

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO- UNAERP  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
UNIDADE DE BIOTECNOLOGIA

**Aspectos celulares e moleculares da resposta imune inata  
de queratinócitos humanos durante co-cultivo com  
*Trichophyton rubrum*.**

DOUTORANDA : Monise Fazolin Petrucelli  
ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

RIBEIRÃO PRETO- SP  
2021

Doutoranda: Monise Fazolin Petrucelli

Aspectos celulares e moleculares da resposta imune inata de queratinócitos humanos durante co-cultivo com *Trichophyton rubrum*.

Tese apresentada à Universidade de  
Ribeirão Preto UNAERP, como  
requisito para obtenção do título de  
Doutora em Biotecnologia. Área de  
Concentração: Saúde

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

Ribeirão Preto

2021

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico  
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

P498a Petrucelli, Monise Fazolin, 1991-  
Aspectos celulares e moleculares da resposta imune inata de  
queratinócitos humanos durante co-cultivo com *Trichophyton  
rubrum* / Monise Fazolin Petrucelli. - - Ribeirão Preto, 2021.  
82 f.: il. color.

Orientadora: Profª. Drª. Ana Lúcia Fachin Saltoratto.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,  
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2021.

1. Dermatofitos. 2. Citocinas. 3. HaCat. 4. Imunidade inata.

I. Título.

CDD 660

**MONISE FAZOLIN PETRUCELLI**

**ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DA RESPOSTA IMUNE INATA  
DE QUERATINÓCITOS HUMANOS DURANTE CO- CULTIVO COM  
*TRICHOPHYTON RUBRUM***

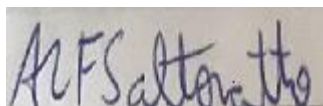
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 14 de outubro de 2021

Resultado: Aprovada

**BANCA EXAMINADORA**



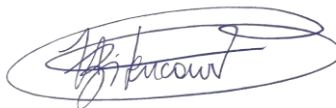
Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



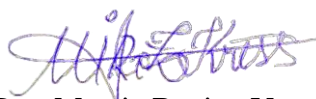
Prof. Dr. Rene de Oliveira Beleboni  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG



Profa. Dra. Tamires Aparecida Bitencourt  
Universidade de São Paulo - USP



Profa. Dra. Marcia Regina Von Zeska Kress  
Universidade de São Paulo - USP

Assinado de forma digital por  
Marcia Regina von Zeska Kress

Assinado em: 2021.10.15 08:16:48 -03'00'

**RIBEIRÃO PRETO  
2021**

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Deus por permitir que fosse possível para mim chegar até aqui.

Aos meus pais, por toda estrutura, apoio, carinho que me serviram de base não só para que eu alcançasse meus objetivos profissionais como também por serem meus exemplos em minha vida pessoal. Dedico a eles não só este trabalho, mas todas as conquistas de minha trajetória até aqui pois sem seus esforços para a minha educação, não teria me tornado biotecnóloga, mestre e agora doutora nesta profissão que amo.

À minha orientadora, prof<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto pela confiança em meu trabalho mesmo nos momentos em que eu duvidei de mim mesma que seria capaz. Muito obrigada a ela e ao Prof. Dr. Mozart Marins por me acompanharem desde a graduação até aqui. Agradeço todo o apoio e orientações, tanto de conselhos profissionais quanto pessoais, e que foram imprescindíveis para mim.

À todos os amigos que cruzaram meu caminho durante a pós-graduação. Em especial, a minha amiga Flávia Verza, que além de parceira no laboratório, levamos nossa amizade para fora dele e que sentirei falta de nossas conversas de todo dia. Muito obrigada a todos que também sempre estiveram presentes: Gabriela Gonzales Segura, Bruna Aline Cantelli, Mariana Heizen de Abreu e Felipe Nishimura pela convivência diária, pelos ensinamentos, pelos desabafos durante os experimentos e pelas contribuições em nossos trabalhos.

Aos demais amigos que não acompanham o meu dia a dia no laboratório, mas que sempre estiveram presentes e cujo apoio também foram muito importantes.

Aos demais professores da Unidade de Biotecnologia da UNAERP que também foram indispensáveis para a minha trajetória acadêmica.

À toda a equipe e infraestrutura da Unidade de Biotecnologia da UNAERP, em especial ao laboratório GMB, para que todo este trabalho fosse possível.

À empresa EFFATHA pelo desenvolvimento e concessão dos dispositivos e frequências utilizadas neste estudo.

À CAPES pela concessão de minha bolsa de Doutorado.

À FAPESP pelo apoio financeiro dedicado ao projeto.

À todos que diretamente, ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

O dermatófito *Trichophyton rubrum* é o maior agente causador de infecções superficiais de pele, cabelos e unhas e utiliza substratos queratinizados como seu principal nutriente. Entretanto, há um aumento de infecções profundas causadas por *T. rubrum*, principalmente em pacientes imunocomprometidos, diabéticos, e até mesmo em pessoas sem nenhuma imunodeficiência. Apesar de sua importância no cenário clínico, ainda é escasso o conhecimento dos mecanismos moleculares que estão envolvidos na interação fungo-hospedeiro e quais são os genes humanos envolvidos na resposta imune contra as dermatófitos. Os queratinócitos, antes considerados somente células de barreira da epiderme contra microrganismos, são atualmente considerados os principais responsáveis pelo desencadeamento inicial da resposta imune. A partir do perfil transcricional por duplo RNAseq da interação entre queratinócitos humanos HaCat e *T. rubrum* foram identificados 369 genes humanos diferencialmente expressos. Dentre estes, os genes *CSF2*, *SLC11A1*, *RNASE7*, *SERPINE1*, *FLG* e *KRT1* apresentaram indução significativa e, portanto, tornaram-se alvos importantes para estudo da resposta imune inata de queratinócitos contra dermatofitoses. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil de expressão destes genes durante o co-cultivo de queratinócitos HaCat com *T. rubrum*. A expressão genica humana foi avaliada por qPCR utilizando diferentes fases de elementos fungicos de *T. rubrum* (fase conidial e fase germinativa) no co-cultivo. Os resultados mostraram que as fases de desenvolvimento dos elementos fúngicos de *T. rubrum* interferiram na expressão dos genes avaliados. Dentre eles, o gene *CSF2* que codifica a citocina GM-CSF foi o mais induzido, principalmente em 48 h, quando o co-cultivo foi realizado com *T. rubrum* na fase conidial. Verificou-se também que o uso de conídios inativados estimulou uma resposta menor dos genes de resposta imune quando comparado ao uso do co-cultivo com conídios vivos. A secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  também foi quantificada do sobrenadante de queratinócitos durante o co-cultivo com *T. rubrum* na fase conidial e germinativa, cujos resultados demonstraram que o perfil de liberação destas citocinas também é influenciado conforme a fase do conídio utilizada. A partir dos resultados obtidos, selecionamos o gene *CSF2*, como foco de estudo dos demais experimentos. Avaliamos através de ensaio de co-cultivo em placas contendo insertos *transwell*, que a expressão de *CSF2* foi dependente da adesão entre fungo-hospedeiro. Para avaliar se a expressão deste gene também era modulada em bactérias, a linhagem HaCat foi desafiada com diferentes concentrações de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Observamos que a modulação do gene *CSF2* de queratinócitos foi menor quando desafiados com LPS, em comparação com o co-cultivo com *T. rubrum*. Também foi realizada a quantificação da liberação da citocina GM-CSF no sobrenadante do co-cultivo com *T. rubrum* em fase conidial e no co-cultivo desafiado com LPS por 24, 48 e 54 h. Os resultados mostraram liberação desta citocina somente no co-cultivo com *T. rubrum*. A fim de avaliar a função do gene *CSF2* e da citocina GM-CSF durante o co-cultivo, a expressão do gene *CSF2* foi reduzida utilizando uma tecnologia de transmissão de frequências extremamente baixas (co-cultivo  $\Delta CSF2$ ). Os resultados mostraram que o uso destas frequências foi capaz de reduzir em até 10 x a expressão de *CSF2*. Além disso, sob ação das frequências, as células de queratinócitos não se mantiveram viáveis durante o co-cultivo em tempos superiores à 24 h. O sobrenadante coletado do co-cultivo  $\Delta CSF2$  também mostrou redução da liberação da citocina GM-CSF. Como conclusão, observamos que a fase de desenvolvimento de conídios de *T. rubrum* influenciou diferentemente os níveis de expressão dos genes de resposta imune de queratinócitos, assim como o perfil de citocinas liberadas por estas células. Dentre os genes avaliados, o gene *CSF2* apresentou maior modulação e demais ensaios demonstraram que sua expressão é dependente da adesão fungo-célula e viabilidade dos conídios de *T. rubrum*. A redução de expressão deste gene afetou a viabilidade de queratinócitos durante o co-cultivo e reduziu a liberação da citocina GM-CSF. Estes resultados evidenciam a importância de estudos mais aprofundados para avaliar o potencial antifúngico e terapêutico de GM-CSF em dermatofitoses.

**Palavras-chave:** Dermatófitos. Citocinas. HaCat. Imunidade inata. *CSF2*. GM-CSF.

## ABSTRACT

The dermatophyte *Trichophyton rubrum* is the major causative agent of superficial skin, hair and nail infections and uses keratinized substrates as its main nutrient. However, there is an increase in deep infections caused by *T. rubrum*, especially in immunocompromised patients, diabetics, and even in people without any immunodeficiency. Despite its importance in the clinical scenario, knowledge of the molecular mechanisms involved in the fungus-host interaction and which human genes are involved in the immune response against dermatophytosis is still unknown. Keratinocytes, previously considered only epidermal barrier cells against microorganisms, are currently considered the main responsible for the initial triggering of the immune response. From the transcriptional profile dual- RNAseq of the interaction between human keratinocytes HaCat and *T. rubrum*, 369 differentially expressed human genes were identified. Among these, the genes *CSF2*, *SLC11A1*, *RNASE7*, *SERPINE1*, *FLG* and *KRT1* showed significant induction and, therefore, became important targets for the study of the innate immune response of keratinocytes against dermatophytosis. The present work aimed to evaluate the molecular and cellular effects of these genes during the co-culture of HaCat keratinocytes with *T. rubrum*. The expression profile of selected genes was evaluated by qPCR using different phases of fungal elements of *T. rubrum* (conidial phase and germinative phase) in co-culture. The results showed that the developmental stages of the conidia interfered with the expression of the genes. Among them, the *CSF2* gene that encodes the cytokine GM-CSF was the most induced, especially in 48 h, when the co-culture was performed with *T. rubrum* in the conidial phase. It was also verified that the use of inactivated conidia stimulated a smaller response of the immune response genes when compared to the use co- with live conidia. The secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was also quantified from the keratinocyte supernatant during co-culture with *T. rubrum* in the conidial and germinative phases, whose results showed that the release of these cytokines is also influenced according to the phase of the conidia used. From the results obtained, we selected the *CSF2* gene as the focus of study for the other experiments. We evaluated through a co-culture assay in plates containing *transwell* inserts that the expression of *CSF2* was dependent on the adhesion between fungus-host. To assess whether the expression of this gene was also modulated in bacteria, the HaCat strain was challenged with different concentrations of bacterial lipopolysaccharide (LPS). We observed that *CSF2* gene modulation of keratinocytes was lower when challenged with LPS compared to co-culture with *T. rubrum*. The release of the GM-CSF cytokine was also performed in the supernatant of the co-culture with *T. rubrum* in conidial phase and in the co-culture challenged with LPS for 24, 48 and 54 h. The results showed release of this cytokine only in co-culture with *T. rubrum*. To assess the function of the *CSF2* gene and the GM-CSF cytokine during co-culture, the *CSF2* gene was silenced using an extremely low frequency technology ( $\Delta$ *CSF2* co-cultivation). The results showed that the use of these frequencies was able to reduce the expression of *CSF2* by up to 10x. Furthermore, under the action of frequencies, the keratinocyte cells did not remain viable during the co-culture for times longer than 24 h. The supernatant collected from the  $\Delta$ *CSF2* co-culture also showed reduced GM-CSF cytokine release. In conclusion, we observed that the developmental phase of *T. rubrum* conidia differently influenced the expression levels of keratinocyte immune response genes, as well as the profile of cytokines released by these cells. Among the genes evaluated, the *CSF2* gene showed greater modulation and other assays showed that its expression is dependent on fungus-cell adhesion and viability of *T. rubrum* conidia. The silencing of this gene affected the viability of keratinocytes during co-culture and reduced the release of the cytokine GM-CSF. These results highlight the importance of further studies to assess the antifungal and therapeutic potential of GM-CSF in dermatophytosis.

**Keywords:** Dermatophytes. Cytokines. HaCat. Innate immunity. *CSF2*. GM-CSF

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Exemplo clínico de dermatofitoses.....                                                                                                                                                                                                           | 14 |
| <b>Figura 2-</b> Exemplo clínico de dermatofitose profunda com formação de abscesso.....                                                                                                                                                                          | 15 |
| <b>Figura 3-</b> Características macroscópicas do dermatófito <i>T. rubrum</i> . ....                                                                                                                                                                             | 18 |
| <b>Figura 4.</b> Características microscópicas do dermatófito <i>T. rubrum</i> . ....                                                                                                                                                                             | 19 |
| <b>Figura 5.</b> Etapas do processo infeccioso das dermatofitoses.....                                                                                                                                                                                            | 21 |
| <b>Figura 6-</b> Monitoramento da germinação de conídios de <i>T. rubrum</i> incubados em meio Sabouraud a 28°C em diferentes tempos de cultivo... ..                                                                                                             | 23 |
| <b>Figura 7-</b> Microscopia da epiderme humana.....                                                                                                                                                                                                              | 27 |
| <b>Figura 8-</b> Cartão contendo dispositivo RFID para a emissão das frequências da Tecnologia EFFATHA. ....                                                                                                                                                      | 40 |
| <b>Figura 9-</b> Esquema ilustrativo da montagem da placa contendo o suporte permeável <i>transwell</i> . ....                                                                                                                                                    | 45 |
| <b>Figura 10-</b> Ensaio de liberação de LDH por queratinócitos HaCat co-cultivados com <i>T. rubrum</i> . ....                                                                                                                                                   | 51 |
| <b>Figura 11-</b> Avaliação da expressão de genes humanos <i>CSF2</i> , <i>RNASE7</i> e <i>SERPINE1</i> durante o co-cultivo com <i>T. rubrum</i> por qPCR.....                                                                                                   | 53 |
| <b>Figura 12-</b> Avaliação da expressão de genes humanos <i>SLC11A1</i> , <i>KRT1</i> e <i>FLG</i> durante o co-cultivo com <i>T. rubrum</i> por qPCR.. ....                                                                                                     | 54 |
| <b>Figura 13-</b> Comparativo da expressão dos genes humanos <i>CSF2</i> , <i>RNASE7</i> e <i>SERPINE1</i> durante o co-cultivo com conídios vivos e inativados de <i>T. rubrum</i> por qPCR.....                                                                 | 58 |
| <b>Figura 14-</b> Comparativo da expressão dos genes humanos <i>SLC11A1</i> , <i>KRT1</i> e <i>FLG</i> durante o co-cultivo com conídios vivos e inativados de <i>T. rubrum</i> por qPCR.....                                                                     | 59 |
| <b>Figura 15-</b> Liberação de citocinas pró-inflamatórias de queratinócitos humanos durante o co-cultivo em fase conidial e germinativa de <i>T. rubrum</i> .....                                                                                                | 61 |
| <b>Figura 16-</b> Análise em microscópio ótico da presença de fragmentos fúngicos nas células de queratinócitos. (A) controle (co-cultivo) e (B) co-cultivo sem contato (contendo suporte permeável <i>transwell</i> ). ....                                      | 63 |
| <b>Figura 17-</b> Comparativo da expressão do gene <i>CSF2</i> (GM-CSF) com o co-cultivo de <i>T. rubrum</i> e queratinócitos (CO com contato) e o co-cultivo de <i>T. rubrum</i> e queratinócitos com suportes permeáveis <i>transwell</i> (CO sem contato)..... | 64 |
| <b>Figura 18-</b> Ensaio de liberação de LDH por queratinócitos humanos desafiados com LPS..                                                                                                                                                                      | 65 |
| <b>Figura 19-</b> Avaliação da expressão gênica do gene <i>TLR4</i> em queratinócitos HaCat desafiados com várias concentrações de LPS.. ....                                                                                                                     | 66 |
| <b>Figura 20-</b> Expressão do gene <i>CSF2</i> em queratinócitos HaCat desafiados com LPS.....                                                                                                                                                                   | 67 |
| <b>Figura 21-</b> Comparativo da modulação gênica do gene <i>CSF2</i> em queratinócitos.. ....                                                                                                                                                                    | 68 |
| <b>Figura 22-</b> Quantificação da liberação da citocina GM-CSF do co-cultivo de queratinócitos com <i>T. rubrum</i> .....                                                                                                                                        | 69 |
| <b>Figura 23-</b> Comparativo entre o co-cultivo de queratinócitos humanos com <i>T. rubrum</i> (A) e queratinócitos humanos com <i>T. rubrum</i> exposto à ELF, nomeados neste trabalho como $\Delta CSF2$ (B) por 24 e 48 h.....                                | 71 |

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 24-</b> Comparativo entre o co-cultivo de queratinócitos humanos com <i>T. rubrum</i> (A) e $\Delta$ CSF2(B) por 54 h.....                                     | 72 |
| <b>Figura 25-</b> Análise por RT-qPCR do silenciamento do gene <i>CSF2</i> em co-cultivo $\Delta$ CSF2 em 24h .....                                                      | 73 |
| <b>Figura 26-</b> Quantificação da citocina GM-CSF secretada no co-cultivo de queratinócitos humanos com <i>T. rubrum</i> (controle) e no co-cultivo $\Delta$ CSF2 ..... | 74 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de qPCR..... | 49 |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |                                                           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------|
| AIDS            | Síndrome da imunodeficiência adquirida                    |
| CARD9           | proteína 9 do domínio de recrutamento de caspase humana   |
| CBS             | Centraal voor Schimmelcultures                            |
| cDNA            | DNA complementar                                          |
| CLRs            | Receptores de lectina do tipo C                           |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                                        |
| hBD-2           | Beta defensina humana 2                                   |
| hBD-3           | Beta defensina humana 3                                   |
| IFN             | Interferon                                                |
| IL              | Interleucina                                              |
| ITS             | Internal transcribed spacer                               |
| LDH             | Lactato desidrogenase                                     |
| LPS             | Lipopolissacarídeo bacteriano                             |
| PAMPs           | Padrões moleculares associados a patógenos                |
| PBS             | Tampão fosfato-salino                                     |
| pH              | Potencial hidrogeniônico                                  |
| PRRs            | Receptores de reconhecimento padrão                       |
| RT-qPCR         | Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real |
| RNA             | Ácido ribonucleico                                        |
| ROS             | Espécies reativas de oxigênio                             |
| RPMI            | Roswell Park Memorial Institute                           |
| TGF             | Fator de transformação do crescimento                     |
| TLRs            | Receptores do tipo toll                                   |
| TNF             | Fator de necrose tumoral                                  |
| ELF             | Frequências extremamente baixas                           |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                            | 14 |
| 1.1 Dermatofitoses e dermatófitos.....                                                                                        | 14 |
| 1.2 <i>Trichophyton rubrum</i> .....                                                                                          | 17 |
| 1.3 Mecanismos gerais da interação fungo-hospedeiro e características patogênicas de <i>T. rubrum</i> durante a infecção..... | 20 |
| 1.3.1 Contato inicial e adesão do patógeno no hospedeiro.....                                                                 | 21 |
| 1.3.3 Invasão tecidual e secreção de toxinas. ....                                                                            | 23 |
| 1.4 Queratinócitos humanos e a resposta imune nas dermatofitoses.....                                                         | 26 |
| 1.4.1. Sistema imune inato nas dermatofitoses.....                                                                            | 27 |
| 1.4.2 Perfil de citocinas liberados por queratinócitos em resposta à <i>T. rubrum</i> .....                                   | 29 |
| 1.5 Modelos de estudo da interação fungo-hospedeiro nas dermatofitoses .....                                                  | 31 |
| 1.6 Genes triados por RNA-seq envolvidos na resposta imune de queratinócitos e no reparo da barreira epitelial.....           | 32 |
| 1.7 A citocina GM-CSF (Gene CSF2).....                                                                                        | 33 |
| 1.8 Ferramentas moleculares para a deleção de genes .....                                                                     | 35 |
| 1.8.1. Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi).....                                                              | 35 |
| 1.8.2 Edição gênica por CRISPR-CAS9 .....                                                                                     | 36 |
| 1.8.3 Ferramentas para a deleção de genes em fungos.....                                                                      | 38 |
| 1.8.4: Efeitos biológicos de Frequências Extremamente Baixas (ELF) e uso para a redução da expressão gênica .....             | 38 |
| 2. JUSTIFICATIVA .....                                                                                                        | 40 |
| 3. HIPÓTESE .....                                                                                                             | 41 |
| 4. OBJETIVOS.....                                                                                                             | 41 |
| 4.1 Objetivo Geral .....                                                                                                      | 41 |
| 4.2.1 Objetivos específicos.....                                                                                              | 41 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                                                   | 42 |
| 5.1 Linhagens utilizadas .....                                                                                                | 42 |
| 5.1.1 <i>Trichophyton rubrum</i> .....                                                                                        | 42 |
| 5.1.2 Queratinócitos Humanos HaCat .....                                                                                      | 42 |
| 5.2. Ensaio do Co-cultivo de <i>T. rubrum</i> em linhagem de queratinócitos humanos HaCat. ....                               | 42 |
| 5.2.1. Preparação de queratinócitos HaCat.....                                                                                | 42 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2.2. Preparação da suspensão de conídios de <i>T. rubrum</i> .....                                                                                                                                                                                                             | 43 |
| 5.2.3. Co-cultivo da linhagem HaCat com elementos fúngicos de <i>T. rubrum</i> em fase conidial e germinativa. ....                                                                                                                                                              | 43 |
| 5.2.5 Inativação dos conídios de <i>T. rubrum</i> pelo calor.....                                                                                                                                                                                                                | 43 |
| 5.3 Ensaio para comprovar a necessidade de contato celular durante o co-cultivo da linhagem HaCat e <i>T. rubrum</i> utilizando as placas com suportes permeáveis <i>Transwell</i> . ....                                                                                        | 44 |
| 5.4 Ensaio de queratinócitos HaCat desafiados com diferentes concentrações de LPS.....                                                                                                                                                                                           | 45 |
| 5.5 Reconstituição de LPS de <i>E. coli</i> . ....                                                                                                                                                                                                                               | 45 |
| 5.6 Ensaio de viabilidade celular através da quantificação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). ....                                                                                                                                                              | 46 |
| 5.7 Ensaio da redução da expressão do gene <i>CSF2</i> utilizando frequências da Tecnologia Effatha .....                                                                                                                                                                        | 46 |
| 5.8 Extração de RNA total.....                                                                                                                                                                                                                                                   | 47 |
| 5.9 Síntese de cDNA .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 47 |
| 5.10 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.....                                                                                                                                                                                                                              | 48 |
| 5.11 Quantificação das citocinas GM-CSF, IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$ de queratinócitos HaCat co-cultivados com elementos fúngicos de <i>T. rubrum</i> nas fases conidial e germinativa e de queratinócitos HaCat desafiados com várias concentrações de LPS ..... | 50 |
| 5.12 Análise Estatística .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 50 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                                                                                                  | 51 |
| 6.1 Avaliação da viabilidade celular de queratinócitos HaCat durante o co-cultivo com <i>T. rubrum</i> utilizando fase conidial e fase germinativa.....                                                                                                                          | 51 |
| 6.2 Avaliação da expressão de genes envolvidos na resposta imune de queratinócitos co-cultivados com <i>T. rubrum</i> .....                                                                                                                                                      | 52 |
| 6.3 Avaliação da expressão gênica dos genes envolvidos na resposta imune de queratinócitos co-cultivado com conídios inativados de <i>T. rubrum</i> .....                                                                                                                        | 57 |
| 6.4 Liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ , durante o co-cultivo de queratinócitos com <i>T. rubrum</i> .....                                                                                                                        | 61 |
| .....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 61 |
| 6.5 Ensaio de co-cultivo para avaliar a necessidade de contato celular utilizando placas contendo suportes permeáveis <i>transwell</i> . ....                                                                                                                                    | 62 |
| 6.6 Análise da expressão do gene <i>CSF2</i> durante o co-cultivo de queratinócitos HaCat com <i>T. rubrum</i> em suporte permeável <i>transwell</i> . ....                                                                                                                      | 64 |
| 6.7 Avaliação da viabilidade celular de queratinócitos Hacaat desafiados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). ....                                                                                                                                                           | 65 |
| 6.8 Avaliação da expressão do gene que codifica o receptor TLR4 em queratinócitos durante a incubação com LPS. ....                                                                                                                                                              | 66 |

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.9 Análise da expressão gênica do gene <i>CSF2</i> em queratinócitos HaCat desafiados com diferentes concentrações de LPS. ....              | 67 |
| 6.10 Quantificação da citocina GM-CSF liberada por queratinócitos humanos durante o co-cultivo com <i>T. rubrum</i> e desafiadas com LPS..... | 68 |
| 6.11 Redução na expressão do gene <i>CSF2</i> utilizando Frequências Extremamente Baixas .....                                                | 70 |
| .....                                                                                                                                         | 72 |
| 6.12 Análise da expressão gênica do gene <i>CSF2</i> no co-cultivo $\Delta CSF2$ .....                                                        | 72 |
| 6.13 Quantificação da citocina GM-CSF no sobrenadante do co-cultivo $\Delta CSF2$ .....                                                       | 74 |
| 7. CONCLUSÃO.....                                                                                                                             | 75 |
| 9. REFERÊNCIAS .....                                                                                                                          | 77 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Dermatofitoses e dermatófitos

Dermatofitoses são infecções superficiais (Figura 1) causadas por um grupo de fungos filamentosos denominados de dermatófitos que infectam tecidos ricos em queratina para utilizá-la como fonte de nutrição no processo infeccioso (ACHTERMAN; WHITE, 2012; PERES et al., 2010; ZHAN; LIU, 2017; PETRUCELLI et al., 2020). São consideradas as infecções fúngicas mais comuns no mundo (ZHAN; LIU, 2017; ZHENG et al., 2019). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que as dermatofitoses afetam cerca de 25% da população mundial e 30 a 70% dos adultos são portadores assintomáticos destas doenças, tornam-se um problema de saúde pública (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018; GNAT et al., 2019; PETRUCELLI et al., 2020).

