngicos de *F. pedrosoi* e *F. erecta* tratados com CM1 e CM2 produzidos em BFJ pH 6.5. Modelo de CBM murina tratados com PBS ou CM1 (100KDa>CM>1KDa) ou CM2 (CM<1KDa) na área da lesão, nos 7º e 14º dias após a infecção e sacrificados no 21º dia. Camundongos selvagens (WT) Black C/57 foram infectados com 10^6 hifas e conídios de *Fonsecaea* (MOI 3:1) no coxim plantar. (A) Animais tratados com CM1 ou CM2 apresentaram maior aumento no tamanho da lesão (mm) comparados aos tratados com PBS. (B) Animais tratados com CM1 ou CM2 obtiveram níveis mais altos na produção de TNF e IL-1β (ELISA) *ex vivo* comparados aos grupos tratados com PBS. (C) Animais tratados com CM1 ou CM2 aumentaram o número de unidades formadas de colônia (UFC) na lesão comparados aos grupos tratados com PBS. (*) representa diferenças significativas em relação ao controle negativo tratado com PBS *P<0,1, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

5. Discussão

A cromomblastomiscose (CBM) é uma das micoses subcutâneas mais comuns no mundo e é causada pela inoculação traumática de propágulos fúngicos de fungos dematiáceos (CARRIÓN, A. 1950; BONIFAZ, 2010). Um dos agentes etiológicos desta doença são as espécies do gênero *Fonsecaea* como, p. ex. o *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pugnacius* (DE HOOG, et al. 2004; NAJAFZADEH, M. J. et al. 2010; AZEVEDO, C. M. P. S. et al. 2015). Apesar de novos trabalhos sobre a imunidade antifúngica do hospedeiro em resposta à infecção por *Fonsecaea* terem sido publicados nos últimos anos, ainda faltam muitas informações sobre os mecanismos de evasão destes fungos. Estes mecanismos dependem tanto dos fatores de virulência do fungo, como da resposta imunológica do hospedeiro, que favorecem o estabelecimento e cronicidade da doença. Além disso, é necessário entender os papéis exercidos pelos diferentes morfotipos do *Fonsecaea sp*, como as formas saprofíticas e a forma patogênica do fungo, no decorrer dos estágios de infecção da CBM.

Apesar de no presente trabalho o foco de estudo ser nas moléculas produzidas por *Fonsecaea* e não o fungo em si, é importante ressaltar a importância e os papéis dos diferentes morfotipos deste fungo na resposta imune do hospedeiro. Estes morfotipos estão presentes em diferentes estágios e locais da lesão durante a progressão da CBM, então compreender como condições ambientais distintas podem afetar a produção e papéis destas moléculas na ativação da resposta imune, pode ser importante para o entendimento sobre a patogencidade desta doença em humanos.

Até a presente data, não existe nenhum trabalho descrevendo a caracterização e o papel das EVs produzidas pelo *Fonsecaea sp*, nem sobre o papel das moléculas presentes em seus CMs, com atenção especial na modulação da resposta imune *in vitro* ou *in vivo*. Este é um trabalho inovador que investigou os efeitos das EVs e CMs produzidos por *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* sob duas perspectivas: (a) comparando condições nutricionais diferentes, um meio com maior disponibilidade de nutrientes (RM) e outro pobre em nutrientes (MM); e (b) comparando os morfotipos (formas saprofíticas sem a presença de MCs [MC- MM] x formas saprofíticas com a presença de MCs [MC+ MM]).

As EVs são estruturas formadas por uma membrana de bicamada fosfolipídica, produzidas por diferentes tipos celulares, desde bactérias até células de mamíferos, e que são liberadas no

ambiente extracelular (RIZZO, J. *et al.* 2020; RODRIGUES, M. L. *et al.* 2015). Os últimos trabalhos publicados sobre EVs fúngicas indicam que as vesículas isoladas de fungos patogênicos humanos conseguem ser reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro e modular sua resposta imunológica (BIELSKA, E. & MAY, R. 2019). As EVs fúngicas agem no carreamento de moléculas para o meio extracelular, como ácidos nucleicos (RNA e DNA) (SILVA, R. P. *et al.* 2019), proteínas (RODRIGUES, M. L. *et al.* 2008; SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019), toxinas (SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019), pigmentos (RODRIGUES, M. L. *et al.* 2008; EISENMAN, H. C. *et al.* 2009), lipídeos (ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* 2008), polissacarídeos (VALLEJO, M. C. *et al.* 2011), alérgenos e príons, conforme revisado por Rizzo e colaboradores (2020). Sabe-se que estas moléculas participam tanto da fisiologia do fungo, quanto dos mecanismos de patogenicidade e resistência, podendo atuar como fatores de virulência em mamíferos e plantas. (RODRIGUES, M. L. *et al.* 2008; VALLEJO, M. C. *et al.* 2011; ZAMITH-MIRANDA, D. *et al.* 2018).

Apesar de que nos últimos dez anos tenha tido um aumento de publicações referentes à EVs fúngicas, apenas em 2018 que estas estruturas foram descritas pela primeira vez para fungos filamentosos causadores de doença em humanos (LIU, M. *et al.* 2018). A primeira descrição de EVs para fungos filamentosos foi para as de *Alternaria infectoria* (SILVA, *et al.* 2014). Seguido de *Rhizopus delemar* (LIU, M. *et al.* 2018), um dos causadores da mucormicose; posteriormente de *A. fumigatus* (SOUZA, *et al.* 2019) e *A. flavus* (BRAUER, *et al.* 2020); e por fim, protoplastos de *A. fumigatus* (RIZZO, J. *et al.* 2020). Deste modo, percebe-se que os conhecimentos acerca dos papéis das EVs, produzidos por fungos patogênicos filamentosos, na resposta imune dos hospedeiros ainda são escassos.

O meio nutricional em que os fungos crescem determinam conteúdos distintos das EVs, como descrito para *C. neoformans* (MARINA, C. L. *et al.* 2020). As EVs secretadas pelas formas saprofiticas das quatro espécies de *Fonsecaea* em RM apresentaram maior quantidade de proteínas, indicando que meios ricos em nutrientes induzem maior produção de vesículas. Já as EVs isoladas de MM apresentaram menor concentração de esterol e assim, o meio de cultura que menos induz produção dessas estruturas. Quando no meio de cultura está presente a forma patogênica, as EVs produzidas em MM produziram níveis de esterol mais altos que MC- MM e similares ao RM. No entanto, as formas saprofiticas e patogênicas produziram concentrações similares de proteínas em MM. Isto indica que as condições nutricionais tem a capacidade de modular a quantidade de EVs produzidas pelos fungos.

A espécie que produziu níveis maiores de ergosterol e proteínas foi a *F. erecta* entre as outras espécies. A espécie *F. erecta* é originalmente, uma espécie isolada do meio ambiente e por isso pode ter melhor pré-disposição para crescer em meio de cultura, apesar de que esta linhagem de *F. erecta* ter sido inoculada no coxim plantar de camundongo antes de ser utilizada para os experimentos. Vicente e colaboradores (2017) encontram diversos genes relacionados à virulência expressos por *F. erecta* como Xeg1 e Gr-VAP, e também observaram que hifas de *F. erecta* possuem maior resistência à ação fungicida de BMDMs do que hifas de *F. pedrosoi in vitro*, indicando que as espécies ambientais de *Fonsecaea* talvez tenham maior capacidade de sobreviver em diferentes condições. Além disso, encontraram dados referentes à abundância de domínios relacionados a álcool desidrogenase (ADH) contendo zinco para *F. erecta* (VICENTE, V. *et al.* 2017), que são enzimas com diversos papéis biológicos, como p. ex., a tolerância a ambientes tóxicos e extremos, conforme já foi observado para outros fungos negros (TEIXEIRA, M. *et al.* 2017). Isto indica que, apesar de *F. erecta* ser uma espécie ambiental, ela possui mecanismos capazes de estimular a resposta imunológica do hospedeiro mamífero.

Em relação ao tamanho das EVs isoladas de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta*, em diferentes condições, elas demonstram ser altamente heterogêneas em tamanho e em morfologia entre si, o que corrobora com caracterizações feitas de outras EVs fúngicas em que estas estruturas demonstram variar não só em termos de diâmetro, como de eletro-densidade, pigmentação e presença de vesículas internas adicionais (BIELSKA, E. & MAY, R. 2019). Em 2018, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) publicou um artigo com novas diretrizes para EVs, em que eles dividem as vesículas de acordo com seu tamanho em dois grupos: vesículas pequenas ($\leq 150\text{nm}$; sEVs) e vesículas médias/grandes ($> 150\text{nm}$; m/IEVs). Apesar desta distinção não ser exclusiva para EVs produzidas por fungos, pode-se observar padrões semelhantes, como as EVs liberadas por *C. albicans*, que apresentam EVs entre 50-100nm e EVs maiores que 100nm (ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* 2008; VARGAS, G. *et al.* 2015); para *A. fumigatus* com EVs entre 100-200nm e entre 300-595nm (SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019); para *C. neoformans* com EVs entre 10-150nm e entre 400-100nm (RIZZO, J. *et al.* 2017); entre outros. As espécies de *F. nubica* e *F. monophora* liberaram tanto EVs pequenas (entre 10-150nm) como EVs maiores (entre 200-600nm), parecido com dados encontrados para outras vesículas isoladas de outros fungos patogênicos (ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* 2008; SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019; RIZZO, J. *et al.* 2017). Contudo, pode-se observar que para *F. pedrosoi* e *F. erecta*, existem

populações de EVs ainda maiores que as outras espécies de *Fonsecaea*, que parecem ter entre 600-1500nm. EVs tão grandes, possivelmente não possuem a capacidade de sair do interior da célula para o meio extracelular, o que indica que EVs muito grandes devem ser, na verdade, vesículas que acabam se agrupando e não são analisadas como EVs individuais por DLS. Esta informação foi confirmada pela MET em que podemos enxergar grandes aglomerados de EVs, principalmente em MM sem a presença de MCs e em RM.

Além de confirmar a heterogeneidade de tamanhos e formas das EVs de *Fonsecaea sp*, a MET permitiu observar a presença de estruturas hexagonais melanizadas associadas a EVs produzidas na presença de MCs (MC+ MM). Franzen e colaboradores (2006) fizeram diversas análises por MET e por microscopia eletrônica de emissão de campo (FESEM) de conídios e MCs de *F. pedrosoi* e observaram que as MCs liberam pedaços de parede ricos em melanina que se assemelham em formato e tamanho com as estruturas observadas na microscopia deste trabalho. Além disso, MCs tem maior deposição de melanina em sua parede celular em relação as formas saprofíticas (FRANZEN, A. *et al.* 2006), reforçando que possivelmente estas estruturas são fragmentos de parede ricos em melanina.

Um fator de virulência importante para *Fonsecaea* e que está presente tanto nas EVs quanto nos CMs é a melanina, que demonstra ser importante na patogenicidade de vários fungos negros (ALVIANO, C. S. *et al.* 1991). Sabe-se que MCs de *F. pedrosoi* depositam mais melanina em sua parede celular em comparação as suas formas saprofíticas (BREDA, L. C. D. *et al.* 2020) e, possivelmente, esta maior produção de melanina pode estar associada aos resultados observados neste trabalho referente às moléculas extracelulares produzidas na presença de MCs, conforme será discutido mais para frente.

A melanina é um polímero estável, insolúvel em água e pode ser extraída de fungos por meio de certos procedimentos (ALVIANO, C. S. *et al.* 1991; FRANZEN, A. J. *et al.* 2006). Diversos papéis de virulência já foram atribuídos a melanina de *F. pedrosoi* como: (a) a proteção contra o estresse oxidativo em macrófagos, por meio da habilidade da melanina de prender NO, levando a inibição de iNOS (BOCCA, A. L. *et al.* 2006; CUNHA, M. M. L. *et al.* 2010); (b) inibição da fagocitose (CUNHA, M. M. L. *et al.* 2005; CUNHA, M. M. L. *et al.* 2010); (c) diminuir a ação microbicida contra *F. pedrosoi* pelo mascaramento de componentes antigênicos presentes em sua parede celular (NIMRITCHER, L. *et al.* 2005); resistência a eliminação pro macrófagos *in vitro* (CUNHA, M. M. L. *et al.* 2005); e (d) ativar o sistema complemento humano (PINTO, L. *et*

al. 2018). Desta forma, a melanina demonstra ser importante na patogenicidade e protetividade de *Fonsecaea* durante a CBM e possivelmente, esta molécula deve agir na modulação do sistema imune em conjunto com as outras moléculas extracelulares presentes tanto nos CMs, quanto nas EVs.

A citocina TNF é uma molécula essencial na ativação da resposta imune durante infecções fúngicas, atuando em uma resposta pró-inflamatória, sendo produzido a partir de diversas interações com moléculas produzidas pelo patógeno, como PAMPs e DAMPs via receptor de Dectina-1, Dectina-2, MR, Mincle, entre outros (BROWN, D. G. 2012). Sabe-se que para fungos a sinalização conjunta via ligação Dectina-1 e Myd88 com TLRs, induzem a produção de citocinas como TNF, IL-10 e IL-6 e problemas de reconhecimento de moléculas produzidas pelo patógeno podem acarretar em uma resposta prejudicada do hospedeiro (BROWN, D. G. 2012; CALICH, V. L. G. *et al.* 2008).

Em relação a produção de citocinas por BMDMs co-cultivados com EVs isoladas a partir de condições nutricionais diferentes, pode-se observar que as EVs produzidas em RM tem maior capacidade de estimular os níveis de secreção de TNF e IL-10 *in vitro*, enquanto as EVs isoladas de MC- MM não demonstram capacidade de induzir a produção de TNF, e, com a exceção de *F. monophora*, as demais foram capazes de inibir a produção desta citocina na presença de LPS. Na presença da forma patogênica, não foi observado produção espontânea desta citocina, mesmo após estímulo com LPS. Este padrão é semelhante ao observado para EVs produzidas pelo fungo negro filamentoso *A. fumigatus*, que possuem a capacidade de estimular a produção de TNF e CCCL2 por BMDMs e aumentar os níveis de produção TNF e IL-1 β por neutrófilos *in vitro* (SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019). Além da análise de citocinas, foi encontrado uma gama de proteínas presentes no interior das EVs de *A. fumigatus* como: hidrolases, envolvidas com o remodelamento de parede (BROWN, L. 2015); quinases e dismutases, relacionadas ao crescimento e resistência do fungo a temperaturas mais altas; chaperonas, envolvidas com a morfogênese, resposta ao estresse, resistência antifúngica e virulência, como, p. ex. HSP90, observada em diversos fungos patogênicos (ALBUQUERQUE, P. *et al.* 2008; RODRIGUES, M. L. *et al.* 2008; SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019); e alérgenos relevantes para *Aspergillus* como Asp f-1, Asp f-3 e Asp f-4 (SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019).

Além do TNF, as EVs produzidas, em meio RM e MC- MM, por *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica*, e não *F. erecta*, conseguiriam estimular os níveis de IL-1 β na ausência de

LPS, ou seja, possivelmente atuando como primeiro sinal na produção desta citocina. Contudo, EVs isoladas de MM não aumentaram tanto o nível de secreção desta citocina em comparação as vesículas cultivadas em RM. Indicando que, no geral, EVs cultivadas em RM tem maior capacidade imunoestimulatória. Os resultados referentes a produção de IL-1 β deste trabalho são parecidos com os resultados encontrados para EVs de *C. neoformans*, em que tanto EVs cultivadas em RM (SDB 100%) quanto em MM, conseguem agir como primeiro sinal na produção de IL-1 β por BMDMs (MARINA, C. L. *et al.* 2020), ou seja, possivelmente atuando na ativação do inflamassoma. Contudo, diferentemente das EVs produzidas por *C. neoformans* supracitadas, neste trabalho as EVs de *Fonsecaea* isoladas de RM demonstram ser mais imunoestimulatórias do que as em MM, aumentando os níveis de TNF, IL-1 β e IL-10 *in vitro*, enquanto as EVs de *C. neoformans* cultivadas em MM tem o padrão contrário, demonstrando ativar mais a produção de citocinas pró-inflamatórias do que as EVs isoladas de RM (MARINA, C. L. *et al.* 2020). Outra espécie de fungo filamentoso capaz de produzir EVs com potencial pró-inflamatório são as vesículas isoladas de *A. flavus* que são capazes de estimular a produção de NO, TNF, IL-1 β e IL-6 por BMDMs *in vitro*, além de induzir a polarização de macrófagos do tipo M1, aumentando os níveis de iNOS, um clássico marcador na polarização de M1 (BRAUER, V. S. *et al.* 2020).

Além do mais, foi investigado o papel de EVs produzidas por *C. albicans* cultivado em MM em que estas EVs conseguiram aumentar os níveis de IL-12, IL-10, TNF, TGF- β e NO por macrófagos, BMDMs e BMDCs *in vitro* (VARGAS, G. *et al.* 2015). Apesar de não terem comparado as EVs de *C. albicans* com vesículas produzidas a partir de RM, pode-se observar que, em conjunto, com os dados encontrado para *C. neoformans*, que o MM parece ser um bom tipo de meio de cultura para promover a produção de EVs fúngicas (VARGAS, G. *et al.* 2015; MARINA, C. L. *et al.* 2020), apesar de que as espécies de *Fonsecaea* tendem a produzir EVs mais pró-inflamatórias em RM.

O polimorfismo observado nas espécies de *Fonsecaea* demonstra ser essencial para sobrevivência e patogenicidade destes fungos no hospedeiro, semelhante ao observado para outras espécies de fungos (DONG, B. *et al.* 2014; SIQUEIRA, I. M. *et al.* 2017; GAUTHIER, G.M. 2017). Recentemente, resultados publicados por Siqueira e colaboradores (2017), do nosso grupo, demonstraram em modelo *in vitro* e *in vivo* que hifas e MCs de *F. pedrosoi* possuem a capacidade de gerar uma lesão semelhante a encontrada em humanos, enquanto a infecção por conídios não alcança a fase crônica da doença em camundongos. Além disso, os conídios induziram níveis

menores de secreção de citocinas pró-inflamatórias do que hifas e MCs (SIQUEIRA, I. M. et al. 2017). Quando comparamos estes dados com o das EVs, vimos que, apesar da MC induzir mais citocinas *in vitro* e *in vivo*, as EVs não induziram a secreção das citocinas, mostrando que as MCs devem secretar outras moléculas ou estimular via componentes de parede.

Os dados observados para EVs obtidas em MM na presença ou ausência de MCs corroboram com os resultados encontrados por Sousa e colaboradores (2011) em que a infecção intratraqueal *in vivo* por conídios de *F. pedrosoi* levaram ao aumento de IL-10 e uma inibição na produção de TNF. Além disso, foi descrito por membros do nosso laboratório que hifas, mas não conídios de *F. pedrosoi* conseguem estimular a produção de IL-1 β em BMDMs e THP-1 *in vitro* (CASTRO, R. A. et al. 2017). Desta forma, hifas e MCs demonstram ser os morfotipos de *Fonsecaea sp* capazes de modular a resposta imune do hospedeiro, enquanto conídios não.