**Figura 1-** Exemplo clínico de dermatofitoses



Fonte: (DEGREEF, 2008)

Países tropicais apresentam maior incidência de casos de dermatofitoses devido às altas temperaturas e umidade. Demais fatores também contribuem para o aparecimento destas infecções como: idade do indivíduo, estação do ano, condições socioeconômicas e culturais e localização geográfica. No Brasil, dados epidemiológicos mostram maior incidência de dermatofitoses causadas pelo dermatófito *Trichophyton rubrum* nas regiões Sul e Sudeste, seguida pelos dermatófitos *Microsporum Canis* e *Trichophyton mentagrophytes*. Já na região Nordeste, observa-se maior prevalência dos agentes etiológicos *Trichophyton tonsurans*, *T. rubrum* e *M. canis* (SILVA-ROCHA; DE AZEVEDO; CHAVES, 2017; DE ALBUQUERQUE MARANHÃO et al., 2019). Já países subdesenvolvidos do continente africano, em particular a Etiópia, apresentam elevado número de casos de dermatofitoses, não só pelo fator climático,

mas também devido ao baixo nível socioeconômico, baixo nível de higiene e cuidados de saúde e superlotação. Estes mesmos fatores encontrados na Etiópia também são relatados na Índia ( NENOFF et al., 2019; ARAYA; TESFAYE; FENTE, 2020).

Apesar do caráter superficial, as dermatofitoses afetam tanto pessoas saudáveis como imunocomprometidas, sendo que neste último caso, as infecções podem se tornar profundas (Figura 2) devido à imunossupressão do paciente. Em pacientes imunodeprimidos, as dermatofitoses podem envolver tecidos subcutâneos e até órgãos profundos, tornando-se uma doença com risco de morte na ausência de tratamento adequado (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018).

**Figura 2-** Exemplo clínico de dermatofitose profunda com formação de abscesso.



Fonte: (KIM et al., 2016)

Além deste grupo de risco, pessoas que apresentam distúrbios circulatórios e metabólicos como diabetes mellitus, obesidade, psoríase e hiperhidrose, estão mais propensas às dermatofitoses, em especial as que acometem os pés e unhas. Acrescenta-se que, o aumento da prática de atividades esportivas e o envelhecimento também contribuem para o aumento contínuo da prevalência das dermatofitoses (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018). Desta forma, casos recentes de infecções profundas causadas por dermatófitos vêm sendo relatadas de forma frequente na literatura científica, não somente em pacientes imunocomprometidos, como também naqueles que não apresentam imunodeficiência.(KERSHENOVICH et al., 2017; DAI; XIA; SHEN, 2019; SEO et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

As dermatofitoses são clinicamente denominadas de micoses ou *tineas* seguido do local anatômico que é acometido: *tinea pedis* e *tinea manuum* para as dermatofitoses de pé e mão respectivamente, *tinea cruris* para as lesões nas regiões inguinal, pubiana, perineal e perianal,

*tinea corporis* para as dermatofitoses em áreas gerais do corpo, com exceção das áreas já citadas anteriormente, *tinea unguium* (onicomicoses) quando a infecção acomete as unhas, *tinea barbae* para as infecções na região da barba e *tinea capitis* para dermatofitoses no couro cabeludo (ACHTERMAN; WHITE, 2012; NENOFF et al., 2014; ZHAN; LIU, 2017). Apesar de as *tineas* serem classificadas de acordo com o local da infecção, elas também podem ser agrupadas em duas classes principais. A primeira classe corresponde a todas as infecções que acometam a pele em geral e unhas, sendo nestes casos, os dermatófitos *T. rubrum* e *Trichophyton interdigitale* os agentes causais predominantes. Já a segunda classe, corresponde às infecções de cabelos e pêlos, onde *M. canis*, *T. tonsurans* e *Trichophyton violaceum* são os dermatófitos predominantes, podendo sofrer algumas variações conforme as localizações geográficas e população (ZHAN; LIU, 2017).

Os dermatófitos são classificados em três gêneros baseados na morfologia de seus conídios, sendo eles: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017), entretanto, a taxonomia de classificação destes fungos sofre constantes alterações conforme o avanço de novas técnicas científicas. Desta forma, a classificação mais atual foi a realizada por Mercer & Stewart, 2019, que reclassificou os dermatófitos em nove gêneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Microsporum*, *Lophophyton*, *Arthroderma*, *Ctenomyces*, *Gurarromyces* e *Paraphyton*.

Acrescenta-se também a classificação em antropofílicos, geofílicos ou zoofílicos com base no hospedeiro de prevalência. Entretanto, dermatófitos de espécies zoofílicas selecionam animais como hospedeiros favoritos, mas podem frequentemente infectar outras espécies, incluindo seres humanos. Já espécies antropofílicas dependem principalmente da pele humana para crescimento e disseminação no ambiente e, portanto, infectam predominantemente humanos com raras ocorrências de infecção em outras espécies (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018; MARTINEZ-ROSSI et al., 2018). Já dermatófitos que habitam o solo classificados como geofílicos se alimentam de resíduos queratinizados encontrados no solo e raramente se tornam patogênicos (ZHAN; LIU, 2017; FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018).

As espécies de dermatófitos zoofílicos, por serem menos adaptadas ao hospedeiro humano, geram respostas inflamatórias mais graves do que as espécies antropofílicas. Infecções em áreas sem pelos e unhas, principalmente causadas pelas espécies antropofílicas *T. rubrum* e *T. interdigitale* são mais frequentes em países industrializados. As infecções no couro cabeludo,

observadas em países em desenvolvimento, são normalmente causadas pelas espécies *M. canis*, *T. tonsurans* e *T. violaceum*, muitas vezes devido à falha na desinfecção adequada das ferramentas de corte de cabelo, favorecendo a disseminação dos dermatófitos (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018).

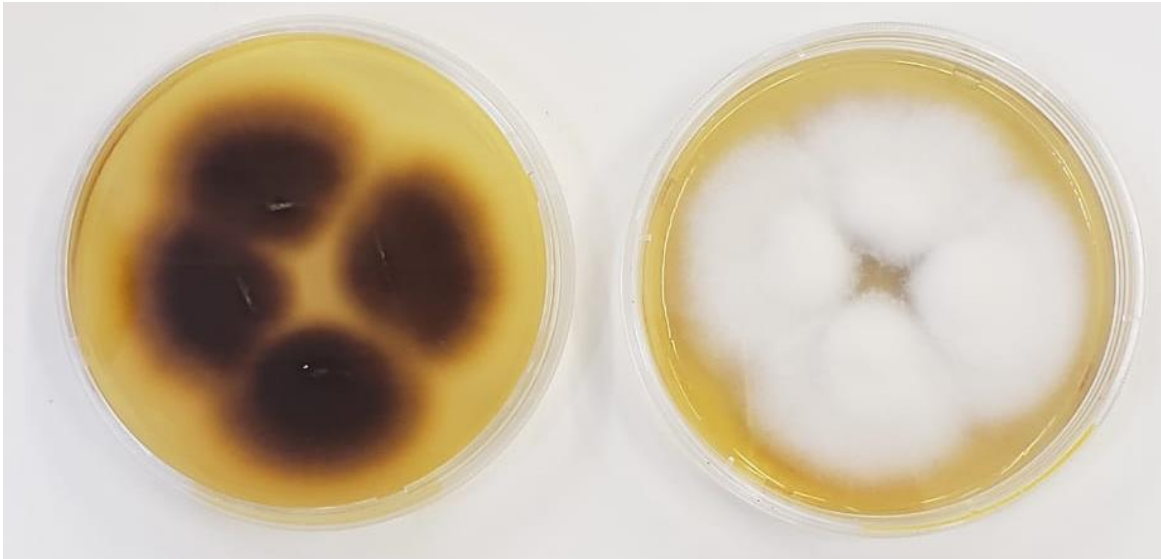
Os sinais clínicos das dermatofitoses são resultados da degradação dos tecidos queratinizados causados por processos fúngicos e pela resposta imune específica do hospedeiro infectado. Os sinais usuais incluem secura, descamação, rachadura e eritema da pele e dos pés, couro cabeludo ou outros locais do corpo (ZHAN; LIU, 2017; FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018). As lesões dermatofíticas humanas de pele apresentam-se usualmente arredondadas, eritematosas e provocam coceiras devido à resposta inflamatória desencadeada pelo fungo e seus metabólitos. Já nas onicomicoses, as unhas tornam-se mais espessas e separadas do leito ungueal podendo ocorrer manchas brancas e distrofia (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017). Essas lesões permanecem superficiais, confinadas à camada epidérmica. Histologicamente, elas apresentam componentes fúngicos (artroconídios e filamentos) restritos à camada cornificada de pacientes imunocompetentes. Também podem ocorrer edema intracelular e acantose, um espessamento da epiderme resultante do aumento da proliferação de queratinócitos (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018).

Embora as dermatofitoses não sejam infecções consideradas graves, seus impactos na qualidade de vida são significativos. Além do aspecto doloroso e incômodo das lesões, os pacientes acometidos por estas infecções sofrem abalos psicológicos devido às características estéticas das lesões e suas consequências sociais (FAWAY; ROUVROIT; POUMAY, 2018).

## **1.2 *Trichophyton rubrum***

O dermatófito *T. rubrum* é o principal agente etiológico causador de infecções superficiais de pele e unhas (BORAL et al., 2018; ZHAN; LIU, 2017). Esta espécie foi descrita por Castelan em 1910 e foi nomeada como *Epidermophyton rubrum*. Em 1911 o nome foi alterado para *T. rubrum* por Sabouraud (ZHAN; LIU, 2017). Suas colônias são caracterizadas por apresentar coloração branca de aspecto cotonoso, aveludado e macio. Já a denominação *rubrum* refere-se à pigmentação encontrada no verso de suas colônias cuja coloração pode variar do vermelho ao marrom (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010; NENOFF et al., 2014), conforme ilustrado na figura 3.

**Figura 3-** Características macroscópicas do dermatófito *T. rubrum*.



Fonte: Arquivo pessoal

Dermatófitos antropofílicos como *T. rubrum* sofrem reprodução assexuada por mitose. Na divisão da hifa são produzidos dois tipos de esporos através da formação de conídios ou artoconídios. Os conídios são resultantes da brotação lateral ou terminal de uma hifa e podem ser do tipo microconídios ou macroconídios. Os microconídios são indivíduos únicos, enquanto os macroconídios correspondem a vários conídios unidos que resultam de sucessivos eventos de brotamento. Em contraste, os artoconídios são produzidos através da fragmentação de hifas nos locais septados. Os conídios são produzidos exclusivamente *in vitro* em meio Sabouraud, enquanto os artoconídios são produzidos por dermatófitos em situações *in vivo*, indicando que o ambiente é crítico para o tipo de esporulação e crescimento (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018). Neste contexto, *T. rubrum* apresenta como característica esporos do tipo microconídios e algumas vezes macroconídios com paredes lisas e de forma alongada dispostos ao longo de suas hifas (Figura 4) (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010)

**Figura 4.** Características microscópicas do dermatófito *T. rubrum*.



Fonte: <https://www.micropia.nl>

O primeiro caso clínico de infecção causada por *T. rubrum* foi o de *tinea pedis*, reportado em 1927 nos Estados Unidos. Através de análises de microssatélite de DNA, sugere-se que *T. rubrum* tenha se originado na África, seguido do surgimento de um novo genótipo na Ásia com subsequente propagação deste genótipo pela Europa e Estados Unidos através do crescimento populacional e imigração durante a Segunda Guerra Mundial. A partir disto, *T. rubrum* tornou-se o maior agente etiológico de *tinea corporis*, *tinea pedis* e *tinea manuum*, *tinea cruris*, *tinea unguium* e dermatofitoses subcutâneas (Granuloma de Majocchi- *tinea granulomatosa*), representando cerca de 50-80% destas infecções. Curiosamente, *T. rubrum* raramente infecta cabelos devido a sua incapacidade de invadir o interior do folículo capilar (ZHAN; LIU, 2017).

As infecções causadas por este fungo são muitas vezes intratáveis e recidivas, principalmente quando há a interrupção da terapia fúngica. Além disso, *T. rubrum* apresenta alta prevalência e potencial para causar infecções prolongadas ou profundas em pacientes imunocomprometidos (ZHENG et al., 2019).

Através de avaliações morfológicas e sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rRNA de *T. rubrum*, o Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) selecionou a linhagem CBS 118892 de *T. rubrum* para o sequenciamento de seu genoma pelo Broad Institute em 2010 (ACHTERMAN; WHITE, 2012) o que possibilitou o surgimento de novos estudos moleculares para melhor compreensão das dermatofitoses causadas por este fungo. Além deste, o genoma de 24 cepas de dermatófitos foram disponibilizadas publicamente pelo Broad Institute (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017).

O dermatófito *T. rubrum*, apresenta pronunciada atividade de queratinases na temperatura e pH normais da pele humana, favorecendo a adaptação deste fungo ao hospedeiro. Além disso, as infecções causadas por ele tendem a ser crônicas com potencial de propagação para outros sítios anatômicos (ZHENG et al., 2019).

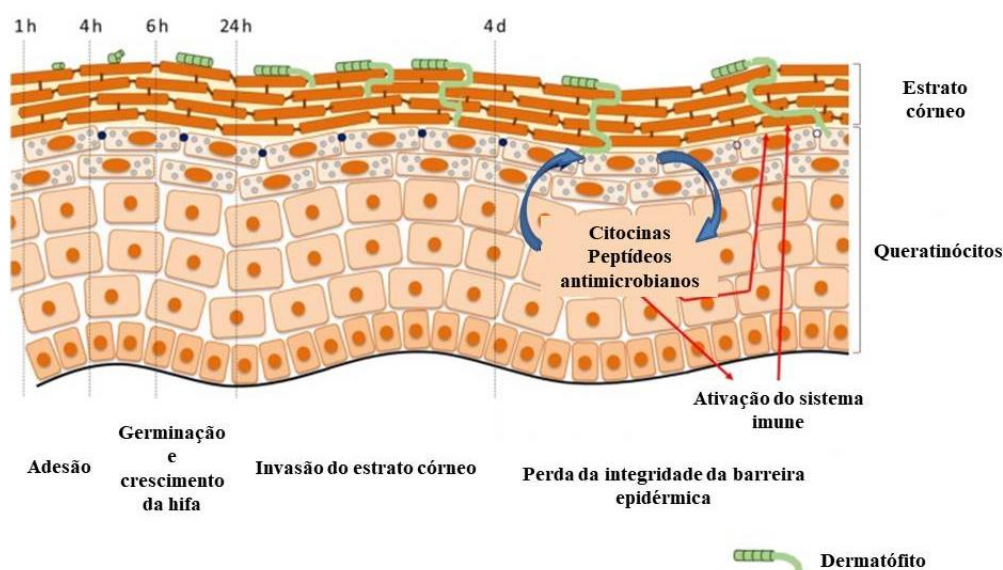
### **1.3 Mecanismos gerais da interação fungo-hospedeiro e características patogênicas de *T. rubrum* durante a infecção.**

A resposta imune estimulada por dermatófitos varia dependendo da espécie infectante. O mecanismo de infecção dos dermatófitos compreende principalmente as moléculas de superfície de adesão, enzimas secretadas para degradar e metabolizar as moléculas do hospedeiro para nutrição e termotolerância. As principais etapas envolvidas no estabelecimento e perpetuação da infecção por dermatófitos estão detalhadas a seguir (SARDANA; GUPTA; MATHACHAN, 2021):

1. **Adesão:** Os artroconídios aderem à epiderme do hospedeiro através de proteínas específicas na superfície fúngica (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018).
2. **Germinação do artroconídio:** Após a aderência, os artroconídios detectam condições favoráveis no hospedeiro e iniciam a reativação da atividade metabólica e a germinação do artroconídio formando o tubo germinativo (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018).
3. **Invasão:** Os tubos germinativos desenvolvem-se em hifas e invadem a camada cornificada epidérmica, enquanto digerem a queratina em pequenos peptídeos e aminoácidos. A partir desta etapa, as hifas começam a produzir novos artroconídios que são liberados para infectar outros indivíduos ou locais do corpo (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018).
4. **Ativação da resposta imune do hospedeiro:** com o abalo da integridade da barreira epidérmica durante o processo infeccioso, os queratinócitos passam a produzir citocinas e peptídeos antimicrobianos para o recrutamento de células do sistema imune (HUBE et al., 2015; FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018).

As etapas do processo infeccioso das dermatofitoses descritas acima estão ilustradas na figura 5.

**Figura 5.** Etapas do processo infeccioso das dermatofitoses



**Fonte:** Adaptado de FAWAY; ROUVROIT; POUMAY (2018).

### 1.3.1 Contato inicial e adesão do patógeno no hospedeiro

Para que a dermatofitose se estabeleça, é necessário que o fungo supere algumas barreiras naturais do hospedeiro como: a natureza ácida da pele humana, a presença de moléculas inibidoras como ácidos graxos e peptídeos antimicrobianos, a ação de células fagocíticas e a descamação epitelial (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017). É através do processo de descamação epitelial que as células de queratinócitos renovam-se no estrato córneo e consequentemente eliminam o possível fungo invasor. Este processo é denominado de queratinização (PERES et al., 2010). Desta forma, a aderência do dermatófito ao tecido a ser infectado ocorre rapidamente, em 1 hora, para evitar a eliminação do fungo.

A adesão do fungo ao tecido hospedeiro é mediada pela interação de proteínas de adesão presentes no fungo, denominadas de adesinas, com os receptores pertencentes ao hospedeiro. Entretanto, ainda é escasso o conhecimento sobre quais os fatores que influenciam na aderência e quais são as principais adesinas em dermatófitos (BITENCOURT et al., 2016).

Na superfície dos microconídios de *T. rubrum*, são expressas adesinas carboidratos-específicas, que são requeridas para a adesão fúngica nas células epiteliais, além de proteases que também podem participar do processo de adesão (BORAL et al., 2018). Além de promover

a aderência do fungo ao hospedeiro, as adesinas também participam na formação de biofilmes, desenvolvimento de corpos de frutificação e alterações morfológicas de colônias (Bitencourt et al., 2016).

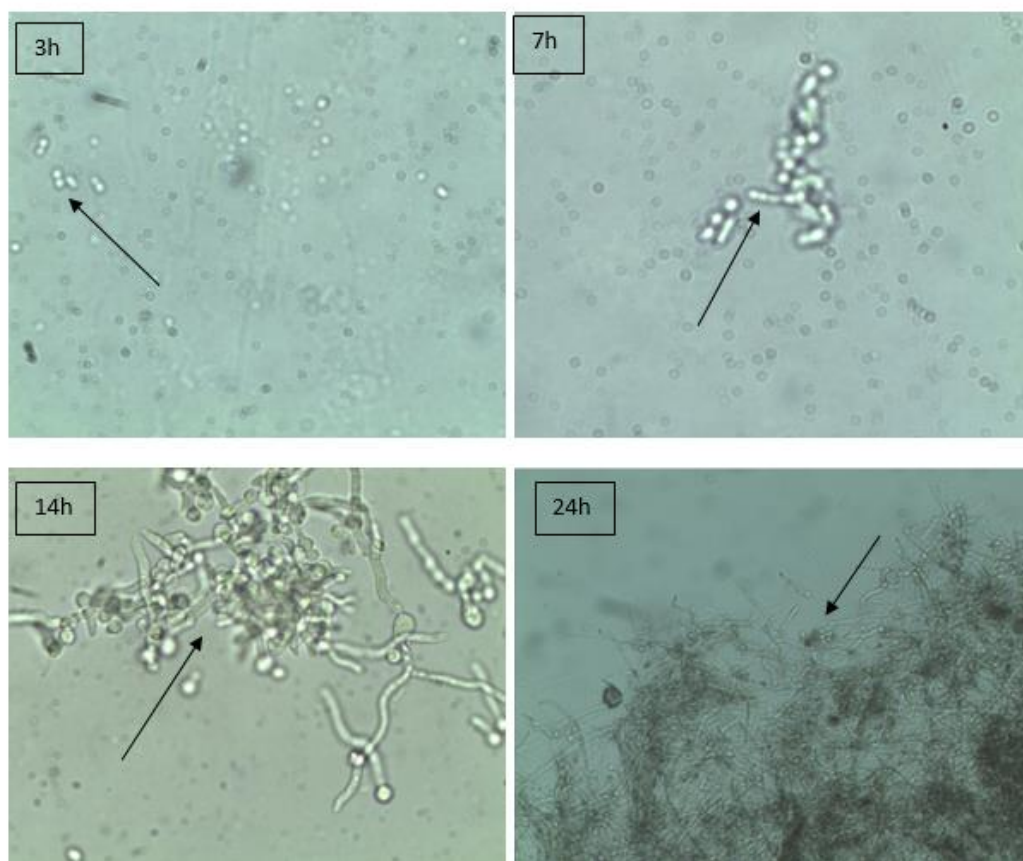
A aderência do fungo ao tecido é seguida da germinação dos antroconídios que ocorre dentro de 3 e 4 horas de contato. Entre 24 horas e 3 dias as hifas fúngicas invadem o tecido e se espalham pela pele. (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017; SARDANA; GUPTA; MATHACHAN, 2021).

Os mecanismos de germinação conidial podem variar entre as diversas espécies de fungos que produzem conídios, entretanto, alguns eventos ocorrem de forma similar neste processo. Para que ocorra a germinação do conídio, a maioria dos fungos filamentosos requerem nutrientes de baixo peso molecular como açúcares, aminoácidos e sais inorgânicos. Primeiramente, quando há a presença de nutrientes adequados, ar e água, os conídios hidratam-se e modificam algumas propriedades de sua superfície, aumentando a adesão célula-célula e célula-substrato. Após este período, ocorre uma reorganização no núcleo celular e após algumas horas, que irá variar de espécie para espécie, se dará início o crescimento hifal (OSHEROV; MAY, 2001).

Osherov e May (2001) avaliaram o processo de germinação conidial de *Aspergillus nidulans* e identificaram que de 0-2h iniciou-se o processo de hidratação e adesão do conídio. Em 4h foi detectado o processo de mitose com início da formação do tubo germinativo em 6h. Já em 14h foram detectados o crescimento micelial com formação de septos.

Resultados similares foram observados por nosso grupo de pesquisa ao realizar o monitoramento do crescimento de conídios de *T. rubrum* em meio Sabouraud. Os resultados mostraram que em 3h os conídios ainda estavam em sua forma nativa e a formação do tubo germinativo iniciou-se por volta de 7h de cultivo. Em 14h também se observou o desenvolvimento de hifas e em 24h a formação de micélio, conforme mostrado na figura 6 (dados não publicados).

**Figura 6-** Monitoramento da germinação de conídios de *T. rubrum* incubados em meio Sabouraud a 28°C em diferentes tempos de cultivo.



Setas indicam o estágio de crescimento dos conídios, onde em 3h podemos verificar apenas a presença de conídios, em 7h o início da formação dos tubos germinativos, 14h as hifas já formadas e com 24h a formação do micélio. Zoom óptico 40x. **Fonte:** Dissertação de Mestrado Mariana Heizen (2015).

Desta forma, a pré-germinação de conídios de *T. rubrum* por 7h em meio Sabouraud foi adotado em diversos trabalhos de expressão gênica publicados por nosso grupo de pesquisa ao realizar o co-cultivo de *T. rubrum* com queratinócitos humanos HaCat (KOMOTO et al., 2015; CANTELLI et al., 2017; PETRUCCELLI et al., 2018, 2019). Este processo não alterou a adesão dos conídios do fungo à célula hospedeira, já que em 7h não foi detectada a formação de hifas. Entretanto, ainda são necessários estudos que avaliem diferenças entre perfis de expressão gênica realizados com o co-cultivo utilizando conídios pré-germinados ou não.

### 1.3.3 Invasão tecidual e secreção de toxinas.

Após a aderência ao tecido, os dermatófitos necessitam monitorar e se adaptar ao pH do hospedeiro afim de obter nutrientes para sua sobrevivência. A obtenção de nutrientes se dá pela secreção de enzimas proteolíticas que clivam macromoléculas e permitem que estas sejam

assimiladas pelo fungo como fonte de energia. A secreção destas enzimas, principalmente as enzimas queratinolíticas, é considerada um fator de virulência importante (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017; MARTINEZ-ROSSI et al., 2021).

Os dermatófitos, como *T. rubrum*, são considerados queratinofílicos e queratinolíticos e, portanto, as queratinases estão entre as enzimas mais estudadas neste grupo de fungos. Estas enzimas são secretadas na forma de múltiplas serinas e metalo-endoproteases, além de outras proteases que só são altamente expressas durante a interação entre o fungo e as células de queratinócitos (BORAL et al., 2018).

Para que a queratina presente nos tecidos possa ser assimilada pelo fungo, é necessário que haja o rompimento das pontes dissulfeto e a destruição da integridade do tecido. Para isto, é necessário que ocorra a sulfitólise, processo pelo qual *T. rubrum* secreta sulfito através de bombas de efluxo de sulfito codificada pelo gene SSU1. A sulfitólise favorece a degradação da queratina em oligopeptídeos e aminoácidos que são assimilados pelo fungo durante o processo infeccioso (PERES et al., 2010; BORAL et al., 2018).

Além das queratinases, os fungos dermatofíticos regulam a expressão de outras enzimas como isocitrato liase, malato sintase e citrato sintase para sobreviverem em tecidos queratinizados (BORAL et al., 2018). Estas enzimas participam do ciclo do glioxilato e a ativação de enzimas pertencentes a este ciclo permite a sobrevivência celular do fungo em ambientes com baixa disponibilidade de glicose através da síntese deste nutriente a partir de lipídios e outras fontes alternativas de carbono (FLECK; SCHÖBEL; BROCK, 2011). A ativação do ciclo do glioxilato é considerado um fator importante de patogenicidade e virulência para fungos intracelulares de importância clínica como *Candida albicans* (MAYER; WILSON; HUBE, 2013), entretanto, o envolvimento do ciclo do glioxilato para *T. rubrum* ainda não está bem estabelecido, considerando que este fungo causa infecções superficiais.