Rizzo e colaboradores (2020) analisaram o papel das EVs produzidas por protoplastos (sem parede celular) de conídios germinativos de *A. fumigatus*. Para *A. fumigatus*, foi observado que protoplastos em processo regenerativo liberam mais EVs do que protoplastos recém-formados, apesar de em ambos os casos ter ocorrido a produção significativa de EVs, indicando que estas vesículas não são exclusivas para o processo de síntese de parede e que possivelmente, estão envolvidas com a resposta ao estresse e falta de nutrientes (RIZZO, J. et al. 2020). Compreender o papel das EVs produzidas na presença e ausência de parede celular é interessante, visto que pouco se sabe sobre os mecanismos de saída das EVs para o meio extracelular e também pelo fato de diferentes morfotipos de fungos possuírem composições de parede diferentes entre si. No caso de espécies do gênero *Fonsecaea p. ex.*, as MCs tem a parede mais grossa e rica em melanina, e os conídios as menos espessas e menos pigmentadas (BREDA, L. C. D. et al. 2020). Desta forma, possivelmente as moléculas extracelulares (EVs e CMs) produzidas na presença de MCs, podem ter um papel mais inibitório do que estas moléculas produzidas somente pelas formas saprofíticas de *Fonsecaea sp* por conta de uma maior presença da melanina, já que a melanina está relacionada à proteção do fungo no hospedeiro (NIMRITCHER, L. et al. 2005; BOCCA, A. L. et al. 2006; CUNHA, M. M. L. et al. 2010), como foi discutido anteriormente.

Apesar das EVs produzidas por *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* obtidas a partir de MM na presença de MCs terem um perfil mais imunoinibitório, a produção de IL-10, um importante citocina anti-inflamatória, foi significativa apenas para as EVs isoladas de RM e MM sem a presença de MCs, principalmente em RM. Desta forma, provavelmente o perfil

inibitório das EVs produzidas na presença de MCs não deve estar relacionado com a via de ativação da produção de IL-10 e reforça novamente o amplo perfil imunestimulatório das EVs produzidas em RM.

Grande parte dos estudos feitos com EVs fúngicas, faz-se uma análise proteômica, como para: *A. fumigatus* (SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019; RIZZO, J. *et al.* 2020); *C. albicans* (VARGAS, G. *et al.* 2015); *C. neoformans* (RODRIGUES, M. L. *et al.* 2008); *H. capsulatum* (ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* 2008); *P. brasiliensis* (VALLEJO, M. C. *et al.* 2011); *S. brasiliensis* (IKEDA, M. A. K. *et al.* 2018); e *S. cerevisiae* (OLIVEIRA, D. L. *et al.* 2010), entre outros. Analisar e compreender as funções das proteínas encontradas em EVs fúngicas é essencial para entender o papel e a biogênese destas vesículas (RODRIGUES, M. L. *et al.* 2014), principalmente quando consideramos diferentes condições ambientais em que essas EVs são produzidas. Para *A. fumigatus*, *C. neoformans* e *C. albicans*, p. ex., as análises proteômicas permitiram encontrar diversas proteínas envolvidas tanto com funções fisiológicas, quanto com funções patogênicas (SOUZA, J. A. M. *et al.* 2019; RIZZO, J. *et al.* 2020; RODRIGUES, M. L. *et al.* 2008; VARGAS, G. *et al.* 2015). No futuro tais dados serão analisados para as EVs isoladas pelas quatro espécies de *Fonsecaea* estudadas neste trabalho e irão permitir um aprofundamento ainda maior sobre as funções destas EVs na resposta imune do hospedeiro.

Após analisar, comparar e caracterizar as EVs produzidas por *Fonsecaea*, verificamos o papel das moléculas presentes no meio de cultura, chamado de CM1 (>100kDa e > 1kDa) e no CM2 (< 1 kDa) produzidos por *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* cultivados ou em RM e em MM na ausência de ou na presença de MCs na capacidade de modular a produção de citocinas de BMDMs *in vitro* e na progressão da CBM *in vivo*. Existem poucas informações na literatura sobre as moléculas extracelulares presentes nos CMs de fungos e suas funções na modulação da resposta imune tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, o que dificulta comparar o papel das moléculas presentes nos CMs de *Fonsecaea* com de outras espécies de fungos.

De modo geral, tanto o CM1 quanto o CM2 produzidos por *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* tem padrões semelhantes nos níveis de secreção de TNF, IL-1 β e IL-10 entre si. As moléculas presentes nos CMs isolados a partir de MC- MM, e não em RM ou em MC+ MM, possuem a capacidade de estimular a produção da citocina pró-inflamatória TNF sem a presença de LPS. Este mesmo padrão é observado para *F. nubica* cultivado em RM, em que seu CM consegue aumentar os níveis de secreção de TNF. Já os CMs produzidos por *F. erecta* e *F. pedrosoi*

na presença de MCs inibem a produção de TNF. Assim, estes dados apontam que conídios e hifas de *Fonsecaea* produzem moléculas extracelulares que aumentam a produção de TNF, enquanto as moléculas dos CMs isoladas de cultivo na presença de MCs, ou não ativam, ou inibem a produção de TNF por BMDMs *in vitro*.

Existem certos possíveis fatores de virulência extracelulares para o gênero *Fonsecaea* como: melanina, que é a única molécula conhecida por ser, de fato, um fator de virulência para *F. pedrosoi* (FRANZEN, A. J. *et al.* 1999; FRANZEN, A. J. *et al.* 2008; CUNHA, M. L. *et al.* 2010),; sialidases (ALVIANO, *et al.* 2004); peptidases diversas (PALMEIRA, V. F. *et al.* 2005; PALMEIRA, V. F. *et al.* 2006; PAMEIRA, V. F. *et al.* 2018); heat shock protein (HSP) (LAURENT-WINTER, C. 1992; BOMBASSARO, A. *et al.* 2020); entre outros. Palmeira e colaboradores (2006) analisaram os perfis de enzimas proteolíticas secretadas de conídios de *F. pedrosoi* a partir do cultivo em dois meios de cultura definidos distintos, para verificar se o padrão de secreção dessas moléculas é dependente das condições nutricionais em que o fungo se desenvolve. Assim, observaram que os padrões de secreção das peptidases por conídios de *F. pedrosoi* eram altamente dependentes das condições nutricionais de cultivo (PALMEIRA, V. F. *et al.* 2006). Para fungos, as peptidases demonstram serem importantes no estabelecimento do patógenos durante a infecção, clivando as ligções peptídicas de proteínas, favorecendo a invasão de patógenos no tecido do hospedeiro (MONOD, M. *et al.* 2002). Dessa forma, esses dados indicam que possivelmente o perfil das moléculas presentes nos CMs isolados de *Fonsecaea* está relacionado com as variadas condições nutricionais de cultivo, explicando a heterogeneidade do potencial imuniestimulatório observados para estes CMs.

Após verificar a produção de TNF, analisamos os níveis de produção de IL-1 β , que como já foi discutido anteriormente, é uma citocina importante na resposta imune inata do hospedeiro e principalmente, na ativação do inflamassoma, em conjunto com a citocina IL-18. Além disso, sabe-se que para ativação do inflamassoma é necessário que ocorra uma sinalização intracelular, geralmente via DAMPs, para que ocorra a montagem deste complexo (VANAJA, S. K. *et al.* 2014). Apesar deste trabalho não ter investigado mais afundo o papel destas moléculas na modulação do inflamssoma, verificar e comparar a produção de IL-1 β é um bom indicador para entender se EVs e as moléculas presentes nos CMs conseguem ativar ou inibir este complexo imunoproteico.

Já foi demonstrado em diferentes modelos que a produção de IL-1 β e IL18 são importantes na modulação da resposta imune inata e adaptativa em infecções fúngicas (GUO, C. *et al.* 2014; KARKI, R. *et al.* 2015). Especialmente a citocina pró-inflamatória IL-1 β , que demonstra ser umas das citocinas chaves em diversos eventos voltados à ativação e regulação da inflamação (DINARELLO, C. A. A. 2011). Durante certas infecções fúngicas, como na CBM, o inflamassoma NLRP3 demonstra ser o mais importante na resposta imune e sua ativação está relacionadas à variedade fenotípica encontrada nos fungos (VANAJA, S. K. *et al.* 2014; TAVARES, A. H. *et al.* 2015; CASTRO, R. J. A. *et al.* 2017). Em 2017, integrantes do nosso laboratório demonstram que hifas e MCs possuem a capacidade de estimular a produção de IL-1 β em macrófagos e DCs (SIQUEIRA, *et al.* 2017). Posteriormente, Castro e Colaboradores (2017) demonstraram que hifas de *F. pedrosoi* ativaram a produção de IL-1 β em BMDCs e BMDMs via Dectina-1, Dectina-2 e Dectina-3 pela via de sinalização SyK-NF-kB promovendo a ativação do inflamassoma NLRP-3. Contudo, este complexo não foi capaz de imunomodular positivamente a infecção *in vivo*.

Nossos resultados a partir da interação de BMDMs com os CMs isolados de *Fonsecaea* e seu efeito nos níveis de IL-1 β , apontam que as moléculas presentes em ambos os CMs conseguem ativar a produção de IL-1 β sem a presença de NG, ou seja, agindo como o segundo sinal na ativação do inflamassoma. Além disso os CMs isolados de *F. pedrosoi* cultivado em MM parecem conseguir induzir a secreção de IL-1 β também na ausência de LPS, ou seja, agindo como primeiro e segundo sinal. Os CMs produzidos por *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. erecta* a partir de RM ativam menos a produção de IL-1 β . Já o CM de *F. nubica* em RM ativa significativamente a produção de IL-1 β na presença ou ausência de LPS e/ou NG, agindo como primeiro e segundo sinal. Em relação ao CM2, observa-se que, com exceção de *F. pedrosoi*, as moléculas presentes nestes CMs tem a capacidade de inibir a secreção de IL-1 β mesmo na presença de LPS+NG. Desta forma, observa-se que os padrões de imunomodulação *in vitro* desses CMs varia tanto de acordo com a condição de cultivo, quanto com a espécie, demonstrando possuírem moléculas com funções heterogêneas e com potencial de atuar na modulação da resposta imune do hospedeiro.