Trabalhos de análise de expressão gênica de *T. rubrum* co-cultivado com queratinócitos HaCat mimetizando uma situação de infecção superficial, mostraram a indução de algumas enzimas envolvidas no ciclo do glioxilato, como os realizados por Komoto et al., (2015), Cantelli et al., (2017) e Petrucelli et al., (2018), sugerindo que a ativação das enzimas deste ciclo possa ser um fator de virulência importante na patogenicidade de *T. rubrum* durante o processo infeccioso.

Durante o processo infeccioso, o contato inicial do fungo sob a pele humana ocorre em um ambiente ácido, com pH em torno de 4.7. Este pH associado com ácidos graxos específicos da pele representam um mecanismo de defesa contra o ataque de microrganismos. Por outro lado, o pH ácido da pele também é ótimo para ação de enzimas queratinolíticas, lipases, fosfatases, contribuindo para a aderência e penetração do fungo ao tecido e favorecendo a captação de nutrientes e sobrevivência contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017).

A degradação de proteínas da pele e o metabolismo de alguns aminoácidos durante a penetração, resulta na liberação de amônia que promove a transição do pH anteriormente ácido para um pH alcalino, em torno de 7.5-8.9. Durante o processo de alcalinização, os dermatófitos adaptam-se rapidamente a esta mudança de pH e passam a expressar proteínas com atividade ótima em pH alcalino. Este processo adaptativo dos dermatófitos chamado de sistema regulatório de pH indica uma estratégia eficiente para o melhor estabelecimento, desenvolvimento e manutenção da infecção no hospedeiro (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017; GNAT et al., 2019; MARTINEZ-ROSSI et al., 2021).

Além da secreção de proteases e mecanismos regulatórios de pH, a liberação de toxinas também está envolvida no processo infeccioso de dermatófitos, contribuindo para o aumento da patogênese fúngica e ao dano tecidual (HUBE et al., 2015).

Alguns dermatófitos como *T. rubrum* produzem algumas toxinas lipofílicas, xantomegninas, hemolisinas e várias toxinas similares à aflatoxina que contribuem para a sua patogenicidade durante a infecção, pois apresentam características imunossupressivas (HUBE et al., 2015; BORAL et al., 2018). Além disso, os dermatófitos também produzem proteínas associadas ao domínio LysM, que são importantes para as infecções latentes, já que mascaram a quitina presente na parede celular fúngica, evitando o reconhecimento do patógeno pelo sistema imune humano (MARTINEZ et al., 2012; BORAL et al., 2018).

Outro aspecto importante durante a interação dermatófitos-hospedeiro é a formação de biofilmes, caracterizado por uma biomassa espessa incorporada em uma matriz extracelular contendo elementos fúngicos dormentes (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017).

*T. rubrum* é capaz de produzir biofilmes para impedir a penetração de agentes antifúngicos (BORAL et al., 2018) e a formação destes ocorre principalmente em infecções de unhas, ocasionando os dermatofitomas, uma espécie de onicomicose resistente a terapias

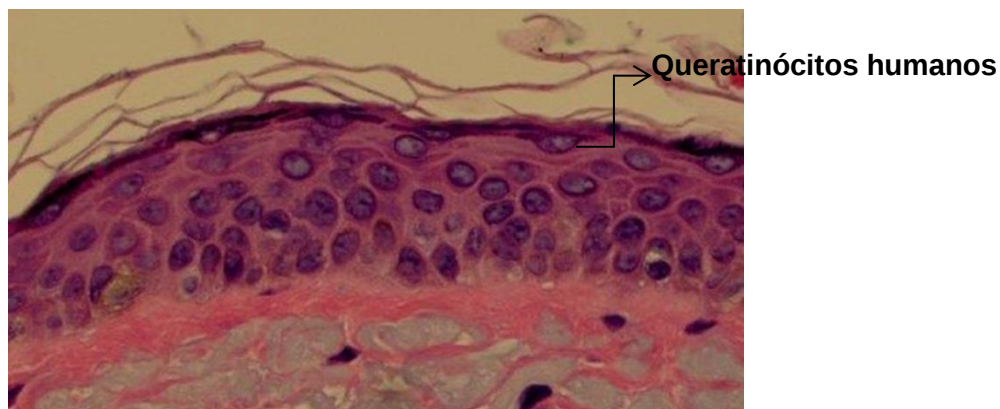
antifúngicas padrão, onde pode estar presente mais de uma espécie de microrganismo e elementos fúngicos vivos são fortemente aderidos à placa ungueal (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017). Desta forma, a capacidade dos dermatófitos em formar biofilmes pode ser considerada um importante fator de virulência auxiliando na proteção do fungo contra o estresse ambiental e promovendo uma comunicação microbiana (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017). Em adição aos biofilmes, *T. rubrum* também utiliza bombas de efluxo para a extrusão de drogas, dificultando a resposta ao tratamento para pacientes acometidos com dermatofitoses (BORAL et al., 2018).

#### **1.4 Queratinócitos humanos e a resposta imune nas dermatofitoses**

A pele humana é constituída de duas camadas básicas: a epiderme e a derme (LOSQUADRO, 2017), além de ser um órgão importante para o sistema imune principalmente pela produção de fatores solúveis como citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos produzidos por infiltração de leucócitos, mas também por queratinócitos e fibroblastos (HESSE-MACABATA et al., 2019).

A epiderme humana (Figura 7) consiste na camada mais superficial da pele e é formada por tecido epitelial estratificado queratinizado, atuando como uma barreira de defesa para o hospedeiro (KÖLLISCH et al., 2005). Ela é responsável pela cor, textura e umidade da pele e sua espessura é relativamente constante em toda a região da cabeça e pescoço (LOSQUADRO, 2017). Ela é dividida em três populações principais de células residentes: os queratinócitos, de origem epitelial, as células de Langerhans derivadas da medula óssea e os melanócitos neuroectodérmicos (KÖLLISCH et al., 2005). Além disso, a epiderme pode ser dividida em 4 camadas ou estratos, representando a maturação de células de queratinócitos da camada mais profunda à camada mais superficial. Este processo de maturação, também denominado de queratinização, permite o desenvolvimento de queratina. Sendo assim, a camada mais profunda da epiderme é denominada de estrato basal, seguida do estrato espinhoso, estrato granuloso até a camada mais externa denominada estrato córneo (LOSQUADRO, 2017).

**Figura 7- Microscopia da epiderme humana**



Fonte: LOSQUADRO, 2017

Dentre as células presentes na epiderme, os queratinócitos são as células majoritárias, correspondendo cerca de 90% de todas as células epidermais. Com isso, os queratinócitos são as primeiras células a entrarem em contato com o fungo durante o processo infeccioso das dermatofitoses e, conseqüentemente, participam diretamente na defesa contra as dermatofitoses e ativam demais células do sistema imune através da liberação de citocinas (BRASCH, 2010; SARDANA; GUPTA; MATHACHAN, 2021).

A formação das células de queratinócitos ocorre no estrato basal. Esta camada é composta por células tronco chamadas células basais, que se dividem para formar células de queratinócitos que começam a migrar para a próxima camada: o estrato espinhoso. Nesta camada, os queratinócitos formam ligações intercelulares por meio de canais de proteínas chamados desmossomos e migram para a próxima camada: o estrato granuloso. No estrato granuloso, a queratina presente nos queratinócitos começa a se agregar com estruturas proteicas denominadas filagrinas. Nesta camada, os queratinócitos também perdem suas organelas e tornam-se mais compactos. Após a compactação dos queratinócitos, estes passam a compor a última camada epidérmica denominada de estrato córneo, concluindo-se assim o processo de queratinização (LOSQUADRO, 2017).

#### **1.4.1. Sistema imune inato nas dermatofitoses**

O entendimento do sistema imune inato contra fungos obteve grande progresso com a descoberta de receptores do tipo *Toll* e receptores de glucanas como a dectina-1 e dectina-2.

O reconhecimento de um organismo invasor é o primeiro passo da resposta imune contra patógenos (BLUTFIELD et al., 2015). Na superfície das células de queratinócitos são expressos receptores específicos para o reconhecimento de patógenos, chamados de receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Estes receptores reconhecem padrões específicos presentes em patógenos, que são denominados de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), que incluem as mananas localizadas na parede celular fúngica e componentes da parede celular de bactérias (BRASCH, 2010; BLUTFIELD et al., 2015; SARDANA; GUPTA; MATHACHAN, 2021). A interação entre PRRs e PAMPs resulta na liberação de citocinas que ativam o sistema imune (BLUTFIELD et al., 2015).

Dentre a família de receptores PRRs estão os receptores do tipo Toll (TLRs) que são considerados como receptores de sinalização cruciais para a ativação do sistema imune inato (ALMEIDA et al., 2008). Os TLRs compreendem uma família de 10 receptores ao total que reconhecem diversos padrões distintos em humanos.

Sabe-se que os queratinócitos expressam receptores TLRs da família 1-6 e TLR9 (OLIVEIRA et al., 2015). Dentre estes, destacam-se os receptores TLR2 e TLR4, pois são responsáveis por reconhecerem componentes bacterianos e fúngicos além de mediar a produção de citocinas. O receptor TLR2 é característico por reconhecer componentes de bactérias Gram-positivas, lipoproteínas bacterianas e zimosano, enquanto o receptor TLR4 é responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e mananas (OLIVEIRA et al., 2015). Trabalhos realizados por Huang et al., (2015) mostraram que os receptores TLR2 e TLR4 foram induzidos por células de queratinócitos humanos HaCat em resposta a *T. rubrum*. Resultados similares foram obtidos por Brasch et al., (2014), ao detectar em um ensaio por imunohistoquímica a indução destes mesmos receptores comparando tecidos de biopsias de pacientes infectados predominantemente por *T. rubrum* contra pacientes saudáveis.

Além dos receptores TLRs, a categoria de receptores PRRs englobam também os receptores de lectina do tipo C (CLRs). Esses receptores são considerados importantes iniciadores da inflamação impulsionando a produção de citocinas, recrutando e ativando fagócitos (YOSHIKAWA; FERREIRA; DE ALMEIDA, 2015). No entanto, diferentemente dos receptores TLRs que reconhecem vários PAMPs como lipopolissacarídeos, proteoglicanos, DNAs e RNAs, as lectinas do tipo C reconhecem principalmente estruturas de carboidratos em patógenos (SAIJO; IWAKURA, 2011). Dentre os receptores pertencentes a esta família, destacam-se os receptores dectina-1 e a dectina-2 para o reconhecimento de patógenos fúngicos.

O receptor de  $\beta$ -glucanas dectina-1 corresponde a um receptor transmembranar contendo um domínio de reconhecimento de carboidrato tipo lectina que reconhece  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucanas da parede celular fúngica e leveduras. Este receptor modula a resposta celular contra leveduras ou conídios através da produção de citocinas pro-inflamatórias. Já o receptor de carboidratos dectina-2 se liga preferencialmente as hifas de várias espécies fúngicas, incluindo *T. rubrum* (ALMEIDA, 2008).

Taylor et al., (2007) e Saijo et al., (2007) demonstraram que os receptores dectina-1 e dectina-2 são específicos para  $\beta$ -glucanos e  $\alpha$ -mananos derivados de *C. albicans*, respectivamente, e induzem citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) para a proteção do hospedeiro contra infecções fúngicas.

Durante a interação entre queratinócitos-dermatófitos, ocorre o aumento da proliferação celular dos queratinócitos e mudanças em seus padrões de queratina, que resultam em alterações na composição da barreira epidérmica. Esta barreira também se torna reduzida, gerando um forte aumento na perda transepidérmica de água (BRASCH, 2010). Quando ocorrem estas lesões, os queratinócitos expressam alguns peptídeos antimicrobianos como as beta-defensinas humanas 2 e 3 (hBD-2, hBD-3), RNase7 e psoriasina, conhecidos por suas atividades antibacterianas. Entretanto, estudos recentes mostram que alguns desses peptídeos antimicrobianos podem fazer parte da defesa natural contra infecções por fungos (BRASCH et al., 2014; BLUTFIELD et al., 2015).

#### **1.4.2 Perfil de citocinas liberados por queratinócitos em resposta à *T. rubrum***

As citocinas são importantes para a regulação do sistema imune. O primeiro passo da sinalização de células na resposta imune é através do contato direto célula- célula por meio de proteínas transmembranas, iniciando a cascata de sinalização intracelular. De forma complementar, as citocinas também atuam na sinalização da resposta imune controlando o nível e ativação de células T e modulam o impacto de células efectoras nas células-alvo. Frequentemente, as citocinas são formadas em cascata, estimulando suas células- alvo a produzirem mais citocinas (SILK; MARGOLIN, 2019).

Sendo assim, esses polipeptídeos influenciam na atividade, diferenciação e proliferação da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, podendo ter caráter anti-inflamatório ou pró-inflamatório. (SILK; MARGOLIN, 2019).

As células de queratinócitos da epiderme correspondem a uma das principais contribuintes para a produção de citocinas epidérmicas. Muitas das citocinas identificadas são produzidas pelos queratinócitos de forma constitutiva ou por indução de algum estímulo. Estas citocinas incluem IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, e IL-20, TNF- $\alpha$  e interferons (IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (GRÖNE, 2002).

A secreção de citocinas é fundamental para a resposta imune adequada a diferentes patógenos (NIEBUHR; BAUMERT; WERFEL, 2010). Sabe-se que os queratinócitos são estimulados pelos dermatófitos para liberar múltiplas citocinas inflamatórias, sendo que dentre elas destacam-se IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6 e IL-16, importantes para a resposta inflamatória tecidual. Entretanto, o perfil de citocinas que serão secretadas pelos queratinócitos dependerá da espécie de dermatófitos infectante (BRASCH, 2009, 2010; SARDANA; GUPTA; MATHACHAN, 2021).

A diferença no perfil de expressão de citocinas de acordo com a espécie de dermatófitos infectante foi evidenciada por Shiraki et al. (2006). Neste trabalho, células de queratinócitos foram infectadas com espécies distintas de dermatófitos: o antropofílico *Trichophyton tonsurans* e o zoofílico *Arthroderma benhamiae*. Ao comparar a expressão de genes que codificavam variadas citocinas, foi observado que houve maior indução de genes que codificavam ampla variedade de citocinas quando os queratinócitos foram infectados com *A. benhamiae* (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IFN- $\gamma$ , G-CSF e GM-CSF), do que quando infectados por *T. tonsurans* (IL-8, IL-16 e eotaxina-2). Adicionalmente, Hau et al., (2015) também descreveram que dermatófitos antropofílicos como *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *Trichophyton schoenleinii* induzem a produção de IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  e eotaxina-2 em células de queratinócitos.

Dentre as citocinas secretadas por queratinócitos que foram citadas, a citocina GM-CSF vem se destacando no cenário imunológico de doenças fúngicas (NICOLATOU-GALITIS et al., 2001; SHIRAKI et al., 2006; LI; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2009a; GAVINO et al., 2014; DRUMMOND et al., 2018). Esta citocina é produzida por diversos tipos celulares após a estimulação por outras citocinas ou por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (BECHER; TUGUES; GRETER, 2016). Seu uso é discutido principalmente como adjuvante imunológico devido a sua capacidade de aumentar a maturação e função de células dendríticas e a atividade de macrófagos, sendo que já é utilizada para o tratamento de neutropenia em

pacientes com AIDS e pós-transplantados de medula óssea (SHI et al., 2006). Entretanto, seu papel na imunologia das dermatofitoses ainda é desconhecido.

Vale ressaltar que ainda são poucos os estudos que descreveram o perfil de citocinas secretadas por células de queratinócitos durante uma infecção por dermatófitos, em especial, por *T. rubrum* (SHIRAKI et al., 2006; TANI et al., 2007; OGAWA, 2010; HESSE-MACABATA et al., 2019).

### **1.5 Modelos de estudo da interação fungo-hospedeiro nas dermatofitoses**

Apesar de as dermatofitoses serem as infecções mais comuns em escala global (ZHENG et al., 2019), ainda há pouco conhecimento, principalmente em nível molecular, da patogenicidade de dermatófitos e consequentemente, dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro nesta patologia, em contraste com o que ocorre com outros fungos de interesse clínico, como *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* ou *Cryptococcus neoformans* (GRUMBT; MONOD; STAIB, 2011). Um dos fatores que poderiam explicar o reduzido número de estudos envolvendo os mecanismos moleculares na interação dermatófito-hospedeiro são as dificuldades técnicas dos modelos que mimetizam esta interação.

O modelo animal mais utilizado para o estudo das dermatofitoses é o porquinho da índia, entretanto, ele é adequado para ensaios realizados somente com espécies de dermatófitos zoofílicos (ACHTERMAN; WHITE, 2012). No caso do dermatófito *T. rubrum*, que não infecta naturalmente espécies não humanas, a utilização de modelos animais não é totalmente adequada para estudos com este fungo (FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018).

Para sanar este problema, vários modelos vêm sendo desenvolvidos para melhor compreensão das dermatofitoses (FACHIN et al., 2021). Tecidos epiteliais humanos disponíveis comercialmente podem representar uma alternativa para estudos dos estágios iniciais da infecção como adesão e invasão (ACHTERMAN e WHITE, 2012). Nosso grupo de pesquisa vêm utilizando novas ferramentas de estudos para análises transcricionais da interação dermatófito -hospedeiro como métodos de crescimento do fungo em meios de cultura contendo substratos proteicos que mimetizam a infecção e o co-cultivo de *T. rubrum* com a linhagem celular de queratinócitos e macrófagos humanos, que vêm sendo empregadas e são consideradas ótimas ferramentas para a análise de expressão gênica, possibilitando uma melhor compreensão de como a interação fungo-hospedeiro ocorre molecularmente (KOMOTO et al., 2015;

CANTELLI et al., 2017; PETRUCELLI et al., 2018; BITENCOURT et al., 2019; FACHIN et al., 2021).

Petrucelli et al., (2018) foram pioneiros em avaliar o perfil transcricional do dermatófito *T. rubrum* e de queratinócitos humanos HaCat em uma situação de co-cultivo utilizando a técnica de RNA-seq. Os autores destacaram a importância da modulação de genes fúngicos envolvidos na flexibilidade metabólica e assimilação de nutrientes pelo fungo durante o processo infeccioso, como genes envolvidos no ciclo do glioxilato, transportador de ácido carboxílico e o gene *ERG6*. Além disso, destacaram a indução de genes que codificam proteases queratinolíticas como a leucina- aminopeptidase 2 (*LAP2*) e a dipeptidil- peptidase V (*DPPV*). Já em relação aos genes de queratinócitos modulados, os autores destacaram a indução de genes pertencentes à categoria funcional de resposta imune (*SERPINE1*, *SLC11A1*, *RNASE7* e *CSF2*) e genes envolvidos no reparo da barreira epitelial (*FLG* e *KRT1*).

### **1.6 Genes triados por RNA-seq envolvidos na resposta imune de queratinócitos e no reparo da barreira epitelial**

A identificação dos genes humanos no artigo de Petrucelli et al (2018) foi base para o desenvolvimento do presente novo trabalho a fim de aprofundar os conhecimentos da participação destes genes na resposta imune de queratinócitos frente às dermatofitoses causadas por *T. rubrum*.

Resumidamente, os genes selecionados apresentam as seguintes funções principais:

- **CSF2**: codifica a citocina GM-CSF e foi considerada o principal alvo de estudo deste trabalho. Suas funções estão descritas em maiores detalhes a seguir.

- **SLC11A1**: codifica a proteína integral de membrana (Natural resistance-associated macrophage protein 1). Atua no transporte de íons divalentes, ativação de macrófagos e auxiliar na produção de óxido nítrico juntamente com outras respostas pró-inflamatórias (STOBER et al., 2007; WESSLING-RESNICK, 2015).

- **RNASE7**: codifica a ribonuclease 7 conhecida por apresentar pronunciada atividade antimicrobiana in vitro contra *C. albicans*, *Pichia pastoris*, *T. rubrum* e bactérias Gram positivas e Gram negativas (HARDER; SCHRÖDER, 2002; MEHRA et al., 2012; BECKNELL; SPENCER, 2016; RADEMACHER; SIMANSKI; HARDER, 2016; NIYONSABA et al., 2017).

- **SERPINE1 (Serpin Family A Member 1):** Através de abordagens computacionais este gene foi classificado como pertencente a um grupo de imunomoduladores que podem ser induzidos para conferir maior tolerância ao hospedeiro em infecções causadas por *A. fumigatus* e *C. albicans* (KIDANE; LAWRENCE; MURALI, 2013).

- **Genes envolvidos na manutenção da barreira epidérmica KRT1 e FLG:** O gene *FLG* é responsável por codificar a filagrina, uma proteína importante para a composição da barreira epidérmica. Durante a formação da barreira epitelial, a filagrina agrega a queratina 1 (codificada pelo gene *KRT1*), queratina 10 e outros filamentos intermediários dentro do citoesqueleto dos queratinócitos permitindo que estes adquiram a conformação achatada e compactada formando a barreira da epiderme (BROWN; IRVINE, 2008; MCGRATH, 2008). Além de participar da constituição da barreira epitelial, a queratina 1 também é responsável pela manutenção de sua integridade (BROWN; IRVINE, 2008; ROTH et al., 2012; DONG et al., 2017).

De todos os genes citados, com exceção do gene *RNASE7*, até o momento não existem relatos na literatura que descrevam a função ou a participação direta destes genes de resposta imune nas dermatofitoses ou com o dermatófito *T. rubrum*.

### 1.7 A citocina GM-CSF (Gene CSF2)

A citocina GM-CSF, conhecida como fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos, codificada pelo gene *CSF2*, foi inicialmente identificada como indutora *in vitro* da proliferação e diferenciação de progenitores da medula óssea em granulócitos e macrófagos. Dados pré-clínicos indicam que GM-CSF tem uma ampla gama de funções em diferentes tecidos. Estudos de deleção desta citocina sugerem como importante alvo terapêutico em vários distúrbios inflamatórios e autoimunes, por exemplo, artrite reumatoide (LEE; ACHUTHAN; HAMILTON, 2020).

GM-CSF se liga ao seu receptor multimérico GM-CSFR que apresenta uma subunidade  $\alpha$  de ligação ao ligante de baixa afinidade (GM-CSFR $\alpha$ ) e uma subunidade  $\beta$  de transdução de sinal (GM-CSFR $\beta$ ), sendo esta última compartilhada com a interleucina-3 (IL-3) e receptores de interleucina-5 (IL-5). A ativação de GM-CSFR desencadeia a fosforilação da subunidade GM-CSFR $\beta$ , que leva à ligação do transdutor de sinal e do ativador de transcrição 5 (STAT5), iniciando assim a sinalização Janus Kinase (JAK) 2 e a ativação das vias MEK/ ERK, fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e NF $\kappa$ B (LEE; ACHUTHAN; HAMILTON, 2020; PETRINA; MARTIN; BASTA, 2021).

Esta citocina desempenha um papel fundamental na inflamação sendo seus níveis circulantes basais em condições homeostáticas baixos, porém aumentam significativamente durante a inflamação ou quando há a estimulação por outras citocinas ou PAMPs de patógenos (BECHER; TUGUES; GRETER, 2016; PETRINA; MARTIN; BASTA, 2021).

Sabe-se que GM-CSF é liberada por vários tipos celulares, incluindo células epiteliais (BECHER; TUGUES; GRETER, 2016). É produzida também por várias células do sistema imunológico, incluindo monócitos, macrófagos e células T e B ativadas em resposta à infecção. Durante esses eventos, citocinas pró-inflamatórias como interleucina-6 (IL-6), TNF- $\alpha$  e IL-23 induzem a produção de GM-CSF por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativadas. Esta ativação é benéfica para o hospedeiro no combate a infecções, mas pode ser prejudicial em condições inflamatórias crônicas (PETRINA; MARTIN; BASTA, 2021).

A citocina GM-CSF também tem um papel importante na expansão de células supressoras derivadas do mieloide (medula) (MDSCs) para a resolução da inflamação na cicatrização de feridas e reparo tecidual. Investigações científicas recentes apontam o uso clínico de GM-CSF na terapia do câncer. O vírus oncolítico Talimogene laherparepvec, que codifica GM-CSF, já foi aprovado para o tratamento local de melanoma avançado. Além disso, GM-CSF recombinante já foi aprovada para outros estudos clínicos incluindo o tratamento de neutropenia em pacientes recém transplantados de medula óssea, em tratamento de quimioterapias e portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SHI et al., 2006; BHATTACHARYA et al., 2015; PETRINA; MARTIN; BASTA, 2021). Demais estudos também relatam que GM-CSF também pode apresentar efeitos neuroprotetores após lesões de nervo (LEE; ACHUTHAN; HAMILTON, 2020).

Recentes estudos também apontam para o uso de GM-CSF como adjuvante em preparações de vacina para o aumento da imunogenicidade e obtenção de resposta imune mais eficiente. Esta citocina foi testada em vários ensaios em animais e humanos como adjuvante de vacina para a imunoterapia antitumoral em câncer de próstata, pele, mama e pulmão com resultados variáveis. O uso de GM-CSF como adjuvante para essas vacinas tem o objetivo promover o aumento da resposta imune antitumoral através do aumento da apresentação de antígenos específicos do tumor, e com isso induzir melhor ativação de células T (P et al., 2004; LH et al., 2017; JL et al., 2019; STENZL, 2020; PETRINA; MARTIN; BASTA, 2021).

Níveis aumentados de GM-CSF foram recentemente observados em pacientes com COVID-19. Em alguns modelos animais de infecções respiratórias, o uso intranasal de GM-

CSF promoveu o aumento da proliferação de macrófagos alveolares, ocasionando melhora do quadro clínico. Embora o uso de GM-CSF possa ser benéfico em algumas circunstâncias, quando há uma resposta inflamatória desproporcional, como em pacientes com COVID-19, a inibição da sinalização de GM-CSF pode ser benéfica para a melhoria do dano pulmonar gerado pela hiper inflamação em casos mais graves da doença (A et al., 2020; LEE; ACHUTHAN; HAMILTON, 2020; PETRINA; MARTIN; BASTA, 2021).

Ainda é desconhecida a função específica de GM-CSF nas dermatofitoses, principalmente as causadas por *T. rubrum*, além das funções já conhecidas que essa citocina apresenta no sistema imune. Através de sequenciamento duplo da interação fungo- hospedeiro, Petrucelli et al., (2018) identificaram a indução do gene CSF2 em queratinócitos humanos co-cultivados com *T. rubrum*. O efeito antifúngico desta citocina já foi descrito para o tratamento de candidíase pseudomembranosa (NICOLATOU-GALITIS et al., 2001).

Demais autores discutem os benefícios e efeitos terapêuticos do uso de GM-CSF como adjuvante no tratamento de pacientes com deficiência em CARD9 (deficiência da proteína 9 do domínio de recrutamento de caspase humana) que está associada ao desenvolvimento espontâneo de infecções fúngicas que atingem o sistema nervoso central (GAVINO et al., 2014, 2016; DRUMMOND et al., 2018).

Considerando um possível potencial antifúngico de GM-CSF, torna-se importante realizar estudos mais aprofundados a fim de avaliar o papel que esta citocina apresenta em infecções dermatofíticas.

## **1.8 Ferramentas moleculares para a deleção de genes**

### **1.8.1. Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi)**

Em células de mamíferos, a degradação do RNA de um gene específico com o uso da tecnologia de RNA interferência (RNAi) tem sido uma das tecnologias mais utilizadas para estudar os efeitos da perda da função de genes individuais. A degradação específica do gene do mRNA é uma forma de silenciar a expressão gênica individual após a transcrição. (HAIYONG, 2018).

O silenciamento de RNA é um mecanismo de regulação gênica essencial em organismos eucariotos. Este mecanismo é guiado por pequenos RNAs (sRNAs) de 20-25 nt de comprimento que são importantes para diversos processos biológicos incluindo regulação da expressão de

genes endógenos, inibição de infecções virais além de evidências apontarem que os sRNAs também podem funcionar como agentes antimicrobianos contra patógenos não virais através do silenciamento de alvos gênicos em células de patógenos invasores (HOU; MA, 2020).

O silenciamento gênico por RNAi tem sido amplamente usado como ferramenta biotecnológica para silenciar a expressão de genes individuais após a transcrição e com isso estudar a função celular destes genes. Para isso, um RNA de interferência sintético (siRNA) específico para cada gene é utilizado para induzir o silenciamento de genes em células de mamíferos (HAIYONG, 2018).

Resumidamente, o processo de silenciamento gênico por siRNA é realizado com as seguintes etapas: síntese de oligonucleotídeos de siRNA gene-específicos; escolha da linhagem celular de mamífero a qual deseja-se realizar o silenciamento gênico; inserção do siRNA nas células através de transfecção ou eletroporação; avaliação do knockdown do gene através de RT-PCR e Western Blotting; e por fim os estudos funcionais para avaliar o efeito celular do silenciamento gênico (HAIYONG, 2018).

O silenciamento gênico por siRNA é transiente. A deleção do gene pode ser detectada a partir de 4 horas até 7 dias. Entretanto, o ideal é que análises funcionais do gene específico sejam realizadas de 24-96 h. Já em relação à inserção do siRNA nas células, os métodos de entrega apresentam vantagens e desvantagens. O método de transfecção é simples e não requer equipamentos específicos, porém não é adequado para células primárias ou em suspensão. Já o método de eletroporação apresenta uma eficiência melhor, porém muitas vezes causa alta morte celular e é necessário a utilização de eletroporador. A seleção de cada método dependerá das condições experimentais e células utilizadas (HAIYONG, 2018).

### **1.8.2 Edição gênica por CRISPR-CAS9**

As novas tecnologias de sequenciamento de DNA em larga escala e tecnologias de edição de genomas têm possibilitado novos avanços na terapia genética. Desta forma, a sequência do genoma humano pode ser manipulada com precisão para atingir um determinado fim terapêutico, incluindo a correção de mutações causadoras de doenças, adição de genes a locais específicos no genoma ou a remoção de genes ou sequências de genoma deletérios (MAEDER; GERSBACH, 2016; CARROLL, 2017).

Dentre as formas de edição de genes cita-se o nocaute ou mutação de um gene específico, deleção, correção ou inserção de gene sendo o método de CRISPR/Cas9 tem sido o mais utilizado (MAEDER; GERSBACH, 2016; CARROLL, 2017; DOUDNA, 2020).

O sistema CRISPR-Cas (repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas) corresponde a um mecanismo de imunidade adaptativa bacteriana contra ácidos nucleicos invasores derivados de bacteriófagos ou plasmídeos (HRYHOROWICZ et al., 2017). Através deste mecanismo de defesa, um segmento do DNA exógeno de aproximadamente 20 pb é copiado no genoma do hospedeiro em um locus denominado de CRISPR que atua como um local de memória à patógenos invasores. Em futuras invasões por este mesmo microrganismo, ocorre a transcrição de uma fita complementar ao segmento de DNA que foi copiado neste locus, denominada de crisp RNA (crRNA). O crRNA reconhece e se liga por complementariedade de bases ao DNA do micro-organismo invasor e através de uma associação com a endonuclease Cas, ocorre a quebra de fita dupla do DNA do patógeno inibindo integração e replicação no hospedeiro (LAFOUNTAINÉ; FATHE; SMYTH, 2015).

Com base na descoberta deste mecanismo de defesa imunológico em procariotos, pesquisadores desenvolveram a técnica de edição gênica CRISPR- Cas9 onde é possível realizar pequenas mutações como deleções ou inserções em um gene alvo através de um RNA guia (gRNA) sintetizado para atingir o gene que se pretende alterar. Neste mecanismo, o gRNA liga-se à proteína Cas9 induzindo mudanças conformacionais para a sua ativação. Após a ativação de Cas9, esta liga-se à sequência de DNA alvo que se deseja alterar e realiza a clivagem do genoma através de quebras de fita dupla. Esta quebra induz processos de reparo de DNA celular endógeno que podem ser explorados para a engenharia do genoma através da inserção ou deleção na sequência do genoma que geralmente resultam na interrupção da função do gene-alvo (LAFOUNTAINÉ; FATHE; SMYTH, 2015; HRYHOROWICZ et al., 2017).

O sistema CRISPR/Cas9 permite a modificação permanente no genoma e portanto a síntese do gRNA deve ser altamente específica para evitar alterações fora do locus alvo (HRYHOROWICZ et al., 2017). Enquanto o sistema CRISPR apresenta alta especificidade em células bacterianas, em células de mamíferos é descrito uma alta frequência de atividade não específica Cas9, ocasionando mutagêneses em regiões distintas aos alvos desejados (GUPTA et al., 2019).

### 1.8.3 Ferramentas para a deleção de genes em fungos

A ruptura gênica é uma ferramenta genética importante para a identificação da função e estudo dos genes de virulência em fungos (KWON-CHUNG, 1998).

Dentre estas ferramentas, a ruptura de genes direcionados por recombinação homóloga desempenha um papel importante na determinação de funções de genes para estudos de genética molecular em dermatófitos (YAMADA et al., 2009). Além disso, demais técnicas como CRISPR-CAS9, recombinação específica (*CRE/loxP*) e sistemas mediados por endonucleases também podem ser utilizados (MEI et al., 2019).

Como exemplo de estudos de ruptura gênica para avaliar a função de genes de virulência no dermatófito *T. rubrum*, Fachin et al., (2006) destacaram a importância do transportador de múltipla resistência a drogas *TruMDR2* sugerindo a importância deste transportador para o efluxo de drogas em *T. rubrum*. Recentemente, Bitencourt et al., (2020) também destacaram a importância do fator de transcrição *HacA* para a fisiologia e virulência de *T. rubrum* através de disrupção gênica e seleção de mutantes *ΔhacA*.

Apesar de serem ferramentas importantes para o estudo da patogenicidade de dermatófitos, a construção de cepas deficientes (mutantes nulos) para tal finalidade pode ser demorada e dificultada pela baixa eficiência de recombinação homóloga para esses fungos. Desta forma, o uso de RNA interferência também pode ser útil e já foi utilizado para o estudo das proteases SUB3 e DPPIV em dermatófitos (VERMOUT et al., 2007)

### 1.8.4: Efeitos biológicos de Frequências Extremamente Baixas (ELF) e uso para a redução da expressão gênica

Os campos eletromagnéticos de frequência extremamente baixa (ELF) apresentam frequência inferior a 100Hz e intensidade de campo magnético variando de 0,1 a 20 mT e são utilizados na magnetoterapia. Esta terapia em uso clínico apresenta um aumento crescente devido aos seus efeitos benéficos em diversos processos como doenças de pele, inflamação e distúrbios ósseos (PASI et al., 2016).

Diversos efeitos biológicos com o uso ELF já são descritos na literatura, como por exemplo, inibição de células cancerosas (TANG et al., 2019), aumento da expressão do gene que codifica a glicose oxidase em *Pichia pastoris* (ANSARI et al., 2017), doenças reumatológicas, doenças ósseas como a osteoporose (HADDAD; AG; P, 2007), reparo tecidual (BERTOLINO et al., 2006) entre outras.

Entretanto, os mecanismos microscópicos que regem estes efeitos biológicos ainda apresenta resultados controversos, visto que os efeitos podem variar em diferentes condições e tipos celulares (PASI et al., 2016). Diferenças nos efeitos de ELF na proliferação celular de queratinócitos humanos, por exemplo, foram relatados por Huang et al., (2014) ao comparar o efeito destas frequências utilizando tipos celulares diferentes.

Estudos também apontam para os efeitos da ELF no DNA. Estudos *in vivo* sugerem a ativação do DNA quando as correntes iônicas passam através dele no núcleo de células musculares (BLANK; GOODMAN, 2011). Foi demonstrado também que a exposição a campos eletromagnéticos de frequência extremamente baixa pode afetar diversas atividades celulares, incluindo a expressão gênica. Considerando que as células utilizam correntes elétricas para realizar suas atividades, a exposição a frequências extremamente baixas pode induzir diferentes respostas celulares através da expressão de mRNA (SANIE-JAHROMI; SAADAT; SAADAT, 2016). Estudos realizados por Sanie-Jahromi; Saadat; Saadat (2016) mostraram que a exposição de células MCF-7 com cisplatina e ELF alteraram o perfil de expressão gênica de genes envolvidos com o reparo de DNA. Resultados similares de expressão gênica também foram observados ao utilizar a combinação entre ELF, cisplatina e morfina em células MCF-7 e SH-SY5Y (SANIE-JAHROMI; SAADAT, 2018).

Considerando os efeitos que o uso de ELF pode causar nos níveis de expressão gênica de mRNA, utilizamos frequências extremamente baixas desenvolvidas pela Empresa Effatha para avaliar se estas eram capazes de deletar ou reduzir a expressão do gene *CSF2* em queratinócitos humanos HaCat.

A Tecnologia Effatha é em seu núcleo, composta por um algoritmo capaz de criar sequências de frequências extremamente baixas, inofensiva aos seres humanos e ao meio ambiente, tipicamente encontradas na natureza, para aumentar ou diminuir o espaço interatômico de qualquer elemento ou substância, química ou biológica, aumentando ou atenuando as propriedades físico-químicas de seus elementos constituintes. As sequências de frequências criadas pela Tecnologia Effatha precisam ser replicadas de tal forma que consigam alcançar os elementos químicos ou biológicos que são alvo do tratamento desenvolvido de forma extremamente dirigida. Sendo assim, estas frequências são capazes de aproximar o espaço inter atômico dos elementos químicos que compõem os nucleotídeos de tal forma que esta compactação proporciona uma alteração estrutural (proximidade/ compactação) da

sequência de interesse impedindo ou interferindo na ligação da RNA polimerase, e consequentemente, impedindo a transcrição gênica (EFFATHA, 2021).

A forma economicamente viável encontrada para conseguir isso foi através da utilização de dispositivos RFID, que com os devidos ajustes em seu firmware passam a ter aplicação dirigida a replicação de sequências de frequências (informações fornecidas pelo desenvolvedor da Tecnologia Effatha). Desta forma, foram disponibilizadas para a empresa, as sequências genômicas específicas do gene *CSF2* para a elaboração das frequências e formatação do dispositivo RFID (Figura 8.).

**Figura 8- Cartão (A) contendo dispositivo RFID (B) para a emissão das frequências geradas pela EFFATHA.**



Fonte: Arquivo Pessoal

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar da importância clínica das dermatofitoses, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares e celulares que estão envolvidos na patogenicidade dos dermatófitos e na resposta de defesa que o hospedeiro apresenta frente a estas infecções. Modelos de infecções *in vitro* e novas abordagens de estudos moleculares têm permitido novas perspectivas em quase todas as áreas de pesquisa para estudo da patogenicidade em microrganismos. Para que a participação dos genes humanos triados pelo nosso grupo de pesquisa por RNA-seq envolvidos na resposta celular imune inata e na manutenção da estabilidade da barreira epidérmica durante a infecção por *T. rubrum* seja melhor compreendida, é necessário avaliar seus perfis de expressão ao longo do processo infeccioso, além de estudos celulares como o perfil de secreção de citocinas por queratinócitos durante o co-cultivo utilizando diferentes fases de crescimento de *T. rubrum* (fase conidial e fase germinativa). Dentre os genes modulados, maiores estudos se fazem necessários em relação ao gene que codifica a citocina GM-CSF (*CSF2*) e sua relação com dermatofitoses causadas por *T. rubrum*, pois esta citocina já mostrou atividade antifúngica

contra *C. albicans* e atualmente vêm sendo utilizada em diversas terapias. Para complementar estes estudos, se faz imprescindível à deleção do gene alvo CSF2 para elucidar sua função no processo de defesa dos queratinócitos humanos contra *T. rubrum*, já que estas células são os principais elementos envolvidos no desencadeamento inicial da resposta imunológica.

### 3. HIPÓTESE

Os genes, *SLC11A1*, *RNASE7*, *SERPINE1*, *FLG* e *KRT1* e principalmente o *CSF2* de queratinócitos humanos HaCat participam da resposta imune inata do hospedeiro através de sua modulação durante diferentes condições de co-cultivo com *T. rubrum*.

A deleção do gene *CSF2* que codifica a citocina GM-CSF pode evidenciar a importância deste gene e dessa citocina para a defesa de queratinócitos contra *T. rubrum*.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de genes envolvidos na resposta imune inata durante o co-cultivo de queratinócitos humanos com diferentes condições de cultivo com *T. rubrum*.

#### 4.2.1 Objetivos específicos

- A) Avaliar a modulação dos genes *CSF2*, *SLC11A1*, *RNASE7*, *SERPINE1*, *FLG* e *KRT1* selecionados a partir do trabalho de Petrucelli et al., (2018) por qPCR em situações de co-cultivo com conídios de *T. rubrum* inativados pelo calor e em fases conidial e germinativa;
- B) Quantificação da liberação da citocina GM-CSF (codificada pelo gene *CSF2*) com elementos fúngicos de *T. rubrum* em fase conidial e germinativa comparados com o LPS bacteriano;
- C) Avaliação da necessidade de contato entre queratinócitos HaCat e *T. rubrum* para a liberação da citocina GM-CSF;
- D) Análise da viabilidade celular de células HaCat desafiadas com *T. rubrum* em fase conidial e germinativa e com diferentes concentrações de LPS;
- E) Avaliação da expressão do gene *CSF2* em células HaCat desafiadas com diferentes concentrações de LPS;

- F) Quantificação da liberação das citocinas. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$  a partir do sobrenadante do co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum* em fase germinativa e conidial;
- G) Análise do efeito da repressão do gene *CSF2* em queratinócitos HaCat co-cultivados com *T. rubrum* utilizando frequências extremamente baixas.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Linhagens utilizadas**

#### **5.1.1 *Trichophyton rubrum***

Foi utilizada a linhagem sequenciada pelo Broad Institute CBS 118892. O cultivo da linhagem foi realizado em meio de cultura ágar Sabouraud por 15 dias a 28°C, segundo os métodos previamente descritos por Bitencourt et al. (2016).

#### **5.1.2 Queratinócitos Humanos HaCat**

Foi utilizada a linhagem imortalizada de queratinócitos humanos HaCat adquiridas do Banco de Linhagens do Rio de Janeiro. O cultivo da linhagem foi realizado em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) acrescido de 1,2 g de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) e 2,38 g de Hepes (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultlab, Campinas, Brasil), mantida em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.2. Ensaio do Co-cultivo de *T. rubrum* em linhagem de queratinócitos humanos HaCat.**

#### **5.2.1. Preparação de queratinócitos HaCat**

A linhagem celular de queratinócitos humanos foi cultivada em garrafas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir 90% de confluência. Após, as células foram tripsinizadas, ajustadas para a concentração de  $2,0 \times 10^5$  cél/mL em câmara de Neubauer e transferidas em placas de 6 poços em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para permitir a aderência celular.

### 5.2.2. Preparação da suspensão de conídios de *T. rubrum*

Placas da linhagem CBS 118892 de *T. rubrum* foram cultivadas em meio ágar Sabouraud por 15 dias e mantidas à 28°C. Após esse período, a superfície micelial das placas foi raspada com o auxílio de uma espátula estéril para o preparo de suspensão de conídios em salina 0,9%. A solução foi filtrada em lã de vidro e a concentração ajustada em câmara de Neubauer para  $1,0 \times 10^7$  conídio/mL.

### 5.2.3. Co-cultivo da linhagem HaCat com elementos fúngicos de *T. rubrum* em fase conidial e germinativa.

Após o período de 24 horas de incubação para aderência das células HaCat ( $2,0 \times 10^5$  cél/mL), o meio de cultura foi retirado e foi inoculada a suspensão de conídios ( $1,0 \times 10^7$  conídio/mL) de acordo com cada condição de crescimento dos conídios, conforme descritas abaixo:

**Elementos fúngicos em fase conidial:** a suspensão de conídios foi centrifugada à 1730g para a retirada da salina e o sedimento foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 com 5% de soro bovino fetal e inoculada diretamente nas células de queratinócitos HaCat.

**Elementos fúngicos em fase germinativa:** a suspensão de conídios foi centrifugada à 1730g para a retirada da salina e o sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de meio Sabouraud e incubado em agitador orbital sob agitação de 130 RPM à 28°C por 7 horas para induzir o início da germinação dos conídios. Após este período, foi realizada nova centrifugação e o sedimento de conídios foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal para co-cultivo em linhagem de queratinócitos, conforme descrito por Petrucelli et al., (2018).

Para ambos os métodos de co-cultivo foi utilizado como controle a cultura de queratinócitos sem a presença do fungo.

As placas de 6 poços foram re-incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante os períodos de 24h e 48h a fim de avaliar os níveis de expressão gênica dos genes de interesse em diferentes intervalos de tempo.

### 5.2.5 Inativação dos conídios de *T. rubrum* pelo calor

Para a inativação, as soluções de conídios em fases conidial e germinativa foram aliquotadas em tubos de microcentrifuga de 2mL e inativadas pelo calor a 65 °C por 30 min conforme descrito por Chai et al., (2010). Para confirmar a inativação dos conídios, uma alíquota de 100 µL da solução

de conídios foi plaqueada em placas de Petri e incubadas em estufa à 28°C por 7 dias, para comprovar a ausência de crescimento microbiano. Após a inativação, o co-cultivo foi realizado conforme descrito no item 5.2.3 por 24 e 48 horas.

### **5.3 Ensaio para comprovar a necessidade de contato celular durante o co-cultivo da linhagem HaCat e *T. rubrum* utilizando as placas com suportes permeáveis *Transwell*.**

#### **5.3.1 Preparação de queratinócitos HaCat.**

A preparação da linhagem de queratinócitos HaCat foi realizada conforme descrito no item 5.2.1. Após o ajuste da concentração celular, as células foram transferidas para a parte inferior da placa de 6 poços contendo os suportes permeáveis *transwell*® (Corning, Nova York, EUA). As placas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para permitir a aderência celular.

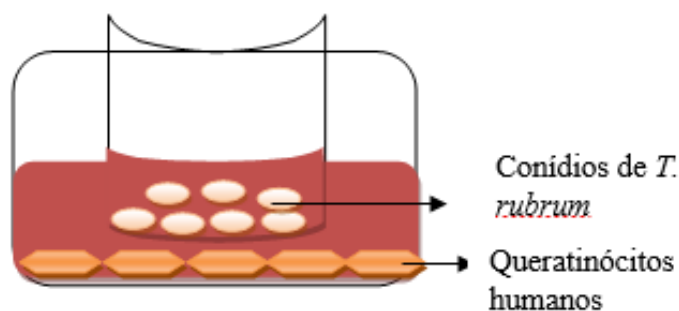
#### **5.3.2 Preparação da suspensão de conídios de *T. rubrum*.**

A preparação da suspensão de conídios foi realizada conforme descrito no item 5.2.2, e para este ensaio foi realizado com a fase conidial de *T. rubrum*.

#### **5.3.3 Co-cultivo da linhagem HaCat e *T. rubrum* em placas com suportes permeáveis *Transwell*.**

Após o período de aderência celular dos queratinócitos, o meio de cultivo foi descartado e substituído por 3 mL de meio RPMI suplementado com 5% de soro bovino fetal adicionado diretamente no compartimento inferior da placa de 6 poços contendo os suportes permeáveis *transwell*. Já a suspensão de conídios previamente preparada na concentração de  $1 \times 10^7$  com/mL, foi ressuspensa em meio RPMI 5% e inoculada uma alíquota de 2mL na parte superior do suporte permeável *transwell* (Figura 9). Os suportes permeáveis utilizados neste ensaio foram de membrana de policarbonato com poro de 0.4 µm. Esta metodologia foi realizada conforme descrito por Li e Dongari-Bagtzoglou (2009).

**Figura 9- Esquema ilustrativo da montagem da placa contendo o suporte permeável *transwell*.**



Fonte: Arquivo Pessoal

As placas foram reincubadas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24, e 48h. Após os respectivos intervalos de tempo, o sobrenadante da parte inferior da placa contendo os suportes permeáveis foi retirado e armazenado em freezer -80° C. Para a extração de RNA dos queratinócitos, 1mL de Tri-Reagent® (Sigma-Adrich, San Luis, EUA) foi adicionado na parte inferior da placa onde continham as células humanas. O co-cultivo descrito no item 5.2.3 foi utilizado como controle positivo para este experimento.

#### **5.4 Ensaio de queratinócitos HaCat desafiados com diferentes concentrações de LPS.**

A preparação das células de queratinócitos HaCat para este ensaio seguiu a mesma metodologia descrita no item 5.2.1. Após o período de aderência celular, o meio de cultura foi retirado e inoculado novo meio de cultura (RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB), sem a adição de antibióticos, contendo LPS de *E. coli* em 3 concentrações: 0,5 µg/mL (conforme descrito por De Camargo Pereira et al., 2013), 2,5 µg/mL e 5 µg/mL.(descrito no item 5.5)

Após a inoculação do meio de cultura contendo as 3 concentrações de LPS, as células foram reincubadas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h e 48h.

Como controle foi utilizado a cultura de queratinócitos HaCat sem a presença de LPS.

#### **5.5 Reconstituição de LPS de *E. coli*.**

Foi utilizado o lipopolissacarídeo de *E. coli* (Sigma-Adrich, San Luis, EUA), purificado através de extração por fenol. A reconstituição foi realizada conforme recomendações do fabricante. Para isso, a alíquota liofilizada contendo 10mg de LPS foi reconstituída em PBS 1x estéril para a

concentração de 5mg/mL. A solução foi distribuída em alíquotas contendo 100µL e armazenada em freezer (-20°C) para uso posterior.

### 5.6 Ensaio de viabilidade celular através da quantificação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH).

A citotoxicidade de células HaCat desafiadas com diferentes concentrações de LPS e do co-cultivo com *T. rubrum* em fase conidial e germinativa foi avaliada através do ensaio de LDH. Para a quantificação, foram retiradas alíquotas de 50µL por poço do sobrenadante da cultura celular para cada condição testada, nos tempos de 24 e 48h. As alíquotas foram misturadas com 100 µL do reagente de mistura (TOX7- Sigma Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante em placa de 96 poços. As placas foram cobertas com material opaco e incubadas em temperatura ambiente por 20 min. A absorbância foi lida em um leitor de microplacas Multiscan FC (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, EUA) em 490 e 690 nm. O percentual de liberação de LDH foi calculado conforme descrito por Grosse et al., (2013). Os experimentos foram realizados em triplicata em 3 experimentos independentes.

### 5.7 Ensaio da redução da expressão do gene *CSF2* utilizando frequências da Tecnologia Effatha

Para o ensaio de deleção do gene *CSF2* foram utilizados os dispositivos emissores das frequências desenvolvidas com a tecnologia Effatha, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Paulo Peitl Júnior. Para isso, as sequências de frequências Effatha foram estabelecidas de acordo com o descrito nos pedidos de patente de invenção depositados no INPI e PCT sob números **BR102017023442-8** e **PCT/BR2018/050393** respectivamente.

A sequência de mRNA do gene alvo *CSF2* (NM\_000758.4) foram então submetidas aos algoritmos Effatha e o conjunto de frequências calculadas, processadas e depositadas nos chips de exposição das culturas. A sequência de mRNA de *CSF2* utilizada foi:

```
>M11220.1 Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)
mRNA
ACACAGAGAGAAAGGCTAAAGTTCTCTGGAGGATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGC
CTGCAGCATCTCTGCACCCGCCGCTCGCCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATC
CAGGAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCA
TCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCT
GCGGGGCAGCCTACCAAGCTCAAGGGCCCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCT
CCAACCCCGGAACTTCCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACT
TTCTGCTTGTCATCCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAGTGAGACCGGCCAGATGAGGCTGGCCA
AGCCGGGGAGCTGCTCTCTCATGAAACAAGAGCTAGAAACTCAGGATGGTCATCTTGGAGGGACCAAGGG
GTGGGCCACAGCCATGGTGGGAGTGGCCTGGACCTGCCCTGGGCACACTGACCCTGATACAGGCATGGCA
```

GAAGAATGGGAATATTTTATACTGACAGAAATCAGTAATATTTATATATTTATATTTTTAAAAATATTTAT  
TTATTTATTTATTTAAGTTCATATTCATATTTATTCAAGATGTTTTACCGTAATAATTATTATTTAAAAA  
TAGCTTCTAAAAA

A preparação dos queratinócitos HaCat foi realizada conforme descrito no item 5.2.1, e a suspensão de conídios de *T. rubrum* conforme descrito no item 5.2.2.