Bürguel e colaboradores (2020) do nosso grupo, isolaram os CMs da forma capsular e não-capsular de *C. neoformans* e observaram que as moléculas presentes no CM da forma capsular do fungo levaram à inibição na produção da citocina IL-1 β tanto *in vitro* quanto *in vivo* e que BMDMs tratados previamente com os CMs e co-cultivados com a cepa virulenta H99 de *C. neoformans*, tem pior desempenho em responder à infecção, levando à menores taxas de fagocitose, maior carga

fúngica e aumento da vomocitose. Além disso, observaram que *in vivo* o CM possui a capacidade de aumentar a sobrevivência do fungo no hospedeiro (BÜRGUEL, P. H. *et al.* 2020). Apesar dos CMs produzidos em MM terem demonstrado ativar a produção de IL-1 β , os CMs em MM não conseguem, indicando que, dependendo da condição nutricional, as espécies de *Fonsecaea* irão produzir CMs com papéis imunoestimulatórios variados. Além do mais, já foi observado que o CM produzido a partir do cultivo de *C. albicans* em fase estacionária consegue proteger leveduras contra o estresse oxidativo *in vitro* (WESTWATER, C. *et al.* 2005), reforçando a importância destas moléculas extracelulares na proteção do fungo.

Desta forma, além das condições nutricionais, os morfotipos de *Fonsecaea sp* também produzem moléculas com papéis imunoestimulatórios diferentes entre si. Isto é interessante, visto que Palmeira e colaboradores observaram classes distintas de peptidases produzidas por conídios de *F. pedrosoi* (PALMEIRA, V. F. *et al.* 2005), hifas (PALMEIRA, V. F. *et al.* 2006) e MCs (PALMEIRA, V. F. *et al.* 2018) de *F. pedrosoi*. Para hifas de *F. pedrosoi*, foi encontrada uma ampla produção de peptidases aspárticas, que tem sua melhor atividade em pHs ácidos e possivelmente estão envolvidas com a formação de MCs na lesão tecidual (PALMEIRA, V. F. *et al.* 2006). Além disso, este mesmo grupo analisou a produção de peptidases de MCs de *F. pedrosoi* e observaram que este morfotipo também produz peptidases ácidas, mas com padrões diferentes dos conídios e hifas desta mesma espécie, em que MCs demonstraram produzir peptidases aspártica preferencialmente em pH 4 e com menor atividade enzimática do que comparado as dos conídios (pH4 ideal) e hifas (pH2 ideal) (PALMEIRA, V. F. *et al.* 2018).

Assim, estes resultados demonstram que as condições de cultivo, os morfotipos e as diferentes espécies de *Fonsecaea* produzem moléculas extracelulares com potencial de atuarem como fatores de virulência e com padrões de ativação de citocinas pró- e anti-inflamatórias diversos. É importante ressaltar que apesar das espécies de *Fonsecaea* terem genomas semelhantes entre si (VICENTE, V. *et al.* 2017), apenas as espécies *F. pedrosoi* e *F. nubica* são exclusivas para CBM (NAJAFZADEH, M. J. *et al.* 2010; YOU, Z. *et al.* 2019). Além disso, *F. nubica* foi recém-descoberta e por isso existem poucas informações sobre sua patogenicidade. Já *F. monophora* é considerada oportunista, causando também feohifomicose e infecções em outros órgãos (NAJAFZADEH, M. J. *et al.* 2010). E como já foi discutido anteriormente, *F. erecta* é a única espécie isolada originalmente do meio ambiente (VICENTE, V. A. *et al.* 2013) neste trabalho. Tais diferenças relacionadas com o ciclo de vida, aspectos clínicos e patogenicidade destes fungos

podem estar relacionadas com os variados papéis exercidos pelas EVs e moléculas presentes nos CMs produzidas por *Fonsecaea sp* observados aqui.

Para verificar se as moléculas presentes nos CMs de *Fonsecaea* realmente possuem a capacidade de promover um aumento da resposta inflamatória, isolamos o CM1 e o CM2 produzidos por *F. pedrosoi* e *F. erecta* a partir de MM na ausência de MCs e inoculou-se 25µL destas soluções na área da lesão 7 e 14 dias após a infecção. Os animais foram sacrificados no 21º dia conforme descrito em Materiais e Métodos. Vicente e colaboradores (2017) verificaram os potenciais de infecção de diferentes espécies de *Fonsecaea*, tanto por análises de comparação genômica de espécies patogênicas e ambientais, como também por experimentos *in vivo* utilizando larvas de *Galleria mellonella* e camundongos BALB/c (WT). Utilizando o modelo de *G. mellonella*, eles observaram que a infecção por *F. erecta* e *F. monophora* levaram a diminuição do tempo de vida das larvas em relação ao grupo infectado por *F. pedrosoi* e o grupo controle (VICENTE, V. *et al.* 2017). Esta alta capacidade de virulência de *F. erecta* é difícil de ser explicada, visto que esta é uma espécie ambiental, contudo as espécies ambientais do gênero *Fonsecaea* demonstram apenas ter preferência pelo tecido vegetal, sendo algo de natureza acidental e não proposital, em que essas espécies também possuem a capacidade de infectar tecido animal (DE HOOG, G. S. *et al.* 2004).

Além disso, este mesmo grupo observou que o padrão de infecção por *F. erecta* foi semelhante a infecção por *F. pedrosoi* em camundongos, em que ambas as espécies levaram a produção de altos níveis de TNF, IL-1β, IL-6 e MCP-1, além de terem aumentados os níveis de UFC na lesão. Estes dados se assemelham ao encontrado neste trabalho em que *F. pedrosoi* e *F. erecta*, em que ambas as espécies foram capazes de gerar lesões semelhantes entre si ao longo do experimento. Contudo, neste caso foi comparado o efeito dos CMs na progressão da infecção e não só o potencial infeccioso das espécies em si. De qualquer forma, mesmo tratando os animais com os CMs não foi observada diferença entre as espécies, mas sim em relação ao controle com PBS, em que as moléculas presentes nos CMs de *F. pedrosoi* e *F. erecta* levaram ao aumento da área da lesão, na carga fúngica no coxim plantar (UFC) e um aumento na produção de TNF e IL-1β *ex vivo*, indicando que as moléculas extracelulares produzidas por estas espécies presentes em seus CMs agem como fatores de virulência pró-inflamatórios tanto *in vitro*, quanto *in vivo* e que as espécies ambientais realmente possuem a capacidade não só de infectar tecido animal, quanto de gerar moléculas com potencial de virulência.

6. Conclusões

As EVs das espécies de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* demonstraram serem capazes de imunomodular a produção de TNF, IL-1 β e IL-10 *in vitro* e o padrão de modulação na produção destas citocinas está relacionada com as condições nutricionais de cultivo em que estas vesículas foram obtidas. As EVs produzidas em RM demonstraram serem as vesículas com maior capacidade imunoestimulatória em comparação as EVs isoladas de MM. Já as EVs obtidas na presença de MCs em MM demonstram ser menos pró-inflamatórias e mais inibitórias, no geral, do que EVs produzidas na ausência de MCs e em RM. Por fim, as EVs produzidas em RM agem como primeiro sinal na ativação de IL-1 β , enquanto as isoladas de MM demonstram agir como o segundo sinal.

O CM1 e CM2 produzidos pelas formas saprofíticas de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* em MM demonstraram ser os que mais estimulam a produção de TNF, IL-1 β e IL-10 *in vitro* em comparação as moléculas obtidas de RM e de MM na presença de MCs. Além disso, observou-se que as moléculas extracelulares presentes nos CMs obtidos em MM na ausência de MCs agem como primeiro e segundo sinal na produção de IL-1 β , enquanto as obtidas na presença de MCs agem somente como segundo sinal e as isoladas de RM não são capazes de promover a produção desta citocina. Além disso, os CMs de *F. pedrosoi* e *F. erecta* obtidos de MM sem a presença de MCs demonstram agravar a progressão da CBM murina, semelhante aos dados *in vitro* observados anteriormente, reforçando o potencial de virulência destas moléculas.

Pode-se concluir que as EVs e as moléculas extracelulares presentes nos CMs de *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. erecta* são capazes de modular a produção de citocinas importantes na resposta imune inata do hospedeiro e que esta modulação está relacionada à condição nutricional de cultivo em que estas moléculas foram obtidas, agindo assim, como possíveis fatores de virulência.

Por fim, ainda existem muitas informações a serem obtidas acerca do papel de EVs e outros componentes extracelulares produzidos por fungos patogênicos, principalmente, os filamentosos durante infecções e é de interesse do laboratório compreender mais a fundo os mecanismos moleculares envolvidos com esta comunicação entre o patógeno-patógeno e o patógeno-hospedeiro pelo ambiente extracelular e qual a importância destas moléculas na resposta imune

7. Referências Bibliográficas

1. ALBUQUERQUE, P. C.; NAKAYASU, E. S.; RODRIGUES, M. L.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA, I. C.; NOSANCHUK, J. D. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1695-1710. 2008.
2. ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eucaryotic Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-1185. 2015.
3. ALVIANO, D. S. KNEIPP, L. F. LOPES, A. H.; TRAVASSOS, L. R.; MEYER-FERNADES, J. R.; RODRIGUES, J. R. ALVIANO, C. S. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic forms induce by platelet-activating factor. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 689-695. 2003.
4. ARMSTRONG, D. History of Opportunistic Infection in the Immunocompromised Host. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 318-321. 1993.
5. ATTAPATTU, M. C. Chromoblastomycosis – A clinical and mycological study of 72 cases in Sri Lanka. **Mycopathologia**, v. 137, n. 145-151. 1997.
6. BADALI, H.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; MOUSAVI, B.; ILLNAIT-ZARAGOZI.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J. C.; DE HOOG, G. S.; MEIS, J. F . Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* and *F. monophora* in Cuba. **Mycopathologia**, v. 175, p. 439-444. 2013.
7. BIELSKA, E; MAY, R. C. Extracellular vesicles of human pathogenic fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 90-99. 2019.
8. BIELSKA, E.; SISQUELLA, M. A.; ALDEIEG, M.; BIRCH, C.; O'DONOGHUE, E. J.; MAY, R. C. Pathogen-derived extracellular vesicles mediated virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1556, p. 1-9. 2018.
9. BISHOP, D. G. & WORK, E. An Extracellular Glycolipid Produced by *Escherichia coli* Grown under Lysine-Limiting Conditions. **Biochemistry Journal**, v. 96, p. 567-577. 1965.
10. BOCCA, A. L.; BRITO, P. P. M.; FIGUEIREDO, F.; TOSTA, C. E. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Mycopathologia**, v. 161, p. 195-203. 2006.
11. BOMBASSARO, A.; SCHNEIDER, G. X.; COSTA, F. F.; LEÃO, A. C. R.; SOLEY, B. S.; MEDEIROS, F.; SILVA, N. M.; LIMA, B. J. F. S.; CASTRO, R. J. A.; BOCCA, A. L.; BAURA, V. A.; BALSANELLI, E.; PANKIEVICZ, V. C. S.; HRYSAY, N. M. C.; SCOLA, R. H.; MORENO, L. F.; DE AZEVEDO, C. M. P. S.; SOUZA, E. M.; GOMES, R. R.; DE HOOG,