Foi realizado o co-cultivo utilizando conídios de *T. rubrum* em fase conidial, conforme descrito no item 5.2.3. Após a inoculação de conídios de *T. rubrum* nas células de queratinócitos, o chip desenvolvido com a tecnologia Effatha foi aderido externamente no fundo da placa de 6 poços, de modo que o chip abrangesse externamente todos os poços presentes na placa de cultivo. As placas contendo os chips foram incubadas em estufa separada das demais culturas celulares à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h, 48h e 54h. Como controles foram utilizados somente a cultura de queratinócitos comparado e o co-cultivo de queratinócitos HaCat com conídios de *T. rubrum* sem a presença do chip, incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h, 48h e 54h.

Após os respectivos intervalos de tempo, foram coletados os sobrenadantes de cada condição para a análise da secreção da citocina GM-CSF, e o RNA foi extraído utilizando-se 1 mL de Tri-Reagent® (Sigma-Adrich, San Luis, EUA).

Para avaliar em microscópio ótico o efeito da utilização dos chips neste ensaio, foi realizada a coloração de MayGrunwald- Giemsa.

## 5.8 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada com o uso do TRI Reagent® (Sigma-Adrich, San Luis, EUA). Após os respectivos períodos de incubação, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 1mL de TRI Reagent® diretamente aos poços. Após 5 min de leve homogeneização o conteúdo foi armazenado em microtubos em freezer -80°C até o momento da extração. A extração de RNA total foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação de RNA total e sua pureza, foi verificada através do Nanophotometer MidSci (IMPLEN, Westlake Village, EUA). A integridade do material genético foi avaliada através de eletroforese em gel de Agarose.

## 5.9 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems, Waltham, EUA). Para a reação, 1 µg de RNA total de cada condição (controle de células HaCat, co- cultivo, e células HaCat incubadas com LPS) foram tratados com o Kit DNase 1 Amplification Grade® (Sigma-Adrich, San Luis, EUA) e para a transcrição reversa foram utilizados 2 µL de tampão [10X], 0.8 µL dNTP mix [2.5X], 2 µL random primer [10X] e 1 µL de

Multiscribe Reverse Transcriptase e o volume final ajustado com q.s.p 10 µL de água DEPC. As condições de ciclagem foram 10 min a 25°C, seguida de 2 horas a 37°C e por fim, 5 min a 85°C. Ao final da transcrição, os cDNAs foram armazenados em freezer -80°C até a utilização deles para a validação por PCR quantitativo.

### 5.10 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

Foram selecionados os genes *CSF2*, *SLC11A1*, *RNASE7*, *SERPINE1*, *FLG*, *KRT1* e *TLR4* para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR. O experimento foi realizado em triplicata com o Kit SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix® (Sigma-Adrich, San Luis, EUA) no equipamento Mx3300 QPCR system (Stratagene, San Diego, EUA). As condições de ciclagem foram: denaturação inicial à 94°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos à 94°C por 2 minutos, à 60°C por 60 segundos e por fim 72°C por 1 minuto. Ao final de cada ciclo foi avaliada a curva de dissociação de cada produto gênico amplificado. O nível de expressão gênica foi calculado através do método comparativo 2- $\Delta\Delta CT$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) utilizando-se os genes GAPDH e  $\beta$ -actina como normalizadores (DAI et al., 2012; MA et al., 2015). Os resultados foram descritos com a média  $\pm$  do desvio padrão de três experimentos. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1.

Para a análise de expressão do gene *TLR4* foi necessário a síntese de oligonucleotídeos iniciadores específicos que foram desenhados através do site <http://www.idtdna.com>. Os oligonucleotídeos foram submetidos à análise de eficiência e concentração. Para isso, os cDNAs convertidos a partir de amostras de RNA da linhagem HaCat e HaCat incubadas com LPS foram diluídos em quatro concentrações de forma seriada e cada par de oligonucleotídeo foi diluído nas concentrações de 40 nM, 50 nM, 70 nM, 80 nM e 100 nM a fim de avaliar qual a concentração ideal e melhor eficiência de cada par que seriam utilizadas nas reações de RT-qPCR. A análise de eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizada por RT-PCR com as mesmas condições de ciclagem descritas acima no equipamento Mx3300 QPCR system (Stratagene, San Diego, EUA). Foram consideradas ideais as concentrações cuja eficiência dos oligonucleotídeos ficou em torno de 90% a 110%. As concentrações utilizadas para cada par de oligonucleotídeo estão expostas na tabela 1.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de qPCR.

|                                |                                                    |                                                                    |        |                      |                           |
|--------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------|----------------------|---------------------------|
| <b>CSF2</b>                    | Colony Stimulating Factor 2                        | F:5'-TCTGCTTGTTCATCCCTTTG-3'<br>R:5'-ATGACCATCCTGAGTTTCTAGC-3'     | 122 pb | F: 50nM<br>R: 50nM   | (KIM et al., 2016a)       |
| <b>RNASE7</b>                  | Ribonuclease A Family Member 7                     | F:5'- GGAGTCACAGCACGAAGACCA-3'<br>R:5'- CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA-3'  | 235 pb | F: 50nM<br>R: 50nM   | (KÖTEN et al., 2009)      |
| <b>SLC11A1</b>                 | Natural resistance-associated macrophage protein 1 | F:5'- CATCTCCGTCTCCCAAAGTG-3'<br>R:5'- TGGATGCTTTAGAGACTTCGTG-3'   | 144 pb | F: 70nM<br>R: 70nM   | (PETRUCELLI et al., 2018) |
| <b>KRT1</b>                    | Keratin 1                                          | F:5'- CCTTACAGCACTCTACCAAGC-3'<br>R:5'-TCTGGGCTATATCCTCGTACTG-3'   | 149 pb | F: 50nM<br>R: 50nM   | (PETRUCELLI et al., 2018) |
| <b>FLG</b>                     | Filaggrin                                          | F:5'- AGCAATCGGTAAATAGGTCTGG-3'<br>R:5'- CCTCATTTTCGTGTTTGTCTGC-3' | 126 pb | F: 50nM<br>R: 50nM   | (PETRUCELLI et al., 2018) |
| <b>TLR4</b>                    | Toll Like Receptor 4                               | F: 5'-TCTACAAAATCCCCGACAACC-3'<br>R: 5'- TGTCTGGATTTACACCTGG-3'    | 143 pb | F: 100nM<br>R: 100nM | Este trabalho             |
| <b>GAPDH</b><br>(Constitutivo) | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase           | F: 5'-AATCCCATCACCATCTTCCAG-3'<br>R: 5'-GAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'     | 118 pb | F: 100nM<br>R: 70nM  | (MA et al., 2015)         |
| <b>ACTB</b><br>(Constitutivo)  | Beta-actin                                         | F: 5'-GTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3'<br>R: 5'-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3'    | 154 pb | F: 70nM<br>R: 70nM   | (DAI et al., 2012)        |

### **5.11 Quantificação das citocinas GM-CSF, IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$ de queratinócitos HaCat co-cultivados com elementos fúngicos de *T. rubrum* nas fases conidial e germinativa e de queratinócitos HaCat desafiados com várias concentrações de LPS**

As citocinas pró- inflamatórias IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$  foram quantificadas no experimento de co-cultivo de queratinócitos HaCat com conídios de *T. rubrum*. Para isso, foi utilizado o kit ELISA Development Mini TMB EDK (PeproTech®, Nova Jersey, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizados amostras do sobrenadante coletado do co-cultivo de queratinócitos HaCat com conídios de *T. rubrum* em fases conidial e germinativa nos intervalos de tempo de 24h e 48h. A leitura da placa foi realizada por meio de leitor universal de microplacas Multiscan FC (Thermo- Fisher Scientific, Waltham, EUA) no comprimento de onda de 620nm e 450nm.

A quantificação da citocina GM-CSF foi realizada tanto para os experimentos de co-cultivo de HaCat com conídios de *T. rubrum* quanto para o ensaio de queratinócitos incubados com LPS. Para esta interleucina, foi utilizado o kit ELISA Development Mini Human GM- CSF ABTS EDK (PeproTech®, Nova Jersey, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A faixa de detecção para esta citocina é de 32-1000 pg/mL. Para a quantificação, foram utilizados amostras do sobrenadante coletado do co-cultivo de queratinócitos HaCat com conídios de *T. rubrum* em fase conidial e de células de queratinócitos desafiadas com LPS, nos intervalos de tempo de 24h, 48h, e 54h (conforme descrito no item 5.4). A leitura da placa foi realizada por meio de leitor universal de microplacas Multiscan FC (Thermo Scientific) no comprimento de onda de 650nm e 405nm.

Os dados de absorbância dos comprimentos de ondas foram utilizados para os cálculos de quantificação segundo o fabricante.

### **5.12 Análise Estatística**

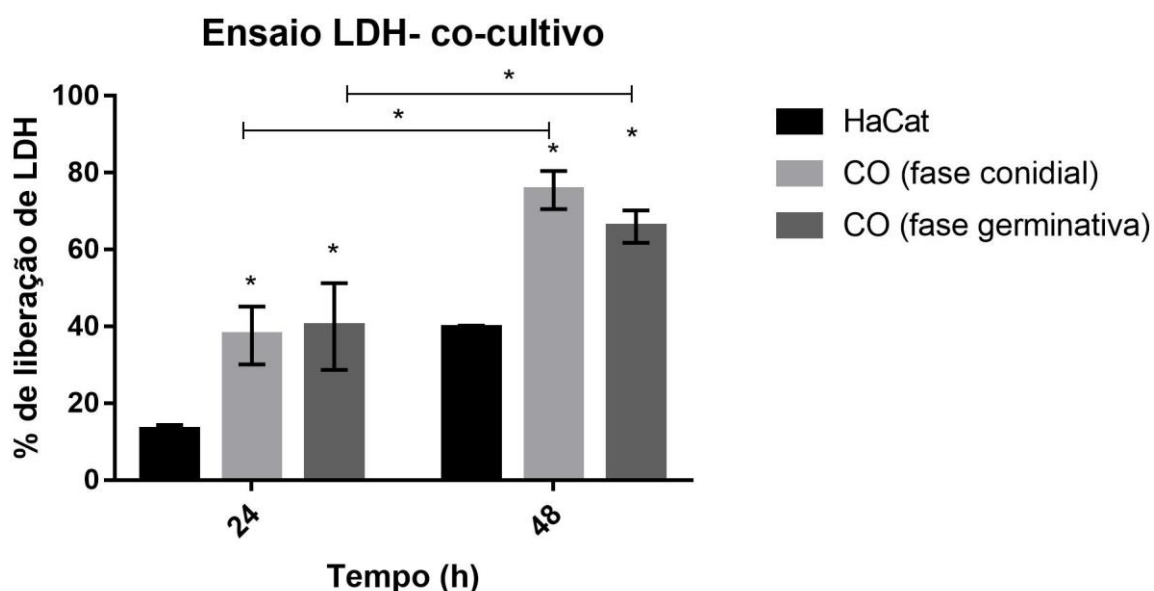
Para a análise estatística foram utilizados o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do pós- teste de Turkey utilizando o software GraphPad Prism v. 7.0. As situações comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando apresentaram um p-value <0.05.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Avaliação da viabilidade celular de queratinócitos HaCat durante o co-cultivo com *T. rubrum* utilizando fase conidial e fase germinativa.

A viabilidade celular das células de queratinócitos HaCat foi avaliada através da quantificação da enzima lactato desidrogenase secretada no sobrenadante durante o co-cultivo com *T. rubrum*. O percentual de liberação da enzima está representado na figura 10.

**Figura 10- Ensaio de liberação de LDH por queratinócitos HaCat co-cultivados com *T. rubrum*.** Sendo HaCat: controle de queratinócitos; CO (fase conidial): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum*; CO (fase germinativa): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum* pré-crescidos por 7h em meio Sabouraud; \* $p \leq 0,05$ .



É possível observar que houve um menor percentual de liberação de LDH em 24h (30-45%) de co-cultivo, consequentemente indicando que neste intervalo de tempo as células de queratinócitos estão mais viáveis. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas quando comparados os percentuais de liberação de LDH nas condições de co-cultivo com fase conidial ou germinativa.

Em resultados anteriores, foram obtidos percentuais de liberação de LDH de aproximadamente 18% e 30% ao avaliar a viabilidade de queratinócitos HaCat durante o co-cultivo com conídios em fase germinativa de *T. rubrum* em 24h. (PETRUCCELLI et al., 2018-2019), dado que mostra que o percentual de liberação de LDH obtidos na figura 10 foi

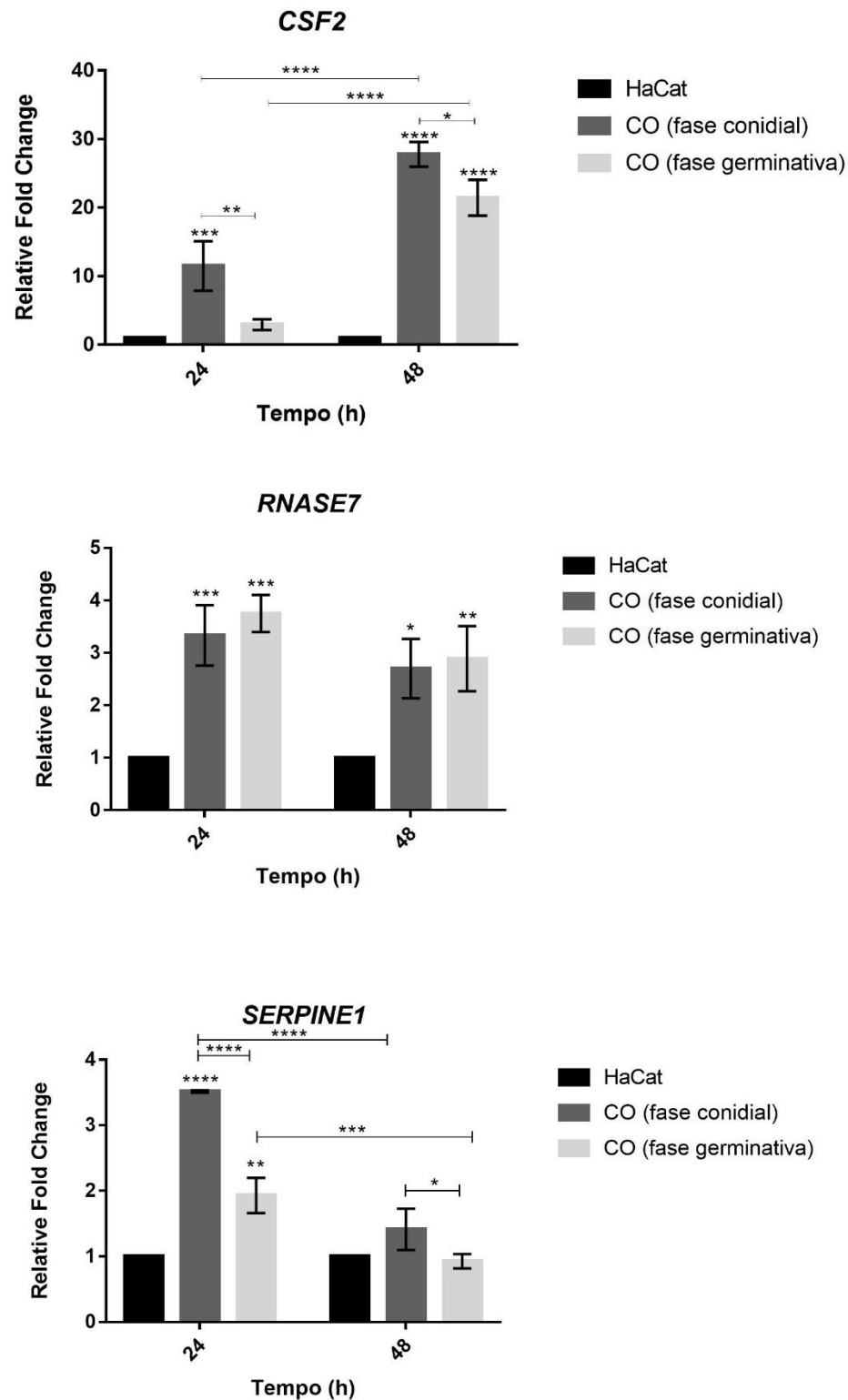
compatível com faixa de liberação já descrita na literatura quando células HaCat estão nesta situação de co-cultivo.

Foi observado que no tempo 48h o percentual de liberação foi superior a 60%, devido ao fato de que neste intervalo de tempo as hifas de *T. rubrum* estarem mais desenvolvidas e aderidas aos queratinócitos quando comparado ao tempo de 24h (dados não mostrados) ocasionando maior rompimento da célula hospedeira e consequentemente maior liberação de LDH. Apesar desse valor expressivo de liberação de LDH, consideramos o aspecto de maior aderência e desenvolvimento do fungo nas células HaCat em 48. Esses fatores são importantes para a resposta imune celular da interação fungo-hospedeiro, e utilizamos este intervalo de tempo também para os experimentos posteriores de análise de expressão gênica.

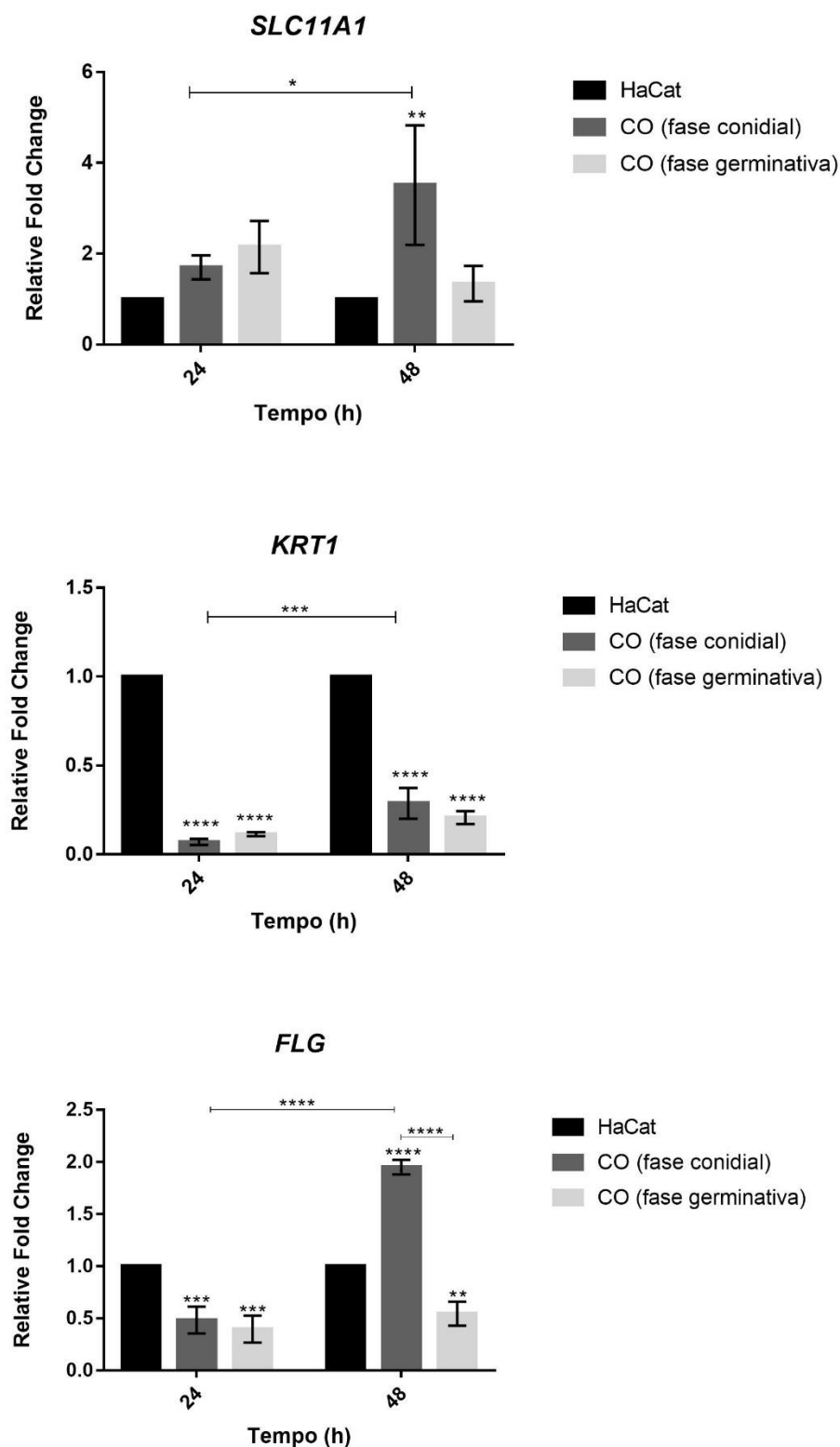
## **6.2 Avaliação da expressão de genes envolvidos na resposta imune de queratinócitos co-cultivados com *T. rubrum***

Foi avaliado o perfil de expressão dos genes *CSF2*, *RNASE7*, *SERPINE1*, *SLC11A1*, *KRT1* e *FLG* de queratinócitos humanos após o co-cultivo com *T. rubrum* em fase conidial e germinativa nos intervalos de tempo de 24h e 48h com o objetivo de analisar diferenças no padrão de expressão dependendo da condição de cultivo. Os resultados desta análise estão representados nas figuras 11 e 12.

**Figura 11- Avaliação da expressão de genes humanos *CSF2*, *RNASE7* e *SERPINE1* durante o co-cultivo com *T. rubrum* por qPCR..** Sendo HaCat: controle de queratinócitos; CO (fase conidial): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum*; CO (fase germinativa): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum* pré-crescidos por 7h em meio Sabouraud \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



**Figura 12- Avaliação da expressão de genes humanos SLC11A1, KRT1 e FLG durante o co-cultivo com *T. rubrum* por qPCR.** Sendo HaCat: controle de queratinócitos; CO (fase conidial): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum*; CO (fase germinativa): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum* pré-crescidos por 7h em meio Sabouraud \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



Conforme mostram as figuras 11 e 12, o gene que mais se destacou em relação aos valores de expressão gênica foi o gene *CSF2* principalmente em 48h de co-cultivo (*fold change* > 20). Quando foi comparada a expressão deste gene em fase conidial e germinativa, observamos que a indução deste gene foi mais expressiva quando *T. rubrum* estava na fase conidial, sugerindo diferenças no padrão de expressão deste gene conforme o estágio de desenvolvimento do conídio. O conídio é a estrutura que dissemina e inicia a infecção. Ao entrar em contato com a célula hospedeira, o artroconídio do fungo inicia o seu processo de adesão e desenvolvimento (FAWAY; ROUVROIT; POUMAY, 2018), sendo este o estágio inicial de infecção que é mimetizado no co-cultivo em fase conidial. Após a aderência e adaptação do conídio ao hospedeiro, inicia-se a formação do tubo germinativo (FAWAY; ROUVROIT; POUMAY, 2018), sendo este o estágio representado na fase germinativa.

Conforme descrito anteriormente, sabe-se que o gene *CSF2* codifica a citocina GM-CSF e apesar de seu papel ainda ser desconhecido para as dermatofitoses, o aumento de sua liberação foi identificado durante o co-cultivo de queratinócitos com o dermatófito *A. benhamiae* (SHIRAKI et al., 2006).

Explorando o papel desta citocina para outros grupos de fungos, estudos realizados por Li e Bagtzoglou, (2009) mostraram que GM-CSF é a principal citocina induzida durante a interação entre queratinócitos orais humanos e *Candida glabrata*. De forma complementar, Nicolatou-Galitis et al., (2001) mostraram que o uso tópico de GM-CSF como enxaguante bucal em pacientes diagnosticados com candidíase pseudomembranosa oral foi eficaz para reduzir as lesões ulcerativas favorecendo a neovascularização e reparo tecidual da mucosa.

Estes dados em conjunto evidenciam que esta citocina possivelmente apresenta uma função importante para a defesa de queratinócitos durante a interação com *T. rubrum*, considerando a alta modulação do gene *CSF2* observado aqui durante a interação fungo-hospedeiro.

Ainda em relação aos demais genes envolvidos na resposta imune inata (Fig.11), o gene *RNASE7*, foi induzido em ambos os intervalos de tempo e em ambas as condições de crescimento fúngico de forma igual sem nenhuma diferença estatística em relação a estas condições.

A indução de peptídeos antimicrobianos, codificada pelo gene *RNase7*, vem sendo discutida na literatura. Esses componentes antimicrobianos são importantes para a defesa inicial

da camada epidérmica contra infecções fúngicas, principalmente em *tineas* (BRASCH et al., 2014), infecções causadas por *T. rubrum* (FIRAT et al., 2014) além de inibir o crescimento fúngico de dermatófitos como *Trichophyton mentagrophytes*, *M. canis*, *T. rubrum* e *Epidermophyton floccosum* (FRITZ; BECK-JENDROSCHKE; BRASCH, 2012). Nossos dados podem sugerir que a expressão deste importante mecanismo de defesa celular encontra-se atuante ao longo do processo infeccioso tanto quando na fase conidial quanto na fase germinativa de desenvolvimento de *T. rubrum*.

Outro gene que apresentou resultado promissor foi o *SERPINE1*. Conforme observado na fig.11, este gene foi mais induzido em 24h de co-cultivo na fase conidial de *T. rubrum*. Não foi observada modulação significativa deste gene em 48h de co-cultivo.

Harslund et al., (2013) sugeriram que uma resposta precoce do hospedeiro à infecções de pele e tecidos moles causadas pela bactéria *Staphylococcus aureus* é dependente da expressão de *SERPINE1* para o recrutamento de neutrófilos e controle bacteriano no local da infecção. Já Dittmann et al., (2015) atribuíram uma função antiviral ao gene *SERPINE1* ao avaliar que este gene promove mudanças ao ambiente extracelular para impedir a maturação do vírus influenza A. Análises computacionais realizadas por Kidane; Lawrence; Murali (2013) classificaram o gene *SERPINE1* como indutor de resposta imune contra os fungos patogênicos *A. fumigatus* e *C. albicans*. Entretanto, a participação deste gene como imunomodulador nas dermatofitoses ainda é desconhecido. Com base nos resultados de expressão gênica apresentados, podemos sugerir que este gene também possa atuar como um imunomodulador em dermatofitoses causadas por *T. rubrum* já que foi observada sua indução expressiva em 24h de co-cultivo, principalmente quando o fungo está em fase conidial, o que mimetiza de forma mais próxima ao natural o processo infeccioso da dermatofitose.

Para ao gene *SLC11A1* (fig. 12) foi observado modulação significativa somente em 48h quando foi realizado o co-cultivo em fase conidial.

Já em relação aos genes envolvidos na manutenção da barreira epidérmica *FLG* e *KRT1*, observou-se que o gene que codifica a filagrina (*FLG*) encontra-se reprimido em ambos os intervalos de tempo no co-cultivo quando os conídios estão em fase germinativa. Já quando o co-cultivo foi realizado com a fase conidial de *T. rubrum*, o gene *FLG* esteve reprimido somente em 24h, sugerindo que possa haver diferenças no perfil de expressão deste gene conforme o estágio que o conídio apresenta. Já em relação ao gene que codifica a queratina 1 (*KRT1*) este encontra-se reprimido tanto em 24h quanto em 48h e não foi observado diferenças estatísticas

ao analisar as diferentes fases do crescimento do conídio de *T. rubrum* ensaiados. Estes dados em conjunto sugerem uma desestabilização dos constituintes da barreira epidérmica durante o processo infeccioso por *T. rubrum*, o que poderia facilitar a disseminação do fungo no tecido, assim como observado por Jensen et al., (2007).

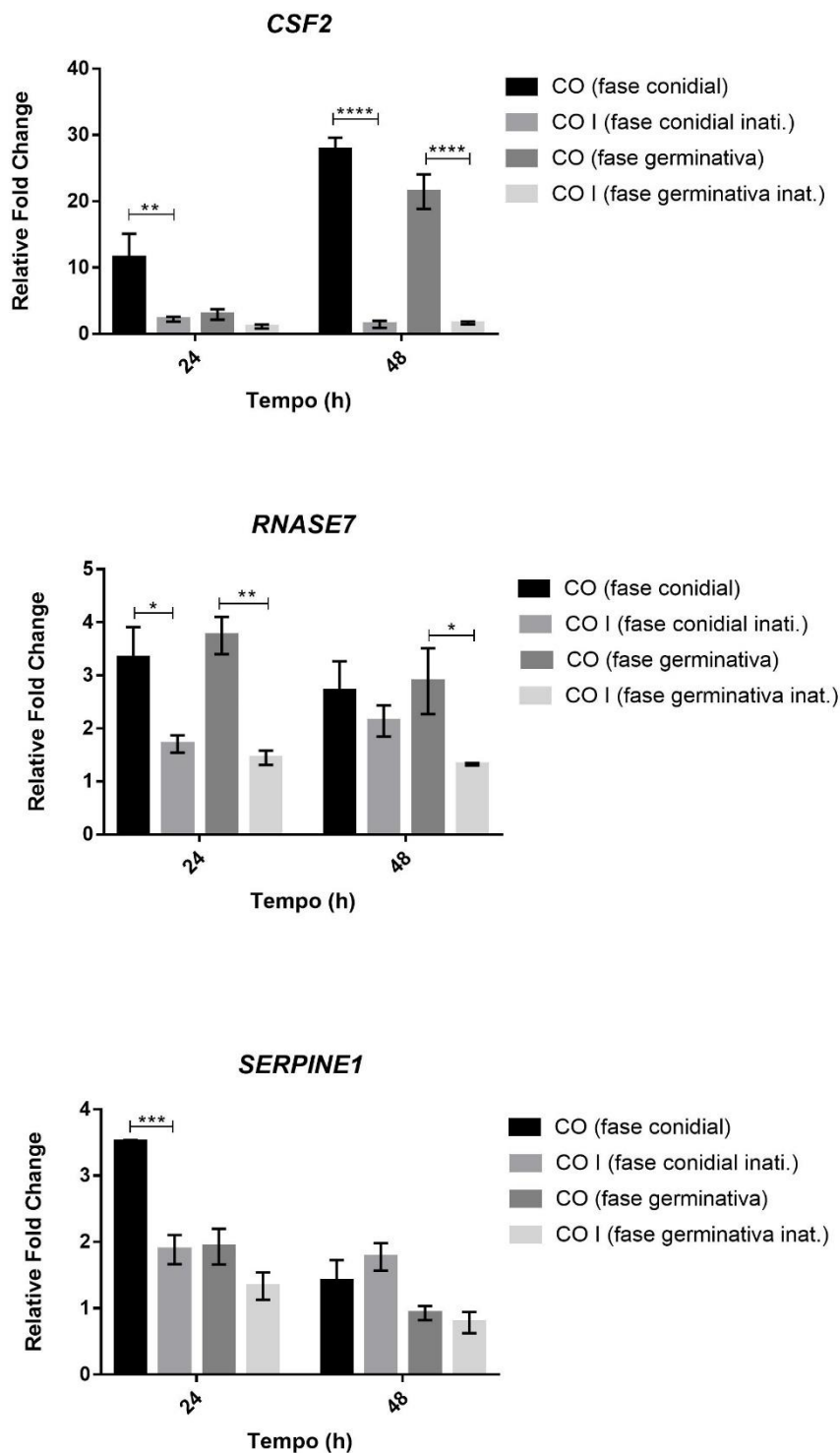
De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que as diferentes fases dos elementos fúngicos de *T. rubrum* (conidial ou germinativa) interferem na modulação de alguns genes envolvidos na resposta imune inata, principalmente, como observado para o gene *CSF2*.

### **6.3 Avaliação da expressão gênica dos genes envolvidos na resposta imune de queratinócitos co-cultivado com conídios inativados de *T. rubrum***

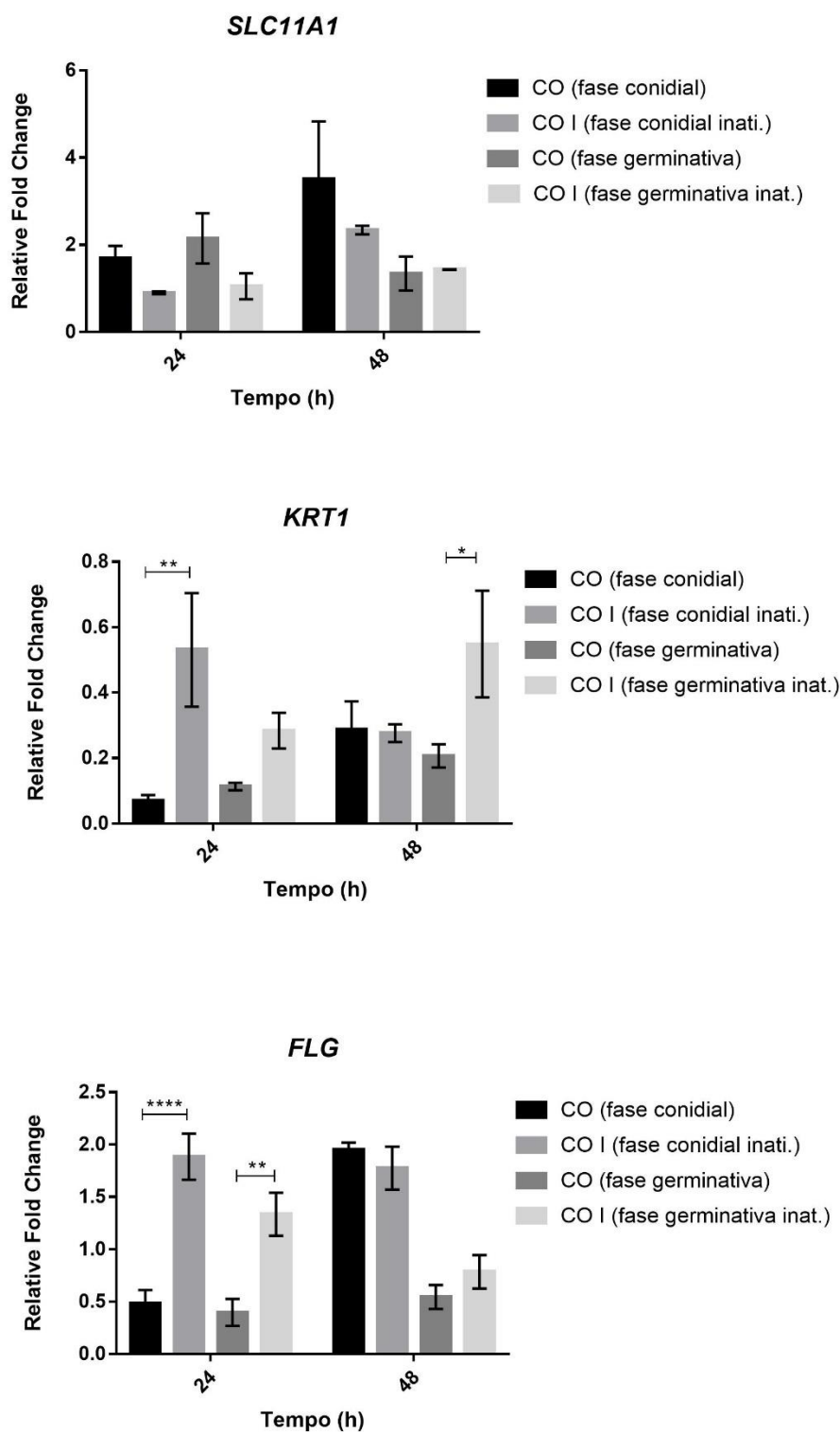
A fim de avaliar o efeito da inativação fúngica nos níveis de expressão gênica dos genes envolvidos na resposta imune inata, foi realizado co-cultivo da célula HaCat com elementos fúngicos de *T. rubrum* em fase conidial e germinativa inativados ou não pelo calor. Os resultados estão expostos nas figuras 13 e 14.

O uso de elementos fúngicos (conidial ou germinativa) mesmo inativados apresentam proteínas de parede preservadas capazes de estimular uma resposta imunológica (DAS GUPTA et al., 2014; CHEN et al., 2015). Em adição, a inativação de microrganismos também é utilizada para a produção de vacinas, como a de tríplice bacteriana, hepatite A, hepatite B, HPV, entre outras, e recentemente em vacinas contendo o vírus SARS-CoV2 inativado, para o controle da pandemia de COVID-19 (GAO et al., 2020; LI et al., 2020; SHIN et al., 2020).

**Figura 13- Comparativo da expressão dos genes humanos *CSF2*, *RNASE7* e *SERPINE1* durante o co-cultivo com conídios vivos e inativados de *T. rubrum* por qPCR.** Sendo CO (fase conidial): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum*; CO (fase germinativa): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum* pré-crescidos por 7h em meio Sabouraud; CO I (fase conidial inat.): co-cultivo de queratinócitos em fase conidial inativados de *T. rubrum*; CO I (fase germinativa inat.): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum* pré-crescidos por 7h em meio Sabouraud inativados\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



**Figura 14- Comparativo da expressão dos genes humanos *SLC11A1*, *KRT1* e *FLG* durante o co-cultivo com conídios vivos e inativados de *T. rubrum* por qPCR** Sendo CO (fase conidial): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum*; CO (fase germinativa): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum* pré-crescidos por 7h em meio Sabouraud; CO I (fase conidial inat.): co-cultivo de queratinócitos com fase conidial inativados de *T. rubrum*; CO I (fase germinativa inat.): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum* pré-crescidos por 7h em meio Sabouraud inativados\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.



Conforme mostrado na figura 13, os genes *CSF2*, *SERPINE1* e *RNASE7* que não apresentaram modulação significativa quando foram utilizados conídios inativados, sugerindo que há necessidade do fungo vivo para ativar a expressão desses genes em células de queratinócitos.

Para o gene *SLC11A1* (fig. 14) não foi observada diferença estatística quando comparado sua expressão em relação ao uso de conídios vivos ou inativados.

Já para os genes envolvidos na barreira epidérmica, foi observado curiosamente quando o co-cultivo foi realizado com conídios inativados, o gene *FLG* foi induzido em 24h, ao contrário do observado quando os conídios estão viáveis. Esse resultado reforça a sugestão levantada na discussão anterior de que o fungo possa desestabilizar a barreira epidérmica levando à diminuição da filagrina através da repressão do gene *FLG*. Já em relação ao gene *KRT1*, este encontra-se reprimido tanto quando os conídios estão viáveis ou inativados. Entretanto, esta repressão é maior do que quando comparado os valores de *fold change* dos conídios viáveis.

Considerando estes resultados em conjunto, é possível sugerir que conídios de *T. rubrum* inativados pelo calor estimulam uma resposta imune menor dos genes aqui avaliados em células de queratinócitos. Resultados similares foram encontrados por Huang et al., (2013) ao avaliarem que conídios de *T. rubrum* inativados pelo calor reduziram significativamente a expressão de PRRs em queratinócitos HaCat, sugerindo que antígenos da parede celular deste fungo quando estão inativados induzem uma menor resposta imune em células HaCat e consequentemente levam à uma secreção limitada de citocinas. Desta forma, a utilização do co-cultivo com conídios inativados foi desconsiderada para a realização dos experimentos futuros.

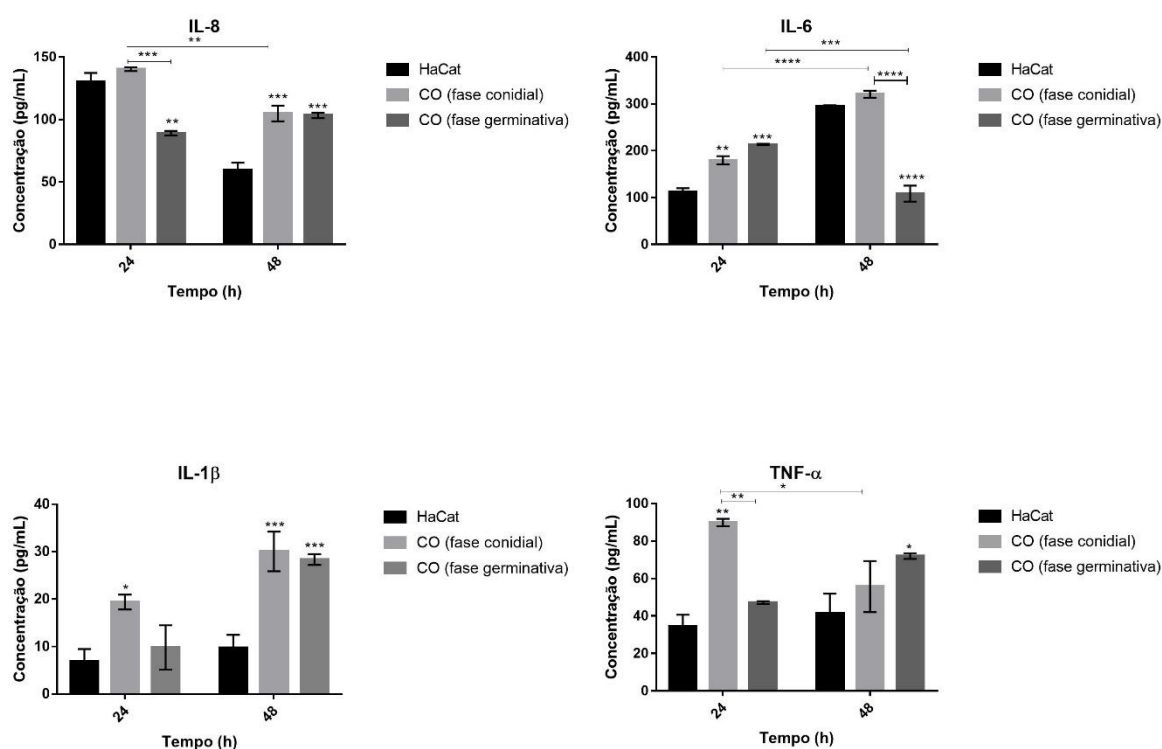
Com os resultados obtidos durante esta triagem de genes envolvidos na resposta imune inata de queratinócitos humanos, o foco dos próximos experimentos foi baseado no gene *CSF2* e em seu produto gênico, a citocina GM-CSF, devido à expressiva modulação deste gene observada neste trabalho.

#### 6.4 Liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ , durante o co-cultivo de queratinócitos com *T. rubrum*.

A fim de avaliar a resposta celular de queratinócitos durante o co-cultivo com *T. rubrum* em fase conidial e germinativa, foram quantificadas algumas citocinas pró-inflamatórias. Os resultados estão mostrados na figura 15.

#### Figura 15- Liberação de citocinas pró-inflamatórias de queratinócitos humanos durante o co-cultivo em fase conidial e germinativa de *T. rubrum*

Sendo HaCat: controle de queratinócitos; CO (fase conidial): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum*; CO (fase germinativa): co-cultivo de queratinócitos com conídios de *T. rubrum* pré-crescidos por 7h em meio Sabouraud \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.



É possível observar que houve uma redução na liberação de IL-8 em 24h quando o co-cultivo foi realizado na fase germinativa. Já quando foram utilizados elementos fúngicos em fase conidial, não foram observadas diferenças estatísticas na liberação desta interleucina quando comparado ao controle de queratinócitos. Em 48h foram detectados níveis menores de IL-8 no co-cultivo realizado com ambas as fases de crescimento de *T. rubrum*.

A interleucina 6 foi liberada em níveis iguais em 24h para o co-cultivo em fase conidial e germinativa. Já em 48h, foi possível observar que houve liberação significativa da IL-6

somente com o co-cultivo foi realizado em fase germinativa, porém em menor concentração do que a que foi detectada em 24h.

Já a TNF-  $\alpha$  foi liberada somente pelos queratinócitos durante o co-cultivo com *T.rubrum* em fase conidial em 24h. Em 48h esta citocina obteve maior liberação com o co-cultivo realizado com o fungo em fase germinativa

Por fim, a liberação de IL-1 $\beta$  foi observada somente quando o co-cultivo foi realizado com conídios em 24h. Já em 48h, foi possível detectar esta interleucina em quantidades estatisticamente iguais em ambas as fases de crescimento de *T. rubrum* (conidial e germinativa).

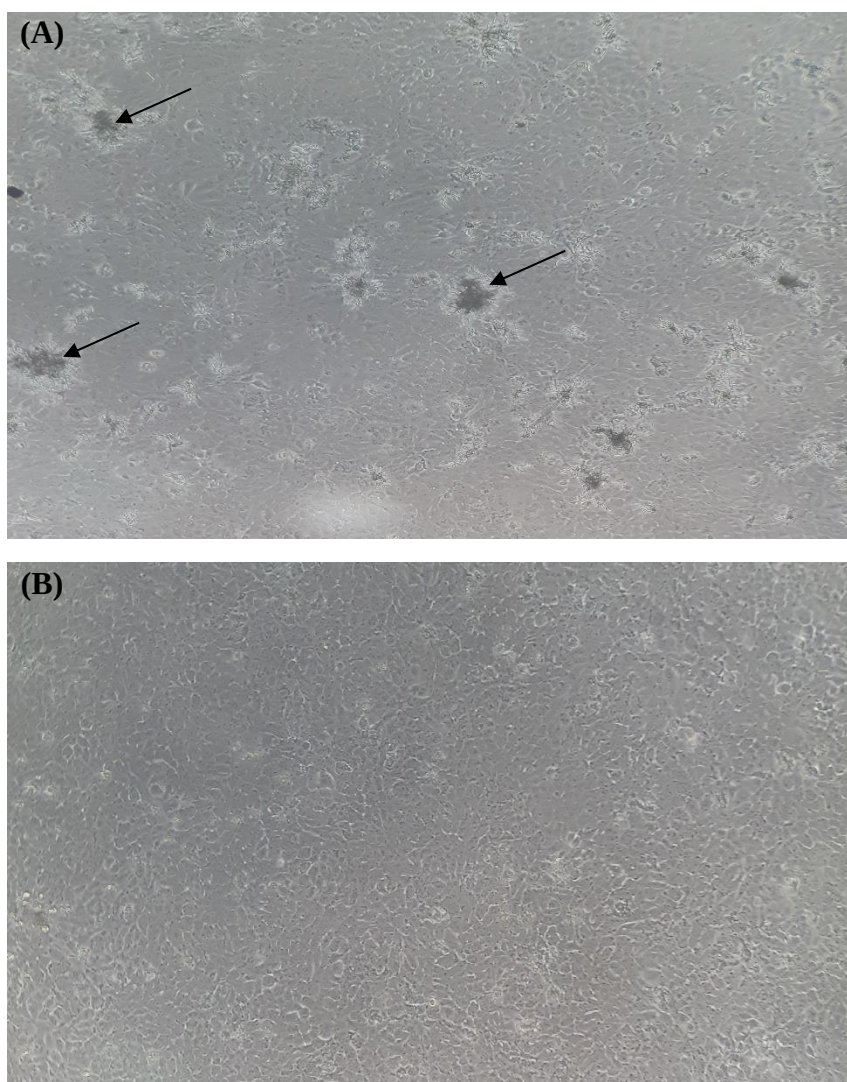
Foi descrito na literatura que dermatófitos antropofílicos como os da espécie *Trichophyton* induzem a produção de algumas interleucinas como: IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (NAKAMURA et al., 2002; TANI et al., 2007; HAU et al., 2015). Entretanto ainda são escassos os estudos que descrevem o perfil de citocinas secretadas por queratinócitos durante uma infecção por *T. rubrum*. Os resultados aqui mostrados corroboram com estas informações já que todas estas interleucinas testadas foram secretadas durante o co-cultivo com *T. rubrum*. Além disso, podemos sugerir que elementos fungicos em diferentes estágios de crescimento (conidial e germinativa) promovem uma resposta diferente na liberação e no perfil de cada interleucina avaliada, já que foi possível observar diferenças nestes padrões ao utilizar o co-cultivo com conídios em diferentes fases de desenvolvimento.

#### **6.5 Ensaio de co-cultivo para avaliar a necessidade de contato celular utilizando placas contendo suportes permeáveis *transwell*.**

Conforme dito anteriormente, os resultados seguintes foram baseados em estudos com o gene *CSF2* e seu produto gênico (citocina GM-CSF) utilizando o co-cultivo em fase conidial devido à alta modulação deste gene nesta condição de co-cultivo observada nos resultados anteriores.

Este ensaio teve como objetivo avaliar a necessidade de adesão celular entre fungo-hospedeiro para a expressão do gene *CSF2* e liberação da citocina GM-CSF. Através de microscopia ótica convencional, foi avaliado se não houve o extravasamento da hifa do fungo pela membrana à medida que este se desenvolveu ao longo dos intervalos de tempo avaliados.

**Figura 16- Análise em microscópio óptico da presença de fragmentos fúngicos nas células de queratinócitos em 24 h.** (A) controle (co-cultivo) e (B) co-cultivo sem contato (contendo suporte permeável *transwell*). As setas indicam *T. rubrum* aderido aos queratinócitos. Zoom óptico 20x.



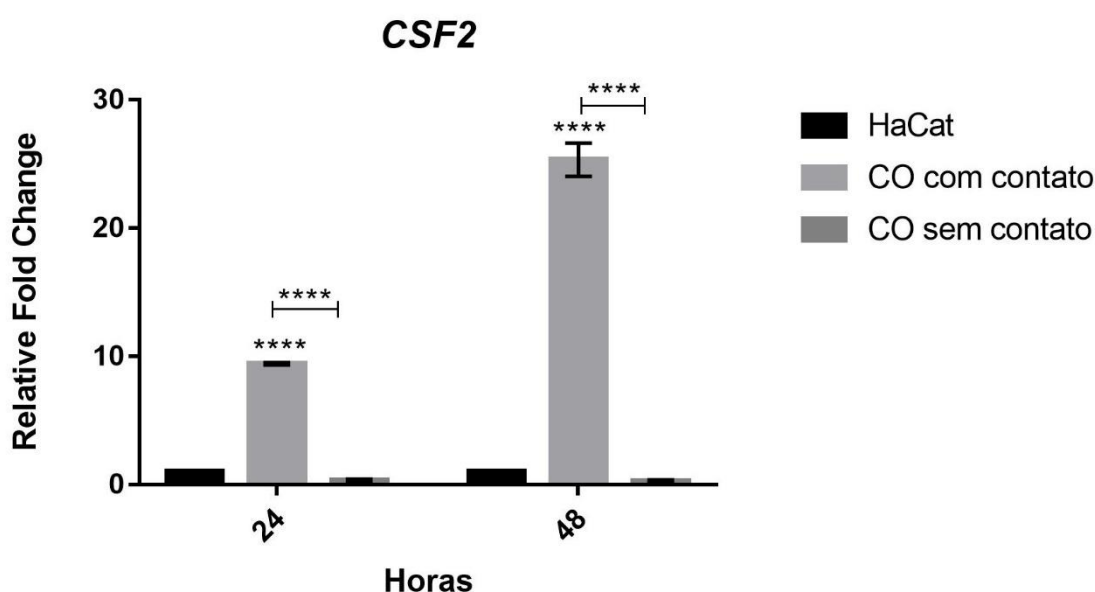
É possível observar na figura 16 que a utilização do suporte permeável foi eficaz para impedir o contato entre fungo e a célula humana já que não foi possível observar células do fungo aderidos nos queratinócitos (Fig. 16 B) quando este está sob a membrana permeável. Já no controle (Fig. 16 A) foi possível observar a aderência no fungo nos queratinócitos quando não há a presença do suporte permeável.

## 6.6 Análise da expressão do gene *CSF2* durante o co-cultivo de queratinócitos HaCat com *T. rubrum* em suporte permeável transwell.

Após a padronização do ensaio de co-cultivo em suporte permeável, o RNA dos queratinócitos foi extraído para avaliar a expressão do gene *CSF2* que codifica a citocina GM-CSF, a fim de avaliar se é necessário o contato célula-célula para que este gene seja expresso.

Os resultados de expressão gênica estão mostrados na figura 17.

**Figura 17- Comparativo da expressão do gene *CSF2* (GM-CSF) com o co-cultivo de *T. rubrum* e queratinócitos (CO com contato) e o co-cultivo de *T. rubrum* e queratinócitos com suportes permeáveis *transwell* (CO sem contato). \*\*\*\*  $p < 0,0001$**



Foi possível observar na figura acima que gene *CSF2* não foi expresso quando as células de queratinócitos não estavam em contato com o fungo (interação célula-fungo separados pela membrana *transwell*). Este dado pode sugerir que para a expressão deste gene, e consequentemente, a liberação da citocina GM-CSF é necessário que ocorra o contato célula-célula entre os queratinócitos humanos e *T. rubrum*. Desta forma, a liberação da citocina GM-CSF não foi observada na presença da *transwell*, porque não houve expressão do gene *CSF2*.