- G. S.; VICENTE, V. A. Genomics and Virulence of *Fonsecaea pugnacius*, Agent of Disseminated Chromoblastomycosis. **Frontiers in Genetics**, v. 11, n. 822, p. 1-14. 2020.
12. BONIFAZ, E. CARRASCO-GERARD. SAÚL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. **Mycoses**, v. 44, p. 1-7. 2001.
13. BONIFAZ, E.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. **J. Dstch. Dermatol. Ges.**, v. 8, n. 8, p. 619-627. 2010.
14. BORELLI, D. Causal agents of chromoblastomycosis (Chromomycetes). **Pan Am Health Org Sci Publ**, v. 396, p. 334-335. 1980.
15. BOWMAN, S. M. & FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799-808. 2006.
16. BOYCE, K. J.; ANDRIANOPOULOS, A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. **FEMS Microbiology Reviews**, p. 1-15. 2015.
17. BOYCE, K. J.; SCHREIDER, L.; KIRSZENBLAT, L.; ANDRIANOPOULOS, A. The two-component histidine kinases DrkA and SlnA are required for in vivo growth in the human pathogen *Penicillium marneffe*. **Molecular Microbiology**, v. 82, n. 5, p. 1164-1184. 2011.
18. BRAUER, V. S.; PESSONI, A. M.; BITENCOURT, T. A.; DE PAULA, R. G.; ROCHA, L. O.; GOLDMAN, G. H.; ALMDEIRA, F. Extracellular Vesicles from *Aspergillus flavus* Induce M1 Polarization In Vitro. **Host-Microbe Biology**, v. 5, n. 3, p. 1-9. 2020.
19. BREDA, L. C. D.; MENEZES, I. G.; PAULO, L. N. M.; DE ALMEIDA, S. R. Immune Sensing and Potential Immunotherapeutic Approaches to Control Chromoblastomycosis. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3. 2021.
20. BROWN, L.; WOLF, J. M.; PRADOS-ROSALE, R.; CASADEVALL, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 13, p. 620-630. 2015.
21. BROZ, P. & DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanisms of assembly, regulation and signaling. **Nature Reviews: Immunology**, v. 16, p. 407-420. 2016.
22. BROWN, G. D. Innate Antifungal Immunity: the Key Role of Phagocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 1-21. 2011.
23. BÜRCEL, P. H.; MARINA, C. L.; SAAVEDRA, P. H. V.; ALBUQUERQUE, P.; DE OLIVEIRA, S. A. M.; JANIOR, P. H. H. V.; CASTRO, R. A.; HEYMAN, H. M.; NAKAYASU, E. S.; MAY, R. C.; TAVARES, A. H.; BOCCA, A. L. *Cryptococcus neoformans* Secretes Small Molecules That Inhibit IL-1 β Inflammasome-Dependent Secretion. **Mediators of Inflammation**, p. 1-20, 2020.

24. BURGEOIS, C.; & KUCHLER, K. Fungal pathogens – a sweet and sour treat for toll-like receptors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 142, p. 1-11. 2012.
25. CALICH, V. L. G.; PINA, A.; FELONATO, M.; BERNARDINO, S.; COSTA, T. A.; LOURES, F. V. Toll-like receptors and fungal infection: the role of TLR2, TLR4 e MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 53, p. 1-7. 2008.
26. CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. **Nature Reviews**, v. 1, p. 17-24. 2003.
27. CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 3703-3713. 1999.
28. CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 337-344. 2001.
29. CASTRO, R. J. A.; SIQUEIRA, I. M.; JERÔNIMO, M. S.; BASSO, A. M. M.; JUNIOR, P. H. H. V.; MAGALHÃES, K. G.; LEONHARDT, L. C.; OLIVEIRA, S. A. M. O; BÜRCEL, P. H.; TAVARES, A. H.; BOCCA, A. L. The major Chromoblastomycosis Etiologic Agent *Fonsecaea pedrosoi* Activates the NLPR3 Inflamassome. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1572, p. 1-16. 2017.
30. CARRIÓN, A. L. Chromoblastomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 1255-1282. 1950.
31. CATEAU, E.; CANTE, V.; HERMOSO, D. G.; RODIER, M. H. Case of *Fonsecaea nubica* chromoblastomycosis from the French territory of Mayotte. **JMM Case Reports**, p. 1-3. 2014.
32. CHEETHAM, J.; SMITH, D. A.; DANTAS, A. S.; DORIS, K. S.; PATTERSON, M. J.; BRUCE, C. R.; QUINN, J. A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPJK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, p. 4603-4614. 2007.
33. CHEN, Y.; YIN, S.; LI, M.; CHEN, R.; WEI, L.; MA, H.; DENG, S.; DE HOOG, G. S.; LAI, W.; LU, C.; FENG, P. A case of chromoblastomycosis by *Fonsecaea nubica* indicating a possible route of transmission. **Mycoses**, v. 59, p. 662-667. 2016.
34. COLLOPY-JUNIOR, I. KNEIPP, L. F.; DA SILVA, F. C.; RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; MEYER-FERNANDES, J. S. Characterization of an ecto-ATPase activity in *Fonsecaea pedrosoi*. **Archives of Microbiology**, v. 185, p. 355-362. 2006.
35. CUNHA, M. M. L.; FRANZEN, A. J.; ALVIANO, D. S.; ZANARDI, E.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. **Microscopy Research and Technique**, v. 68, n. 6, p. 377-384. 2005.

36. CUNHA, M. M. L.; FRANZEN, A. J.; SEABRA, S. H.; HERBST, M. H.; VUGMAN, N. V.; BORBA, L. P.; DE SOUZA, W.; RONZETAL, S. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 80, p. 1-9. 2010.
37. DA SILVA, T. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; CASADEVALL, A.; ALMEIDA, F. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization *in vitro*. **Nature Scientific Reports**, v. 6, n. 35867, p. 1-10. 2016.
38. DA SILVA, R. P.; LONGO, L. G. V.; DA CUNHA, J. P. C.; SOBREIRA, T. J. P.; RODRIGUES, M. L.; FAORO, H.; GOLDENBERG, S.; ALVES, L. R.; PUCCIA, R. Comparison of RNA Content of Extracellular Vesicles Derived from *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Cells**, v. 8, n. 765, p. 1-21. 2019.
39. DEATHERAGE, B. L. & COOKSON, B. T. Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 1948-1957. 2012.
40. DE AZEVEDO, C. M. P. S.; GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; SANTOS, D. W. C. L.; MARQUES, S. G.; DO NASCIMENTO, M. M. F.; ANDRADE, C. E. W.; SILVA, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea pugnacius*, a Novel Agent of Disseminated Chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2674-2685. 2015.
41. DE BRITO, A. C.; BITTENCOURT, M. J. S. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. **An Bras Dermatol.**, v. 93, n. 4, p. 495-506. 2018.
42. DE HOOG, G. S.; ATIILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V. A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Medical Mycology**, v. 42, p. 405-416. 2004.
43. DE SOUZA, T. F.; SCROFERNEKER, M. L.; DA COSTA, J. M.; CARISSIMI, M.; COBERLINNI, V. A. Secretion of five extracellular enzymes by strains of chromoblastomycosis agents. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 50, n. 5, p. 269-272. 2008.
44. DINARELLO, C. A. A. A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 41, p. 1203-1217. 2011.
45. DONG, B.; LI, D.; LI, R.; CHEN, S. C.; LIU, W.; LIU, W.; CHEN, L.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; TONG, Z.; XIA, Y.; XIA, P.; WANG, Y.; DUAN, Y. A Chitin-Like Component on Sclerotic Cells of *Fonsecaea pedrosoi* Inhibits Dectin-1-Mediated Murine Th17 Development by Masking β -Glucans. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-20. 2014.
46. DOS SANTOS, A. L. S.; PALMEIRA, V. F.; ROZENTAL, S.; KNEIPP, L. F.; NIMRITCHER, L.; ALVIANO, D. S. RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S. Biology and Pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS Microbiology**, v. 31, p. 570-591. 2007.