Resultados similares foram obtidos por Li e Dongari-Bagtzoglou (2009) ao observar que a liberação de GM-CSF por células epiteliais orais foi dependente de adesão com *C. glabrata*. No referido trabalho, os autores também não identificaram a liberação de GM-CSF quando foi realizado o co-cultivo entre células epiteliais e *C. glabrata* na presença de suportes

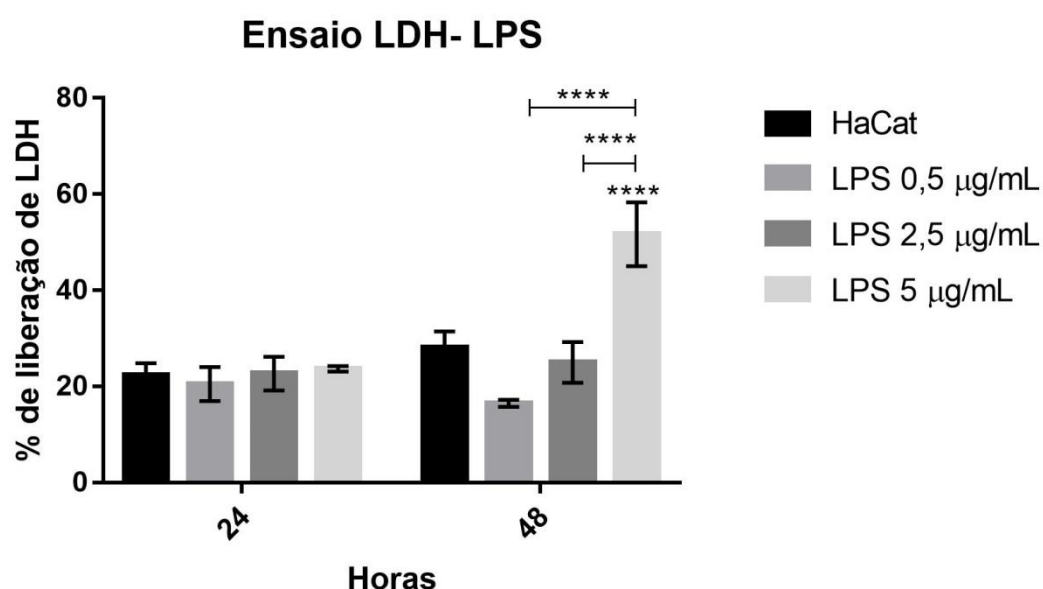
permeáveis. Sendo assim, este dado corrobora com o resultado apresentado neste trabalho, indicando a necessidade de adesão entre fungo-hospedeiro para a liberação desta citocina.

### 6.7 Avaliação da viabilidade celular de queratinócitos HacaT desafiados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).

Outro aspecto importante estudado em relação ao gene *CSF2* foi o de avaliar se ele também era induzido por LPS bacteriano da mesma forma que foi induzido por *T. rubrum*. Para isso, as células de queratinócitos foram incubadas com diferentes concentrações de LPS, que mimetiza a interação entre célula e bactérias Gram negativas. A viabilidade celular dos queratinócitos durante esta interação está mostrada na figura 18.

**Figura 18- Ensaio de liberação de LDH por queratinócitos humanos desafiados com LPS**

Sendo HaCat: controle de queratinócitos; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

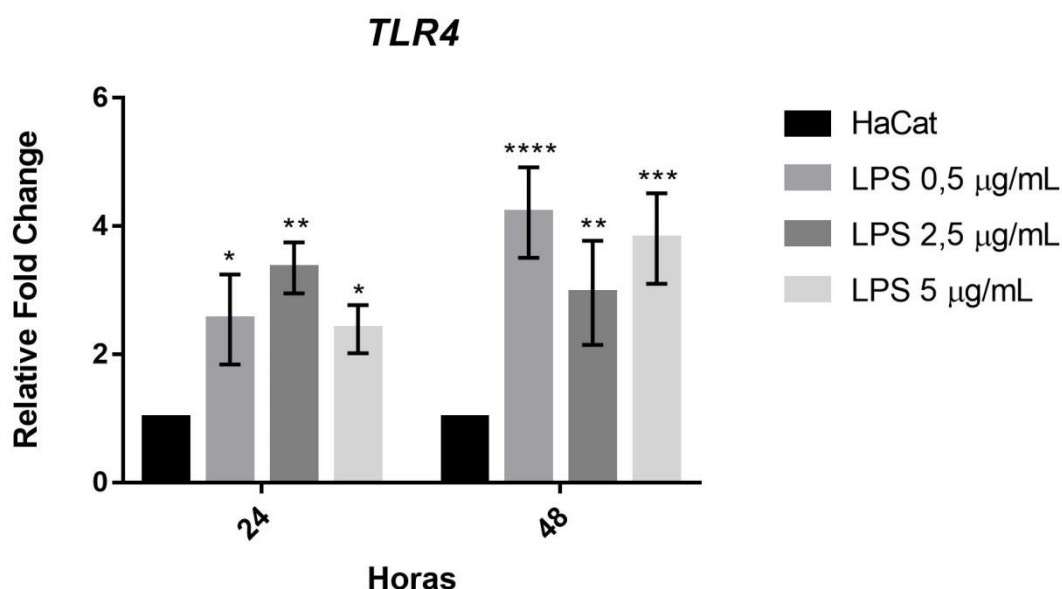


É possível observar na figura 18 que somente a concentração de 5 µg/mL em 48h de incubação mostrou-se mais citotóxica para os queratinócitos quando comparado ao controle, apresentando um percentual de liberação de LDH superior à 40%. Já em relação às demais concentrações, o percentual de liberação foi estatisticamente igual ao controle de queratinócitos sem a presença de LPS. Considerando que o percentual de liberação de LDH observado durante a incubação de queratinócitos com LPS foi similar ao percentual obtido durante o co-cultivo com *T. rubrum*, sugerimos que as concentrações de LPS utilizadas no experimento foi adequada para manter a viabilidade celular e, portanto, foram utilizadas nos ensaios futuros.

## 6.8 Avaliação da expressão do gene que codifica o receptor TLR4 em queratinócitos durante a incubação com LPS.

Além de avaliar a viabilidade celular dos queratinócitos quando expostos a diferentes concentrações de LPS, foi necessário verificar também se as concentrações de LPS utilizadas foram suficientes para ativar o receptor padrão de reconhecimento de patógenos TLR4, específico para o reconhecimento de LPS. Para isso, foi avaliada a expressão gênica do gene que codifica este receptor em queratinócitos humanos e os resultados estão expostos na figura 19.

**Figura 19- Avaliação da expressão gênica do gene TLR4 em queratinócitos HaCat desafiados com várias concentrações de LPS.** Sendo HaCat: controle de queratinócitos; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



A figura 19 mostra que o gene *TLR4* foi induzido em ambos os intervalos de tempo e em todas as concentrações de LPS utilizadas, entretanto sem diferenças estatísticas na modulação entre as concentrações utilizadas.

De uma forma geral, a ativação de TLRs por seus respectivos ligantes é o primeiro evento molecular da imunidade inata, precedendo e desencadeando a produção de citocinas, resposta inflamatória e uma resposta imune adaptativa. Alguns destes ligantes, denominados de PAMPs, que apresentam maior caráter inflamatório são os lipopolissacarídeos, lipoproteínas, peptídeoglicanos e flagelinas derivados da parede celular bacteriana. O LPS, presente na parede celular de bactérias gram-negativas é detectado pelo receptor TLR4 expresso na superfície de

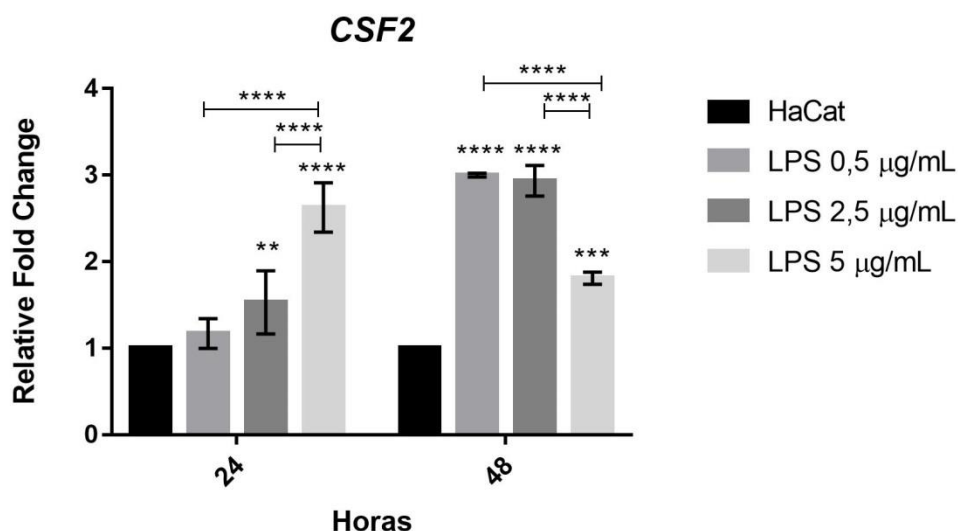
células hematopoiéticas, monócitos, células dendríticas e macrófagos (CHOCHET; PERI, 2017). Além disso, Pivarcsi et. al (2003) mostraram que o receptor TLR4 também está presente na epiderme humana e sua expressão é regulada por componentes microbianos.

Desta forma, considerando que as concentrações de LPS utilizadas foram suficientes para ativar o gene *TLR4* em queratinócitos HaCat, adotamos estas concentrações como suficientes para desencadear uma resposta celular e, portanto, prosseguimos com os experimentos de expressão gênica para avaliar a modulação do gene *CSF2* durante a incubação das células com LPS.

### 6.9 Análise da expressão gênica do gene *CSF2* em queratinócitos HaCat desafiados com diferentes concentrações de LPS.

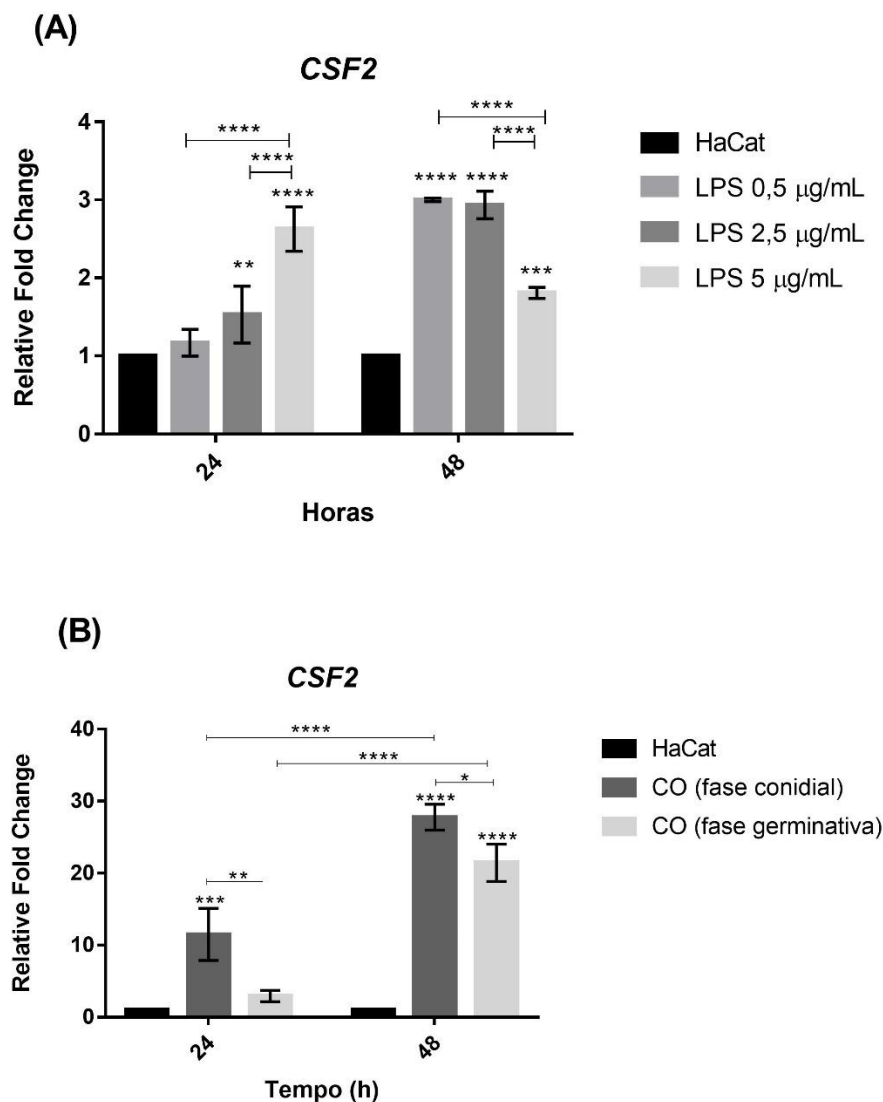
A figura 20 mostra a modulação do gene *CSF2* após a incubação dos queratinócitos com LPS.

**Figura 20- Expressão do gene *CSF2* em queratinócitos HaCat desafiados com LPS.** Sendo HaCat: controle de queratinócitos; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



Os resultados mostram a indução do gene *CSF2* nas concentrações de 5 µg/mL e 2,5 µg/mL de LPS em 24h. Já em 48h, observou-se uma redução no valor da expressão gênica para a concentração de 5 µg/mL e o aumento nos valores de expressão para as concentrações de 2,5 µg/mL e 0,5 µg/mL. Entretanto, apesar de o gene *CSF2* também ser induzido na presença de LPS, os valores de *Fold Change* foram muito inferiores quando comparado aos valores obtidos durante o co-cultivo de queratinócitos com *T. rubrum* (Figura 21).

**Figura 21- Comparativo da modulação gênica do gene CSF2 em queratinócitos.** Sendo: (A) desafiados com diferentes concentrações de LPS (B) co-cultivados com *T. rubrum*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.



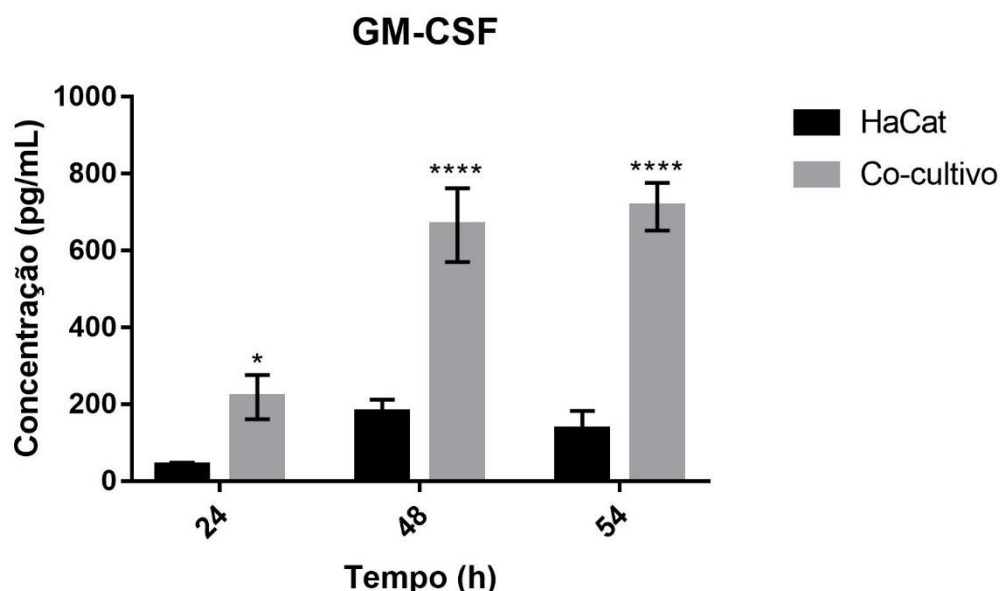
#### 6.10 Quantificação da citocina GM-CSF liberada por queratinócitos humanos durante o co-cultivo com *T. rubrum* e desafiadas com LPS.

Foi realizada a quantificação da liberação da citocina GM-CSF durante o co-cultivo de queratinócitos humanos com a fase conidial de *T. rubrum* e quando os queratinócitos foram desafiados com LPS.

Considerando que em 48h obteve-se melhor modulação do gene *CSF2*, para a quantificação de seu produto gênico (GM-CSF) foi acrescido o intervalo de tempo de 54h para avaliar se havia maior secreção da citocina após um intervalo de tempo maior entre transcrição e tradução do gene.

Os valores de liberação da citocina secretada no sobrenadante estão mostradas na figura 22.

**Figura 22- Quantificação da liberação da citocina GM-CSF do co-cultivo de queratinócitos com *T. rubrum*** Quantificação da liberação da citocina GM-CSF do co-cultivo de queratinócitos com *T. rubrum*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



Os resultados apresentados na figura 22 mostram que em todos os tempos avaliados houve a liberação da citocina GM-CSF durante o co-cultivo de queratinócitos humanos *T. rubrum*, obtendo-se maior concentração em pg/mL da citocina nos tempos de 48 h (intervalo de tempo com maior modulação do gene *CSF2*- Fig11) e 54 h.

Em relação à quantificação da citocina GM-CSF do sobrenadante de queratinócitos desafiados com LPS, observamos que apesar de o gene *CSF2* ser expresso nos tempos de 24 e 48 h, não foi detectada a liberação da citocina GM-CSF em quantidades superiores do limite mínimo de detecção (32pg/mL), em nenhuma concentração de LPS utilizada (0,5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5 µg/mL) e em nenhum intervalo de tempo utilizado (24, 48, e 54 h)

É recentemente discutido o papel da citocina GM-CSF na resolução de respostas inflamatórias assim como no desenvolvimento de uma inflamação crônica (DOUGAN et al., 2019). Sabe-se que em condições normais, esta citocina é detectada em concentrações muito baixas, entretanto, há um aumento no estímulo de sua produção quando há algum estímulo imune, como por exemplo, na presença de lipopolissacarídeos (SHI et al., 2006). Xu et al., (2015) discute a importância da citocina GM-CSF na manutenção da homeostase do sistema

imune, sugerindo que em conjunto com o receptor TLR4 esta citocina possa cooperar na prevenção da infecção de bactérias gram-negativas em pacientes cirróticos elevando sua resposta imune.

Nos resultados aqui apresentados, observamos que esta citocina não é detectável sob a estimulação de LPS em células de queratinócitos. Entretanto, por ser uma citocina expressa por diversos grupos celulares e sua função principal ser a de promover a sobrevivência, proliferação, ativação e diferenciação de macrófagos e células dendríticas (SHI et al., 2006), acreditamos que pela interação entre LPS e queratinócitos ser superficial em uma situação *in vitro*, ainda não seja suficiente para desencadear uma produção aumentada desta citocina neste tipo celular.

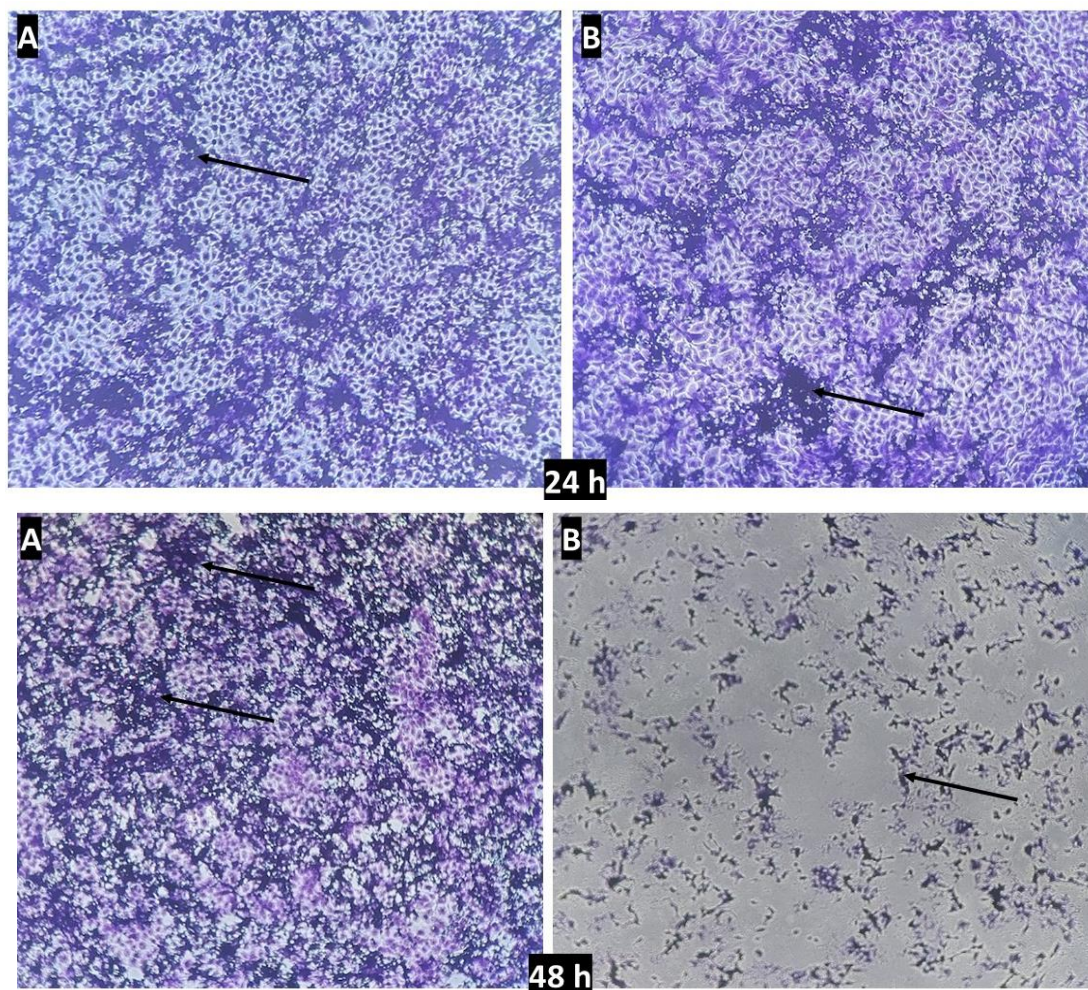
Ao contrário do observado durante a interação de queratinócitos com LPS, foi observado que além da forte indução do gene *CSF2*, houve a liberação da citocina GM-CSF. Esta citocina é particularmente importante durante o estágio inflamatório para a cicatrização de feridas, sendo que estudos *in vitro* mostraram que GM-CSF aumenta a proliferação de queratinócitos aumentando a reepitelização para reestruturar a barreira epidérmica (BARRIENTOS et al., 2008). Este fato pode explicar a expressiva indução desta citocina observada em nossos resultados, pois se sabe que durante a interação entre queratinócitos e *T. rubrum* há o dano tecidual devido à penetração do fungo e secreção de proteases queratinolíticas.

#### **6.11 Redução da expressão do gene *CSF2* utilizando Frequências Extremamente Baixas**

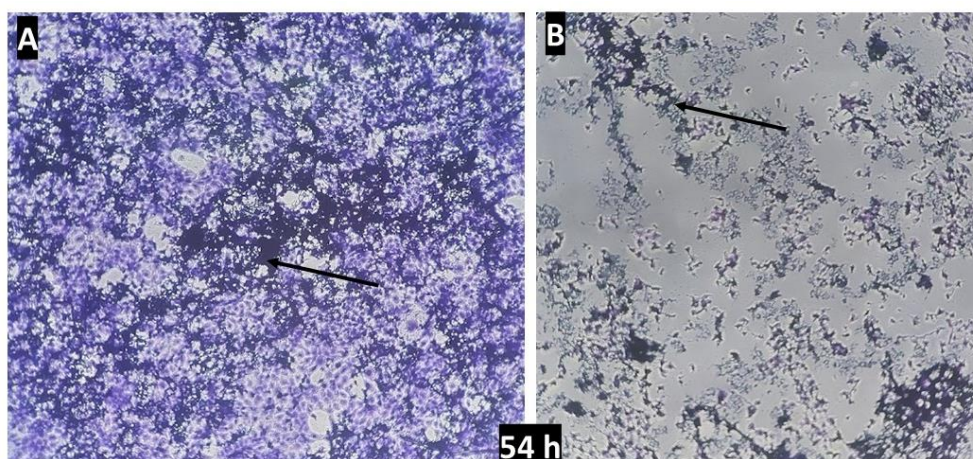
Foram utilizadas as frequências extremamente baixas (ELF) desenvolvidas pela EFFATHA para avaliar se estas eram capazes de reduzir a expressão do gene *CSF2* em queratinócitos humanos, e com isso avaliar o efeito desta menor expressão do gene no co-cultivo com *T. rubrum*.

Para uma melhor visualização em microscópio ótico dos efeitos do uso de ELF no co-cultivo, as células de queratinócitos e *T. rubrum* foram corados com uma solução de May-Gruwald- Giemsa, e os registros fotográficos dos co-cultivos nos tempos de 24, 48 e 54 h estão mostrados nas figuras abaixo.

**Figura 23- Comparativo entre o co-cultivo de queratinócitos humanos com *T. rubrum* (A) e queratinócitos humanos com *T. rubrum* exposto à ELF, nomeados neste trabalho como  $\Delta CSF2$  (B) por 24 e 48 h. As setas mostram o dermatófito *T. rubrum*. Zoom óptico 40x**



**Figura 24- Comparativo entre o co-cultivo de queratinócitos humanos com *T. rubrum* (A) e  $\Delta$ CSF2(B) por 54 h. As setas mostram o dermatófito *T. rubrum*. Zoom óptico 40x.**



De acordo com as figuras acima, é possível observar que em 24 h tanto no co-cultivo controle (A) quanto no co-cultivo  $\Delta$ CSF2 (B) as células de queratinócitos estavam aderidas no poço de cultivo e que *T. rubrum* estava aderido nos queratinócitos. Além disso observa-se maior desenvolvimento de *T. rubrum* no co-cultivo  $\Delta$ CSF2.