47. EISENMAN, H. C.; FRASES, S.; NICOLA, A. M.; RODRIGUES, M. L.; CASADEVALL, A. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 155, p. 3860-2867.
48. ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, E.; RAMARCEL, R.; PECARRERE, J. L. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 1, p. 45-47. 1996.
49. ESTERRE, P.; PEYROL, S.; MARIE-SAINTE, D.; PRADINAUDA, R.; GRIMAUD, J. A. Granulomatous reaction and tissue remodeling in the cutaneous lesion of chromomycosis. **Virchows. Archiv, A. Pathol. Anat.**, v. 422, p. 285-291. 1993.
50. ESTERRE, P.; PEYROL, S.; PRADINAUD, R.; GRIMAUD, J. A.; PARASITOLOGIE, L. De; GUYANE, I. P. De; DERMATOLOGIE, D. De; MARTIAL, H. J. Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesion of chromomycosis. **Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.**, v. 422, n. 4, p. 285-91, 1993.
51. ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 19, p. 148-152. 2006.
52. FARBIARZ, S. R.; CARVALHO, T. U.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W. Fine structure and cytochemistry of the interactions between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 28, p. 375-385. 1990.
53. FENG, P.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea* and Chromoblastomycosis. **Current Progress in Medical Mycology**. Springer. Capítulo 11. 2017.
54. FRANSISCA, C. HE, F.; CHEN, Z. W.; LIU, H. F.; XI, L. Y. Molecular identification of chromoblastomycosis clinical isolates in Guandong. **Medical Mycology**, v. 55, p. 851-888. 2017.
55. FRANZEN, A. J.; CUNHA, M. M. L.; BATISTA, E. J. O.; SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Effects of Tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4]-benzothiazole), a Specific DHN-Melanin Inhibitor, on the Morphology of *Fonsecaea pedrosoi* Conidia and Sclerotic Cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 69, p. 729-737. 2006.
56. FRANZEN, A. J.; CUNHA, M. M. L.; MIRANDA, K.; HENTSCHEL, J.; PLATTNER, H.; DA SILVA, M. B.; SALGADO, C. G.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of Structural Biology**, v. 162, p. 75-84. 2008.
57. FRANZEN, A. J.; DE SOUZA, W.; FARINA, M.; ALVIANO, C. S.; ROZENTAL, S. Morphometric and densitometric study of biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, p. 395-402. 1999.
58. GAUTHIER, G. M. Fungal Dimorphism and Virulence: Molecular Mechanisms for Temperature Adaptation, Immune Evasion and *In Vivo* Survival. **Mediators of Inflammation**, p. 1-8. 2017.

59. GAUTHIER, G. M. Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants and Insects. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 1-7. 2015.
60. GAUTHIER, G. M.; KLEIN, B. S. Insights into fungal morphogenesis and immune evasion. **Microbe**, v. 3, p. 416-423. 2008.
61. GAUTHIER, G. M.; SULLIVAN, T. D.; GALLARDO, S. S.; BRANDHORST, T.; WYMELENBERG, A. J. V.; CUOMO, C. A.; SUEN, G.; CURRIE, C. R.; KLEIN, B. S. SREB, a GATA Transcription Factor That Directs Disparate Fates in *Blastomyces dermatitidis* Including Morphogenesis and Siderophore Biosynthesis. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1-16. 2010.
62. GAZENDAM, R. P.; VAN DE GEER, A.; VAN HAMME, J. L.; HELGERS, L.; ROHR, J.; CHRABIEH, M.; PICARD, C.; ROOS, D.; VAN DEN BERG, M.; VAN DEN BERG, T. K.; KUJIPERS, T. W. Proinflammatory cytokine response towards fungi but not bacteria in Chronic Granulomatous Disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, p. 1-15. 2016
63. GIACOMETTI, R.; KRONBERG, F.; BIONDI, R. M.; PASSERON, S. Catalytic isoforms Tpk1 and Tpk2 of *Candida albicans* PKA have non-redundant roles in stress response and glycogen storage. **Yeast**, v. 26, p. 273-285. 2009.
64. GIMENES, V. M. F.; CRIADO, P. R.; MARTINS, J. E. C.; ALMEIDA, S. R. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. **Mycopathologia**, v. 162, n. 2, p. 97-101. 2006.
65. GUO, C.; CHEN, M.; FA, Z.; LU, A.; FANG, W.; SUN, B.; CHEN, C.; LIAO, W.; MENG, G. Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates de NLRP3 inflamassome. **Microbes and Infection**, p. 1-10. 2014.
66. HAMZA, S. H.; MERCADO, P. J.; SKELTON, H. G. SMITH, K. J. An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 30, p. 340-343. 2003.
67. HERWALD, H. & EGESTEN, A. On PAMPs and DAMPs. **Journal of Innate Immunity**, v. 8, n. 5, p. 427-428. 2016.
68. HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence Factors of Medically Important Fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 469-488. 1996.
69. IKEDA, M. A. K.; DE ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; CRONEMBERGER-ANDRADE, A.; TORRECILHAS, A. C. T.; MORETTI, N. S.; DA CUNHA, J. P. C.; DE ALMEIDA, S. R.; FERREIRA, K. S. Extracellular Vesicles From *Sporothrix brasiliensis* Are an Important Virulence Factor that Induce and Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2286, p. 1-11. 2018.
70. KARKI, R.; MAN, S. M.; MALIREDDI, S.; GURUNG, P.; VOGEL, P.; LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. Concerted Activation of the AIM2 and NLRP3 Inflammasomes

- Orchestrates Host Protection against Aspergillus Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 17, p. 1-12. 2015.
71. KHAJO, A.; BRYAN, R. A.; FRIEDMAN, M.; BURGER, R. M.; LEVITSKY, Y.; CASADEVALL, A.; MAGLIOZZO, R. S.; DADACHOVA, E. Protection of Melanized *Cryptococcus neoformans* from lethal Dose Gamma Irradiation Involves Changes in Melanin's Chemical Structure and Paramagnetism. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1-8. 2011.
72. KIMURA, T. F. E.; ROMERA, L. M. D.; ALMEIDA, S. R. *Fonsecaea pedrosoi* Conidia Induces Activation of Dendritic Cells and Increases CD11c⁺ Cells in Regional Lymph Nodes During Experimental Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 185, p. 245-256. 2020.
73. KNEIPP, L. F. PALMEIRA, V. F.; PINHEIRO, A. A. S.; ALVIANO, C. S.; ROZENTAL, S.; TRAVASSOS, L. R.; MEYER-FERNANDES, J. R. **Medical Mycology**, v. 41, p. 469-477. 2003.
74. KNEIPP, L. F.; RODRIGUES, M. L.; HOLANDINO, C.; ESTEVES, F. F.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R.; MEYER-FERNANDES, J. R. Ectophosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells. **Microbiology**, v. 150, p. 3355-3362. 2004.
75. KORNITZER, D. Regulation of *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis by Endogenous Signals. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 21, p. 1-15. 2019.
76. LATGÉ, J. P. Tasting the fungal cell wall. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 863-872. 2010.
77. LAURENT-WINTER, C.; IBRAHIM-GRANET, O. Heat-shock response in *Fonsecaea pedrosoi*, a pathogenic fungus. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 1286-1291. 1992.
78. LAVRIN, T.; KONTE, T.; SITAR, S.; SPEIE, K.; MIHEVC, S. P.; ZAGAR, E.; ZUPUNSKI, V.; LENASSI, M.; ROGELJ, B.; CINERMAN, N. G. The Neurotropic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Induces Neurocytotoxicity in Neuroblastoma Cells and Progressive Cell Death. **Cells**, v. 9, n. 963, p. 1-22. 2020.
79. LEONE, F.; BELLANI, L.; MUCCIFLORIA, S.; GIORGETTI, L.; BONGIOANNI, P.; SIMILI, M.; MASERATI, B. E.; CARRATORE, R. D. Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*. **Journal of Cellular Physiology**, p. 1-23. 2017.
80. LESLIE, D. F.; BEARDMORE, G. L. Chromoblastomycosis in Queensland: A Retrospective Study of 13 Cases at the Royal Brisbane Hospital. **Australian Journal of Dermatology**, v. 20, n. 23, p. 23-30. 1979.

81. LEVITZ, S. M. Interactions of Toll-like receptors with fungi. **Microbes and Infections**, v. 6, n. 1351-1355. 2004.
82. LIU, M.; BRUNI, G. O.; TAYLOR, C. M.; ZHANG, Z.; WANG, P. Comparative genome-wide analysis of extracellular small RNAs from the mucormycosis pathogen *Rhizopus delemar*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 5243, p. 1-10. 2018.
83. LU, S.; LU, C.; ZHANG, J.; HU, X.; XI, L. Chromoblastomycosis in Mainland China: A Systematic Review on Clinical Characteristics. **Mycopathologia**. 2012.
84. LU, S.; LU, C.; ZHANG, J.; HU, Y.; LI, X.; XI, L. Chromoblastomycosis in Mainland China: a systematic review on clinical characteristics. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5-6, p. 489-95. 2013.
85. MARINA, C. L. BÜRGEL, P. H.; AGOSTINHO, D. P.; ZAMITH-MIRANDA, D.; LASCASAS, L. O.; TAVARES, A. H.; NOSANCHUK, J. D.; BOCCA, A. L. Nutritional Conditions Modulate *C. neoformans* Extracellular Vesicles' Capacity to Elicit Host Immune Response. **Microorganisms**, v. 8, n. 1815, p. 1-17. 2020.
86. MARQUES, S. G.; SILVA, C. D. M. P.; SALDANHA, P. C.; REZENDE, M. A.; VICENTE, V. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; LOPES, J. M. C. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 47, n.4 , p. 305-311. 2006.
87. MARTÍNEZ, R. L.; TOVAR, L. J. M. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 188-194. 2007.
88. MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: New concepts, diagnosis and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.8, n. 1, p. 1-16. 1983.
89. MCGINNIS, M. R.; SCHELL, W. A. The genus *Fonsecaea* and its relationship to the genera *Cladosporium*, *Phialophora*, *Ramichloridium* and *Rhinochrysiella*. **Pan American Health Organization Science Publications**, v. 396, p. 215-234. 1980.
90. MINOTTO, R.; BERNARDI, C. D. V.; MALLMANN, L. F.; EDELWEISS, M. I. A.; SCROFERNEKER, M. L. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **J. Am. Acad. Dermatol.** p. 585-592. 2001.
91. MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240-273. 2009.
92. MONOD, M. CAPOCCIA, S.; LÉCHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 5-6, p. 405-419. 2002.
93. MONOTOYA, A. M.; MONTESINO, C. A.; CARRIÓN-ÁLVAREZ, D.; GONZÁLES, G. M.; ROJAS, O. C. A comparative study of extracellular enzymes from chromoblastomycosis

agents reveals the potential association of phospholipase with severity of the lesions. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 1-24. 2020.

94. NAJAFZADEH, M. J. GUBDAN, C.; BADALI, H.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; XI, L.; DE HOOG, G. S. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. **Medical Mycology**, v. 47, p. 17-25. 2009.

95. NAJAFZADEH, M. J.; GUEIDAN, C.; BADALI, H.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; LIAN XI; DE HOOG, G. S. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. **Medical Mycology**, v. 47, p. 17-25. 2009.

96. NAJAFZADEH, M. J. REZUSTA, A.; CAMEO, M. I.; ZUBIRI, M. L.; YUS, M. C.; BADALI, H.; REVILLO, M. J.; DE HOOG, G. S. Successful treatment of chromoblastomycosis of 36 years duration caused by *Fonsecaea monophora*. **Medical Mycology**, v. 48, n. 2, p. 390-393. 2010.

97. NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; DE HOOG, G. S. Rapid identification of fungal pathogens by rolling amplification using *Fonsecaea* as a model. **Mycoses**, v. 54, p. e577-e582. 2011.

98. NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V.; XI, L.; GERRITSVAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 48, p. 800-806. 2010.

99. NAJAFZADEH, M. J.; VICENTE, V. A.; SUN, J.; MEIS, J. F.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new species of *Chaetothyriales* isolated from a feline cerebral abscess. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1066-1076. 2011.

100. NIMRITCHER, L.; CERQUEIR, M. D.; LEITÃO, E. A.; MIRANDA, K.; NAKAYASU, E. S.; ALMEIDA, S. R.; ALMEIDA, I. C.; ALVIANO, C. S.; BARRETO-BERGTER, E.; RODRIGUES, M. L. Structure, Cellular Distribution, Antigenicity, and Biological Functions of *Fonsecaea pedrosoi* Ceramide Monohehexosides. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 7860-7868. 2005.

101. OLIVEIRA, D. L.; NAKAYASU, E. S.; JOFFE, L. S.; GUIMARÃES, A. J.; SOBREIRA, T. J. P.; NOSANCHUK, J. D.; CORDERO, R. J. B.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ALMEIDA, I. C.; NIMRITCHER, L.; RODRIGUES, M. L. Characterization of Yeast Extracellular Vesicles: Evidence for the Participation of Different Pathways of Cellular Traffic in Vesicle Biogenesis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1-13. 2010.

102. PALMEIRA, V. F.; GOULART, F. R. V.; GRANATO, M. Q.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KNEIPP, L. F.; SANTOS, A. L. S. *Fonsecaea pedrosoi* Sclerotic Cells: Secretion of Aspartic-Type Peptidase and Susceptibility to Peptidase Inhibitors. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1383, p. 1-9. 2018.

103. PALMEIRA, V. F.; KNEIPP, L. F.; ALVIANO, C. S.; DOS SANTOS, A. L. S. The major chromoblastomycosis fungal pathogen, *Fonsecaea pedrosoi*, extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, p. 21-29. 2005.
104. PALMEIRA, V. F. KNEIPP, L. F.; ALVIANO, C. S.; SANTOS, A. L. S. Secretory aspartyl peptidase activity from mycelia of the human fungal pathogen *Fonsecaea pedrosoi*: Effect of HIV aspartyl proteolytic inhibitor. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 819-826. 2006.
105. PAPPAS, P. G. Opportunistic Fungi: A View to the Future. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 340, n. 3, p. 253-257. 2010.
106. PEREZ-BLANCO, M.; HERNÁNDEZ VALLES, R.; GARCIA-HUMBRIA, L.; YEGRES, F. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. **Medical Mycology**, v. 44, n. 5, p. 467-71. 2006.
107. PINTO, L.; GRANJA, L. F. Z.; ALMEIDA, M. A.; ALVIANO, D. S.; DA SILVA, M. H.; EZJZEMBERG, E.; ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S. Melanin particles isolated from the fungus *Fonsecaea pedrosoi* activates the human complement system. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 8, p. 1-8. 2018.
108. QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: A Neglected Tropical Disease. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 58, p. 46-50. 2015.
109. QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, M.; VITALE R. G.; SALGADO, C. G.; BONIFAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, n. 47, p. 3-15. 2009.
110. QUEIROZ-TELLES, F.; MCGINNIS, M. R.; SALKIN, I.; GRAYBILL, J. R. Subcutaneous mycoses. **Infect Dis Clin N Am**, v. 17, p. 59-85. 2003.
111. RASAMOELINA, T.; MAUBON, D.; ANDRIANARISON, M.; RANAIVO, I.; SENDRASOA, F.; RAKOTOZANDRINDRAINY, N.; RAKOTOMALALA, F. A.; BAILLY, S.; RAKOTONIRINA, N.; ADRIANTSMAHAVANANDY, A.; RABENJA, F, R.; ANDRIANARIVELO, R.; CORNET, M.; RAMAROZATOVO, L. S. Endemic Chromoblastomycosis Caused Predominantly by *Fonsecaea nubica*, Madagascar. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 6. 2020.
112. RIZZO, J.; ALBUQUERQUE, P. C.; WOLF, J. M.; NASCIMENTO, R.; PEREIRA, M. D.; NOSANCHUK, J.; RODRIGUES, M. L. Analysis of multiple components involved in the interaction between *Cryptococcus neoformans* and *Acanthamoeba castellanii*. **Fungal Biology**, p. 1-31. 2017.
113. RIZZO, J.; CHAZE, T.; MIRANDA, K.; ROBERSON W. R.; GORGETTE, O.; NIMRITCHER, L.; MATONDO, M.; LATGÉ, J. P.; BEAUVAIS, A.; RODRIGUES, M. L.

Characterization of Extracellular Vesicles Produced by *Aspergillus fumigatus* Protoplasts. **Molecular Biology and Physiology**, v. 5, n. 4, p. 1-16. 2020.

114. RIZZO, J.; RODRIGUES, M. L.; JANBON, G. Extracellular Vesicle in Fungi: Past, Present, and Future Perspectives. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 346, p. 1-13. 2020.

115. RODRIGUES, M. L.; GODINHO, R. M. C.; ZAMITH-MIRANDA, D.; NIMRITCHER, L. Traveling into Outer Space: Unanswered Questions about Fungal Extracellular Vesicles. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1-6. 2015.

116. RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; ALMEIDA, I. C.; NIMRITCHER, L. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 177-186. 2014.

117. RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; NIMRITCHER, L.; NOSANCHUK, J. D.; ALMEIDA, I. C.; CASADEVALL, A. Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. **Eukaryotic Cell**, p. 58-67. 2008.

118. RODRIGUES, M. L.; NIMRITCHER, L.; OLIVEIRA, D. L.; FRASES, S.; MIRANDA, K.; ZARAGOZA, O. ALVAREZ, M. NAKOUZI, A.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 1, p. 48-59. 2007.

119. ROMANI, L. Immunity to Fungal Infections. **Nature Reviews**, v. 4, p. 1-13. 2004.

120. ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W. Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. **Journal of Medical & Veterinary Immunology**, v. 34, p. 323-330. 1996.

121. ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W. The *in vitro* susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. **Mycopathologia**, v. 126, p. 85-91. 1994.

122. SALGADO, C. G. Fungal x host interactions in chromoblastomycosis - What we learned from animal models and what is yet to be solved. **Virulence**, v. 1, n. 1, p. 3-5. 2010.

123. SALGADO, C. G.; SILVA, J. P.; DINIZ, J. A. P.; SILVA, M. B.; COSTA, P. F.; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Ver. Inst. Med. Trop.**, v. 46, n. 1, p. 33-36. 2004.

124. SANTOS, D. W. C. L. VICENTE, V. A.; WEISS, V. A.; DE HOOG, G. S.; GOMES, R. R.; BATISTA, E. M. M.; MARQUES, S. G.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A. L.; PEDROZO, M. C.; DE AZEVEDO, S. Chromoblastomycosis in an Endemic Area of Brazil: A Clinical-Epidemiological Analysis and a Worldwide Haplotype Network. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 204, p. 1-14. 2020.


125. SCUMPIA, P. O.; MCAULIFFE, P. F.; O'MALLEY, K. A.; UNGARO, R.; UCHIDA, T.; MATSUMOTO, T.; REMICK, D. G.; CLARE-SALZLER, M. J.; MOLDAWER, L. L.; EFRON, P. A. CD11c⁺ Dendritic Cells Are Required for Survival in Murine Polymicrobial Sepsis. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 3282-3286. 2005.
126. SHOPOVA, I. A.; BELYAEV, I.; DASARI, P.; JAHREIS, S.; STROE, M. C.; CSERENSNYES, Z.; ZIMMERMANN, A. K.; MEDYUKHINA A.; SVENSSON, C. M.; KRÜGER, T.; SZEIFERT, V.; NIETZSCHE, S.; CONRAD, T.; BLANGO, M. G.; KNIEMEYER, O.; VON LILIENFELD-TOAL, M. ZIPFEL, P. F.; LIGETI, E.; FIGGE, M. T.; BRAKHAGE, A. A. Human Neutrophils Produce Antifungal Extracellular Vesicles Against *Aspergillus fumigatus*. **American Society for Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 1-19. 2020.
127. SILVA, A. C. C. M.; NETO, A. S.; GALVÃO, C. E. S.; MARQUES, S. G.; SALDANHA, A. C. R.; SILVA, C. M. P.; FISCHMAN, O.; SILVA, R. R.; COSTA, M. R. S. R.; COSTA, J. M. L. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no estado do Maranhão. I – Aspectos evolutivos, clínicos, epidemiológicos e evolutivos. **Rev. Soc. Bra. Med. Tro.**, v. 25, n. 1, p. 37-44. 1992.
128. SILVA, B. M. A.; PRADOS-ROSALES, R.; ESPADAS-MORENO, J.; WOLF, J. M.; LUQUE-GARCIA, J. L.; GONÇALVES, T.; CASADEVALL, A. Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. **Medical Mycology**, v. 52, n. 2, p. 1-16. 2014.
129. SILVA, J. P.; SOUZA, W.; RONZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, p. 171-175. 1999.
130. SIQUEIRA, I. M.; CASTRO, R. J. A.; LEONHARDT, L. C. M.; JERÔNIMO, M. S.; SOARES, A. C.; RAIOL, T.; NISHIBE, C.; ALMEIDA, N.; TAVARES, A. H.; HOFFMANN, C.; BOCCA, A. L. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1-23. 2017.
131. SIQUEIRA, I. M.; RIBEIRO, A. M.; NÓBREGA, Y. K. M.; SIMON, K. S.; SOUZA, A. C. O.; JERÔNIMO, M. S.; NETO, F. F. C.; SILVA, C. L.; FELIPE, M. S. S.; BOCCA, A. L. DNA-hsp65 Vaccine as Therapeutic Strategy to Treat Experimental Chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi*. **Mycopathologia**, 2012.
132. SOUSA, M. G.; GHOSN, E. E. B.; ALMEIDA, S. R. Absence of CD4⁺ T Cells Impairs Host Defense of Mice Infected with *Fonsecaea pedrosoi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, p. 295-600. 2006.
133. SOUSA, M. G.; REID, D. M.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; RULAND, J.; LANGHORNE, J.; YAMASAKI, S.; TAYLOR, P. R.; ALMEIDA, S. R.; BROWN, G. D. Restoration of Pattern Recognition Receptor Costimulation to Treat Chromoblastomycosis, a Chronic Fungal Infection of the Skin. **Cell Host & Microbe**, v. 9, p. 436-443. 2011.

134. SOUZA, J. A. M.; BALTAZAR, L. M.; CARREGAL, V. M.; GOUVEIA-EUFRASIO, L.; DE OLIVEIRA, A. G.; DIAS, W. G.; ROCHA, M. C.; DE MIRANDA, K. R.; MALAVAZI, I.; SANTOS, D. A.; FRÉZARD, J. G.; DE SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; SORIANI, F. M. Characterization of *Aspergillus fumigatus* Extracellular Vesicles and Their Effects on Macrophages and Neutrophils Functions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 2008, p. 1-13. 2019.
135. SURASH, S.; TYAGI, A.; DE HOOG, G. S.; ZENG, J. S.; BARTON R. C.; HOBSON, R. P. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*. **Medical Mycology**, v. 43, p. 465-472. 2005.
136. TAKEO, K.; UESAKA, I.; UEHIRA, K.; NISHIURA, M. Fine Structure of **Cryptococcus neoformans** Grown In Vitro as Observed by Freeze-Etching. **Journal of Bacteriology**, p.1442-1448. 1973.
137. TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820. 2010.
138. TAVARES, A. H.; BÜRGEL, P. H.; BOCCA, A. L. Turning Up the Heat: Inflamassome Activation by Fungal Pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 1-7. 2015.
139. TEIXEIRA, M. M.; MORENO, L. F.; STIELOW, B. J.; MUSZEWSKA, A.; HAINAUT, M.; GONZAGA, L.; ABOUELLEIL, A.; PATANÉ, J. S. L.; PRIEST, M.; SOUZA, R.; YOUNG, S.; FERREIRA, K. S.; ZENG, Q.; DA CUNHA, M. M. L.; GLADKI, A.; BARKER, B.; VICENTE, V. A.; DE SOUZA, E. M.; ALMEIDA, S.; HENRISSAT, B.; VASCONCELOS, A. T. R.; DENG, S.; VOGLMAYR, H.; MOUSSA, T. A. A.; GORBUSHINA, A.; FELIPE, M. S. S.; CUOMO, C. A.; DE HOOG, G. S. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (*Chaetothyriales*, *Ascomycota*). **Studies in Mycology**, v. 86, p. 1-28. 2017. \
140. THERY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1-43. 2018.
141. URIBE, F. J.; ZULUAGA, A. I.; LEON, W.; RESTREPO, A. Histopathology of chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 105, p. 1-6. 1989.
142. VALLEJO, M. C.; MATSUO, A. L.; GRANIKO, L.; MEDEIROS, L. C. S.; MIRANDA, K.; SILVA, L. S.; FREYMÜLLER-HAAPALAINEN, E.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R. The Pathogenic Fungus *Paraccodidoides brasiliensis* Exports Extracellular Vesicles Containing Highly Immunogenic a-Galactosyl Epitopes. **Eukaryotic Cell**, p. 343-351. 2011
143. VANAJA, S. K.; RATHINAM, V. A. K.; FITZGERALD, K. A. Mechanism of inflamassome activation: recent advances and novel insights. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 5, p. 308-315. 2015.

144. VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, p. 1-16. 2017.
145. VARGAS, G.; ROCHA, J. D. B.; ALBUQUERQUE, P. C.; FRASES, S. ; SANTOS, S. S.; NOSANCHUK, J. D.; GOMES, A. M. O.; MEDEIROS, S. L. C.; MIRANDA, K. R.; SOBREIRA, T.; NAKAYASU, E. S.; ARIGI, E. A.; CASADEVALL, A.; GUIMARAES, A. J.; RODRIGUES, M. L.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ALMEIDA, I. C.; NIMRITCHER, L. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 389-407. 2015.
146. VICENTE, V. A.; NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; GOMES, R. R.; ROBL, D.; MARQUES, S. G.; AZEVEDO, C. M. P. S.; DE HOOG, G. S. Environmental siblings of black agents of chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, p. 1-17. 2013.
147. VICENTE, V. A.; ORÉLIS-RIBEIRO, R. NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; GUERRA, R. S.; MIESCH, S.; OSTRENSKY, A.; MEIS, J. F.; KLAASEEN; DE HOOG, G. S.; BOEGER, W. A. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (*Ocypodidae*). **Veterinary Microbiology**, v. 158, p. 109-122. 2012.
148. VICENTE, V. A.; WIESS, V. A.; BOMBASSARO, A.; MORENO, L. F.; COSTA, F. F.; RAITTZ, R. T.; LEÃO, A. C.; GOMES, R. R.; BOCCA, A. L.; FORNARI, G.; CASTRO, R. J. A.; SUN, J.; FAORO, H.; TADRA-SFEIR, M. Z.; BAURA, V.; BALSANELI, E.; ALMEIDA, S. R.; DOS SANTOS, S. S.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S.; DO NASCIMENTO, M. M. F.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B.; ATTILLI-ANGELIS, D.; NAJAFZADEH, M. J.; QUEIROZ-TELLES, F.; SOUZA, E. M.; DE HOOG, G. S. Comparative Genomics of Sibling Species of *Fonsecaea* Associated with Human Chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1924, p. 1-20. 2017.
149. VILLENA, C. I. F.; GOMES, R. R.; FERNANDES, L.; FLORENCIO, C. S.; BOMBASSARO, A.; GRISOLIA, M. E.; TRINDADE, E. S.; DE HOOG, S.; VICENTE, V. A. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Fonsecaea monophora* and *Fonsecaea erecta* for Host-Environment Interaction Studies. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 325, p. 1-11. 2020.
150. WESTWATER, C.; BALISH, E.; SCHOFIELD, D. A. *Candida albicans*-Conditioned Medium Protects Yeast Cells from Oxidative Stress: a Possible Link between Quorum Sensing and Oxidative Stress Resistance. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 10, p. 1654-1661. 2005
151. WEAVER, C. T.; ELSON, C. O.; FOUSSER, L. A.; KOLLS, J. K. The Th17 Pathway and Inflammatory Diseases of the Intestines, Lungs, and Skin. **Annual Review of Pathology**, v.8, p. 477-512. 2013.
152. WEVERS, B. A.; KAPTEIN, T. M.; ZIJISTRA-WILLEMS, E. M.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; GEIJTENBEEK, T. B. H.; GRINGHUIS, S. I. Fungal Engagement of the C-

- Type Lectin Micle Suppresses Dectin-1-Induced Antifungal Immunity. **Cell Host & Microbe**, v. 15, p. 494-505. 2014.
153. WÜTHRICH, M.; WANG, H.; MENGYI, L.; LERKSUTHIRAT, T.; HARDISON, S. E.; BROWN, G. D.; KLEIN, B. *Fonsecaea pedrosoi*-induced Th17-cell differentiation in mice is fostered by Dectin-2 and suppressed by Mincle recognition. **European Journal of Immunology**, v. 45, p. 2542-2552. 2015.
154. XIAO, X.; LI, Y.; IAN, Y.; ZHANG, J.; HE, Y.; CAI, W.; CHEN, Z.; XI, L.; ZHANG, J. Deletion of *pksA* attenuates the melanogenesis, growth and sporulation ability and causes increased sensitivity to stress response and antifungal drugs in the human pathogenic fungus *Fonsecaea monophora*. **Microbiological Research**, , v. 244, p. 1-11. 2021.
155. YOU, Z.; YANG, X.; YU, J.; ZHANG, J.; RAN, Y. Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea nubica*: First Report in Northern China and Literature Review. **Mycopathologia**, v. 184, p. 97-105. 2019.
156. ZAMITH-MIRANDA, D.; NIMRITCHER, L.; RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUCK, J. D. Fungal extracellular vesicles: modulating host-pathogen interactions by both the fungus and the host. **Microbes**, p. 1-13. 2018.


8. Anexos


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal



Brasília, 22 de junho de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "IMUNOPATOLOGIA DA CROMOBLASTOMICOSE – AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO PARASITO - HOSPEDEIRO E IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES DETERMINANTES PARA O ESTABELECIMENTO DA CROMOBLASTOMICOSE MURINA", Protocolo n.º 46/2017, sob responsabilidade da Professora Anamélia Lorenzetti Bocca foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: mus musculus (270 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/06/2017 a 30/05/2020.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo 1 – Certificado de aprovação para o uso de animais emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) para o projeto de Cromoblastomicose, o qual este trabalho faz parte.