Já nos intervalos de tempo de 48 e 54 h, observa-se que somente no co-cultivo controle (A) as células de queratinócitos estão viáveis e aderidas ao poço de cultivo. Já nos co-cultivos  $\Delta$ CSF2 (B) observa-se que os queratinócitos não estão mais viáveis devido a quantidade mínima de células aderidas ao poço.

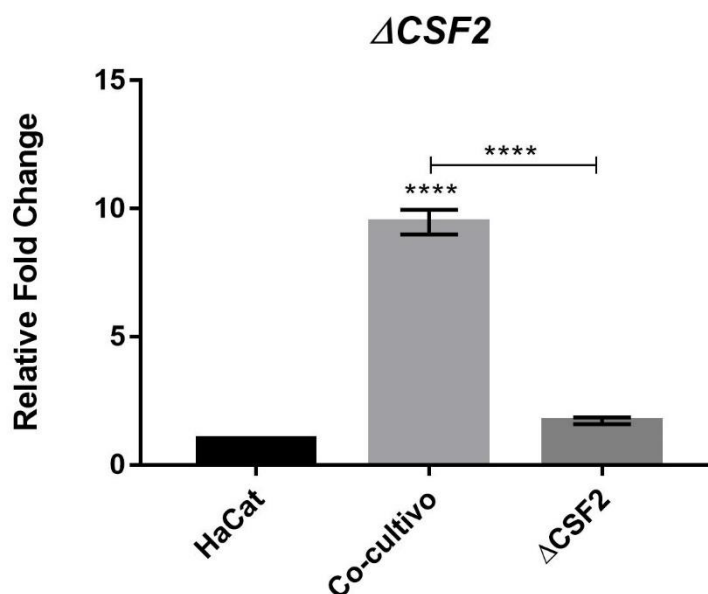
Para avaliar se o uso das frequências havia reduzido a expressão do gene CSF2 nestes intervalos de tempo, foi realizado o RT-qPCR.

#### **6.12 Análise da expressão gênica do gene *CSF2* no co-cultivo $\Delta$ CSF2.**

Devido ao fato dos queratinócitos não estarem viáveis nos co-cultivos  $\Delta$ CSF2 nos tempos de 48 e 54 h, não foi possível extrair o RNA humano nestas condições e, portanto, a análise de expressão do gene *CSF2* foi realizada somente no tempo de 24 h de co-cultivo.

O resultado está exposto na figura abaixo.

**Figura 25- Análise por RT-qPCR da expressão do gene *CSF2* em co-cultivo  $\Delta CSF2$  em 24h**



Conforme observado na figura acima, no co-cultivo  $\Delta CSF2$  houve uma redução na expressão do gene *CSF2* de aproximadamente 10 x quando comparado ao controle (co-cultivo). Estes dados sugerem que o uso das frequências desenvolvidas pela Tecnologia EFFATHA foi capaz de promover a redução da expressão do gene *CSF2* em queratinócitos humanos.

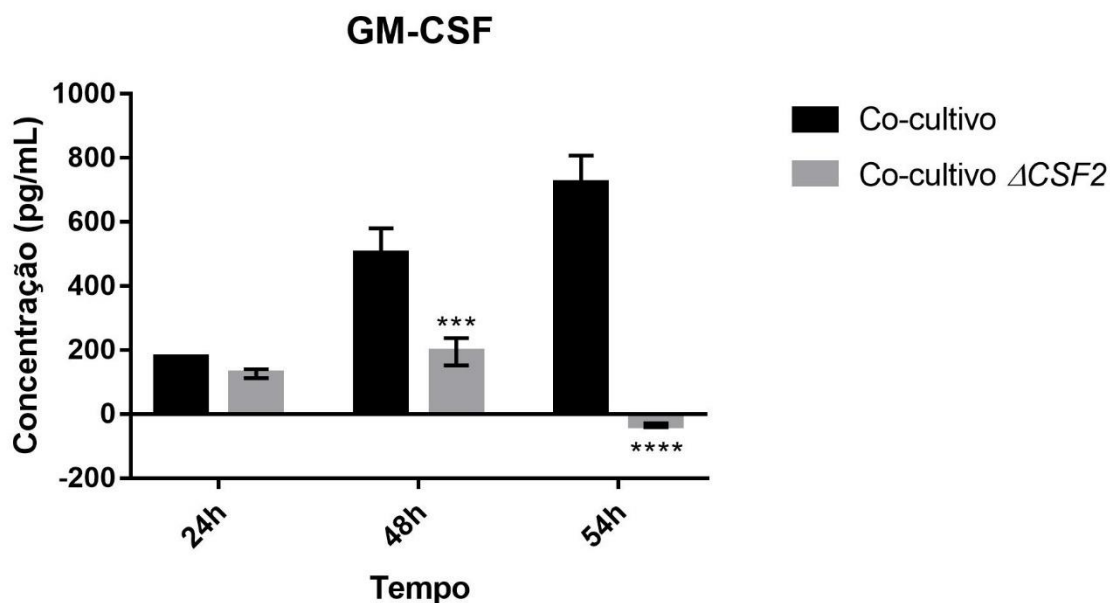
De forma complementar, podemos sugerir também que a redução da expressão do gene *CSF2* possa ter contribuído para a morte celular dos queratinócitos nos tempos de 48 e 54 h de co-cultivo conforme mostrado nas figuras 23 (B) e 24 (B). O gene *CSF2*, que codifica a citocina GM-CSF apresenta como uma de suas funções, a de conferir tolerância ao hospedeiro contra o ataque de patógenos (LEE; ACHUTHAN; HAMILTON, 2020) e portanto os resultados aqui apresentados podem indicar que a ausência deste gene na interação dermatófito-hospedeiro possa levar ao enfraquecimento da defesa celular de queratinócitos humanos após 24 h de co-cultivo ocasionando a morte celular.

Após a análise da expressão do gene *CSF2* no co-cultivo  $\Delta CSF2$ , a citocina GM-CSF também foi quantificada a fim de avaliar se a redução da expressão gênica observada também levou à redução da quantidade de citocina secretada no sobrenadante do cultivo celular.

### 6.13 Quantificação da citocina GM-CSF no sobrenadante do co-cultivo $\Delta CSF2$

A quantificação da citocina GM-CSF foi realizada nos tempos de 24, 48 e 54 h no sobrenadante celular do co-cultivo (controle) e do co-cultivo  $\Delta CSF2$ . Os resultados estão expostos na figura abaixo.

**Figura 26- Quantificação da citocina GM-CSF liberada no co-cultivo de queratinócitos humanos com *T. rubrum* (controle) e no co-cultivo  $\Delta CSF2$**



Conforme mostrado na figura acima, em 24 h não houve diferenças estatísticas entre a liberação da citocina GM-CSF no co-cultivo e no co-cultivo  $\Delta CSF2$ . Já em 48 h observou-se a redução da citocina GM-CSF no co-cultivo  $\Delta CSF2$ . A citocina não foi detectada no tempo de 54 h.

Analisando estes resultados em conjunto, podemos sugerir que em 24 h de co-cultivo  $\Delta CSF2$ , apesar da redução na expressão do gene *CSF2* (Fig.25) os queratinócitos ainda estão liberando a citocina GM-CSF no meio de cultivo. Este resultado corrobora com o que foi mostrado na figura 23 (B) em 24 h que indica que as células ainda estavam aderidas e em interação com *T. rubrum*. Já nos tempos de 48 h e 54 h a diminuição da concentração da citocina GM-CSF pode ter contribuído para o enfraquecimento da resposta celular dos queratinócitos contra *T. rubrum* e conseqüentemente levado à morte celular conforme mostrado nas figuras 23 (B) e 24 (B).

Pelo nosso conhecimento, não há ainda nenhum dado na literatura científica que avalie o efeito da redução da expressão gênica de *CSF2* em células de queratinócitos durante a interação dermatófito-hospedeiro e nem qual o papel da citocina GM-CSF na defesa celular do hospedeiro em dermatofitoses.

Conforme discutido anteriormente, sabe-se que GM-CSF é a principal citocina induzida durante a interação entre células epiteliais orais e *C. glabrata*, porém os mecanismos que regulam esta resposta imune também são poucos conhecidos (LI; DONGARI-BAGTZOGLU, 2009). Foi possível mostrar no presente trabalho que o gene *CSF2* e a citocina GM-CSF foram fortemente induzidos na interação entre queratinócitos humanos e *T. rubrum*.

Assim como observado por Li; Dongari-Bagtzoglou, (2009) na interação entre *C. glabrata* e células epiteliais orais, a indução de GM-CSF também foi dependente de adesão entre queratinócitos e *T. rubrum* e da viabilidade dos conídios do fungo. Além disso, foi possível mostrar que a ausência de GM-CSF ou diminuição da expressão do gene *CSF2* pode ser prejudicial para células de queratinócitos em uma interação dermatófito-hospedeiro, podendo levar à morte celular em uma situação *in vitro*.

Desta forma, sugerimos que *CSF2* e seu produto gênico GM-CSF são importantes para a defesa celular de queratinócitos humanos contra *T. rubrum*. De forma complementar, mais estudos ainda são necessários para concluir a investigação do papel desta citocina na resposta imune de queratinócitos contra *T. rubrum* assim como os efeitos *off-targets* do uso de ELF como ferramentas para a redução da expressão de genes.

Demais estudos também mostraram que o uso de GM-CSF aumentou o efeito anticandida intracelular de Voriconazol, sugerindo o uso desta citocina como um possível adjuvante terapêutico do Voriconazol para o tratamento de infecções causadas por *C. glabrata* e *C. krusei* resistentes à Fluconazol (BALTCH et al., 2005, 2008). Estudos futuros também são necessários para avaliar o possível efeito antifúngico de GM-CSF para infecções causadas por *T. rubrum*.

## 7. CONCLUSÃO

Considerando o conjunto de resultados apresentados é possível concluir que:

- ✓ Dos genes que foram triados anteriormente por RNA-seq envolvidos na resposta imune inata de queratinócitos, o gene *CSF2* foi o que apresentou indução mais expressiva durante o co-cultivo com *T. rubrum*;
- ✓ A utilização de *T. rubrum* em fase conidial e germinativa influenciou de forma diferente o perfil de expressão de alguns genes do sistema imune inato, assim como a secreção de citocinas pró-inflamatórias;
- ✓ O uso de conídios de *T. rubrum* inativados pelo calor durante o co-cultivo com queratinócitos demonstrou valores menores de *fold change* na expressão de genes de resposta do sistema imune quando comparado aos valores de *fold change* obtidos com o uso de conídios viáveis;
- ✓ A expressão do gene *CSF2* é dependente de adesão entre queratinócitos humanos e *T. rubrum*.
- ✓ O gene *CSF2* apresentou modulação mais expressiva quando os queratinócitos foram co-cultivados com *T. rubrum* do que quando foram incubados com LPS;
- ✓ A citocina GM-CSF foi detectada somente no sobrenadante de queratinócitos co-cultivados com *T. rubrum* e não foi liberada na presença de LPS.
- ✓ O uso de frequências extremamente baixas (ELF) foi efetiva para a redução da expressão do gene *CSF2*, pois durante o co-cultivo de queratinócitos humanos  $\Delta CSF2$  com *T. rubrum* a expressão do gene *CSF2* foi reduzida em até 10 x quando comparado ao controle (co-cultivo sem a frequência).
- ✓ A liberação da citocina GM-CSF não foi detectada no co-cultivo  $\Delta CSF2$  em 54h enquanto que no controle a liberação foi de 700 pg/mL.

## 9. REFERÊNCIAS

- A, B. et al. Targeting GM-CSF in COVID-19 Pneumonia: Rationale and Strategies. **Frontiers in immunology**, v. 11, 3 jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32719685/>>. Acesso em: 17 ago. 2021.
- ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. A foot in the door for dermatophyte research. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 6–9, 2012a.
- ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. Dermatophyte virulence factors: Identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012b.
- ALMEIDA, S. R. **Immunology of dermatophytosis** *Mycopathologia*, nov. 2008.
- ANSARI, M. et al. Extremely low frequency magnetic field enhances glucose oxidase expression in *Pichia pastoris* GS115. **Enzyme and microbial technology**, v. 98, p. 67–75, 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28110666/>>. Acesso em: 1 set. 2021.
- ARAYA, S.; TESFAYE, B.; FENTE, D. Epidemiology of Dermatophyte and Non-Dermatophyte Fungi Infection in Ethiopia. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. Volume 13, p. 291–297, 8 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/epidemiology-of-dermatophyte-and-non-dermatophyte-fungi-infection-in-e-peer-reviewed-article-CCID>>. Acesso em: 30 jun. 2021.
- BALTCH, A. et al. Effects of voriconazole, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon gamma on intracellular fluconazole-resistant *Candida glabrata* and *Candida krusei* in human monocyte-derived macrophages. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 52, n. 4, p. 299–304, ago. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15893901/>>. Acesso em: 11 set. 2021.
- BALTCH, A. et al. Anticandidal effects of voriconazole and caspofungin, singly and in combination, against *Candida glabrata*, extracellularly and intracellularly in granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)-activated human monocytes. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 1285–1290, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18772160/>>. Acesso em: 11 set. 2021.
- BECHER, B.; TUGUES, S.; GRETER, M. **GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation** *Immunity* Cell Press, , 15 nov. 2016.
- BECKNELL, B.; SPENCER, J. D. A Review of Ribonuclease 7's Structure, Regulation, and Contributions to Host Defense. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 423, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27011175>> <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4813274>>.
- BERTOLINO, G. et al. Macroscopic and histological effects of magnetic field exposition in the process of tissue reparation in Wistar rats. **Archives of Dermatological Research** 2006 298:3, v. 298, n. 3, p. 121–126, 14 jun. 2006. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00403-006-0667-z>>. Acesso em: 1 set. 2021.
- BHATTACHARYA, P. et al. Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 8, p. 585–599, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2014.0149>>. Acesso em: 19 ago. 2019.
- BITENCOURT, T. A. et al. Trans-chalcone activity against *Trichophyton rubrum* relies on an interplay between signaling pathways related to cell wall integrity and fatty acid metabolism. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 411, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5792-0>>. Acesso em: 4 jun. 2019.
- BLANK, M.; GOODMAN, R. DNA is a fractal antenna in electromagnetic fields. **http://dx.doi.org/10.3109/09553002.2011.538130**, v. 87, n. 4, p. 409–415, abr. 2011. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/09553002.2011.538130>>. Acesso em: 2 set. 2021.
- BLUTFIELD, M. S. et al. **The immunologic response to *Trichophyton rubrum* in lower extremity fungal infections** *Journal of Fungi* MDPI AG, , 1 set. 2015. .
- BORAL, H. et al. **Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*,**

**Cryptococcus neoformans, Trichophyton rubrum, and Exophiala dermatitidis** *Fungal Genetics and Biology* Academic Press Inc., , 1 fev. 2018.

BRASCH, J. Current knowledge of host response in human tinea. **Mycoses**, v. 52, n. 4, p. 304–312, jul. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0507.2008.01667.x>>. Acesso em: 23 jan. 2020.

BRASCH, J. Pathogenesis of tinea. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 8, n. 10, p. 780–786, 30 jul. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1610-0387.2010.07481.x>>. Acesso em: 23 jan. 2020.

BROWN, S. J.; IRVINE, A. D. Atopic Eczema and the Filaggrin Story. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, n. 2, p. 128–137, 2008.

CANTELLI, B. A. M. et al. Caffeic acid and licochalcone A interfere with the glyoxylate cycle of *Trichophyton rubrum*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. September, p. 0–1, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332217349788>>.

CARROLL, D. Focus: Genome Editing: Genome Editing: Past, Present, and Future. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 4, p. 653, 1 dez. 2017. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5733845/](http://pmc/articles/PMC5733845/)>. Acesso em: 1 set. 2021.

CHEN, C. et al. Antifungal activity, main active components and mechanism of *Curcuma longa* extract against *Fusarium graminearum*. **PLoS ONE**, 2018.

CHEN, S. et al. *Cryptococcus Neoformans* Infection and Immune Cell Regulation in Human Monocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 537–547, 28 ago. 2015. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/430375>>. Acesso em: 17 set. 2021.

DAI, Y.; XIA, X.; SHEN, H. Multiple abscesses in the lower extremities caused by *Trichophyton rubrum*. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 271, dez. 2019.

DAI, Z. et al. Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor , celecoxib , on breast cancer in Vitro and in Vivo. p. 1–8, 2012.

DAS GUPTA, M. et al. *Aspergillus fumigatus* induces microRNA-132 in human monocytes and dendritic cells. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 304, n. 5–6, p. 592–596, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24841251/>>. Acesso em: 17 set. 2021.

DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, F. C. et al. Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 969–978, out. 2019.

DEGREEF, H. Clinical Forms of Dermatophytosis (Ringworm Infection). **Mycopathologia** 2008 **166:5**, v. 166, n. 5, p. 257–265, 14 maio 2008. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11046-008-9101-8>>. Acesso em: 11 set. 2021.

DONG, X. et al. Critical role of Keratin 1 in maintaining epithelial barrier and correlation of its down-regulation with the progression of inflammatory bowel disease. **Gene**, v. 608, p. 13–19, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.01.015>>.

DOUDNA, J. A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. **Nature** 2020 **578:7794**, v. 578, n. 7794, p. 229–236, 12 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-1978-5>>. Acesso em: 1 set. 2021.

DRUMMOND, R. A. et al. GM-CSF therapy in human caspase recruitment domain-containing protein 9 deficiency. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 142, n. 4, p. 1334- 1338.e5, 1 out. 2018.

EFFATHA. Tecnologia Effatha. Disponível em: <https://www.effatha.com.br/>. Acesso em: 21 set. 2021

FACHIN, A. L. et al. Transcriptome of Host–Dermatophyte Interactions Using Infection Models. **Dermatophytes**

**and Dermatophytoses**, p. 161–179, 2021. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-67421-2\\_8](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-67421-2_8)>. Acesso em: 13 ago. 2021.

FAWAY, É.; LAMBERT DE ROUVROIT, C.; POUMAY, Y. In vitro models of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations *Experimental Dermatology*. **Blackwell Publishing Ltd**, , 1 ago. 2018. . Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/exd.13726>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

FLECK, C. B.; SCHÖBEL, F.; BROCK, M. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: Nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 5, p. 400–407, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.007>>.

GAO, Q. et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 369, n. 6499, p. 77–81, 3 jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32376603/>>. Acesso em: 17 set. 2021.

GAVINO, C. et al. CARD9 Deficiency and Spontaneous Central Nervous System Candidiasis: Complete Clinical Remission With GM-CSF Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 1, p. 81–84, 1 jul. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciu215>>. Acesso em: 16 set. 2019.

GAVINO, C. et al. Impaired RASGRF1/ERK-mediated GM-CSF response characterizes CARD9 deficiency in French-Canadians. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 4, p. 1178- 1188.e7, 1 abr. 2016.

GNAT, S. et al. Host-and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, p. 823–836, 2019.

GRUMBT, M.; MONOD, M.; STAIB, P. Genetic advances in dermatophytes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 320, n. 2, p. 79–86, 1 jul. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2011.02276.x>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

GUPTA, D. et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. **Life Sciences**, v. 232, p. 116636, 1 set. 2019.

HADDAD, J. B.; AG, O.; P, S. The biologic effects and the therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation on bone and cartilage: new findings and a review of earlier work. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 5, p. 485–490, jun. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17604552/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

HAIYONG, H. RNA Interference to Knock Down Gene Expression. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1706, p. 293, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30674332/>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

HARDER, J.; SCHRÖDER, J. M. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46779–46784, 2002.

HESSE-MACABATA, J. et al. Innate immune response of human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts to in vitro incubation of *Trichophyton benhamiae* DSM 6916. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. 6, p. 1177–1188, 2019.

HOU, Y.; MA, W. Natural Host-Induced Gene Silencing Offers New Opportunities to Engineer Disease Resistance. **Trends in microbiology**, v. 28, n. 2, p. 109–117, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31606358/>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

HRYPHOROWICZ, M. et al. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 3, p. 233, 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28543417/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

HUBE, B. et al. Dermatophytes and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 1, p. e44–e58, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.11.002>>.

JL, G. et al. Phase III Trial of PROSTVAC in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 37, n. 13, p. 1051–1061, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30817251/>>.

Acesso em: 17 ago. 2021.

KERSHENOVICH, R. et al. A Unique Clinicopathological Manifestation of Fungal Infection: A Case Series of Deep Dermatophytosis in Immunosuppressed Patients. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 18, n. 5, p. 697–704, 1 out. 2017.

KIDANE, Y. H.; LAWRENCE, C.; MURALI, T. M. Computational approaches for discovery of common immunomodulators in fungal infections : towards broad-spectrum immunotherapeutic interventions. 2013.

KIM, H. K. et al. Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in allergic nasal mucosa, contributing to chemokine secretion in nasal epithelium. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 30, n. 4, p. 107–112, 2016a. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1945-8924&volume=30&issue=4&spage=107>>.

KIM, S. H. et al. Dermatophyte abscesses caused by *Trichophyton rubrum* in a patient without pre-existing superficial dermatophytosis: A case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, jun. 2016b.

KÖLLISCH, G. et al. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. **Immunology**, v. 114, n. 4, p. 531–541, abr. 2005.

KOMOTO, T. T. et al. Gene Expression Response of *Trichophyton rubrum* during Coculture on Keratinocytes Exposed to Antifungal Agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/180535/>>.

KWON-CHUNG, K. J. Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 381–389, 1 ago. 1998.

LAFOUNTAIN, J. S.; FATHE, K.; SMYTH, H. D. C. Delivery and Therapeutic Applications of Gene Editing Technologies ZFNs , TALENs , and CRISPR / Cas9. **Elsevier B.V.**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.029>>.

LAKSHMIPATHY, D. T.; KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science**, v. 02, n. 07, p. 726–731, 29 jul. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4236/ns.2010.27090>>. Acesso em: 6 jul. 2021.

LEE, K. M. C.; ACHUTHAN, A. A.; HAMILTON, J. A. GM-CSF: A Promising Target in Inflammation and Autoimmunity. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 9, p. 225, out. 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7605919/](https://pmc/articles/PMC7605919/)>. Acesso em: 12 ago. 2021.

LH, B. et al. Immune Correlates of GM-CSF and Melanoma Peptide Vaccination in a Randomized Trial for the Adjuvant Therapy of Resected High-Risk Melanoma (E4697). **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 23, n. 17, p. 5034–5043, 1 set. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28536308/>>. Acesso em: 17 ago. 2021.

LI, L. et al. SARS-CoV-2 vaccine candidates in rapid development. **<https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1804777>**, v. 17, n. 3, p. 644–653, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21645515.2020.1804777>>. Acesso em: 17 set. 2021.

LI, L.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. Epithelial GM-CSF Induction by *Candida glabrata*. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 8, p. 746–751, 4 ago. 2009. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034509341266>>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOSQUADRO, W. D. **Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer** *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* W.B. Saunders, , 1 ago. 2017.

MA, R. et al. HOXB7-S3 inhibits the proliferation and invasion of MCF-7 human breast cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, p. 4901–4908, 2015. Disponível em: <<http://www.spandidos->

publications.com/10.3892/mmr.2015.4009>.

MAEDER, M. L.; GERSBACH, C. A. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 3, p. 430–446, 1 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1525001616309613/fulltext>>. Acesso em: 1 set. 2021.

MARTINEZ-ROSSI, N. M. et al. Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs: Mechanisms and Prospectus. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, 29 maio 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01108/full>>.

MARTINEZ-ROSSI, N. M. et al. State-of-the-Art Dermatophyte Infections : Epidemiology. 2021.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Pathogenesis of Dermatophytosis: Sensing the Host Tissue. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, p. 215–227, 2017.

MARTINEZ, D. A. et al. Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. **mBio**, v. 3, n. 5, p. e00259-12, 1 nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22951933>>. Acesso em: 4 out. 2019.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.22913>>.

MCGRATH, J. A. Filaggrin and the great epidermal barrier grief. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 49, n. 2, p. 67–74, 2008.

MEHRA, T. et al. Alternative approaches to antifungal therapies. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 10, p. 778–782, 2012.

MEI, Y.-Z. et al. Strategies for gene disruption and expression in filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2019 103:15, v. 103, n. 15, p. 6041–6059, 21 jun. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-09953-2>>. Acesso em: 13 set. 2021.

MERCER, D. K.; STEWART, C. S. Keratin hydrolysis by dermatophytes. **Medical Mycology**, v. 57, n. 1, p. 13–22, 2019.

NENOFF, P. et al. Mycology - An update Part 2: Dermatophytes: Clinical picture and diagnostics. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, v. 12, n. 9, p. 749–777, 2014.

NENOFF, P. et al. The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*—A molecular study. **Mycoses**, n. December 2018, p. 336–356, 2019.

NICOLATOU-GALITIS, O. et al. Oral pseudomembranous candidiasis, herpes simplex virus-1 infection, and oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mouthwash. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 30, n. 8, p. 471–480, 2001.

NIYONSABA, F. et al. Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. **Experimental Dermatology**. **Blackwell Publishing Ltd**, , 1 nov. 2017. . Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/exd.13314>>. Acesso em: 12 mar. 2020.

OGAWA, Y. S. [Role of cytokine secretion of human keratinocytes in dermatophytosis]. **Nihon Ishinkin Gakkai zasshi = Japanese journal of medical mycology**, v. 51, n. 3, p. 125–130, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20716850/>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

OSHEROV, N.; MAY, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS Microbiology Letters**, v. 199, n. 2, p. 153–160, 2001.

P, S. et al. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. **Cancer research**, v. 64, n. 17, p. 6337–6343, 1 set. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15342423/>>. Acesso em: 17 ago. 2021.

- PASI, F. et al. Effects of extremely low-frequency magnetotherapy on proliferation of human dermal fibroblasts. **Electromagnetic biology and medicine**, v. 35, n. 4, p. 343–352, 1 out. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27254779/>>. Acesso em: 1 set. 2021.
- PERES, N. T. D. A. et al. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657–667, 2010.
- PETRINA, M.; MARTIN, J.; BASTA, S. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor has come of age: From a vaccine adjuvant to antiviral immunotherapy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 59, p. 101, 1 jun. 2021. Disponível em: <[pmc/articles/PMC8064670/](https://pmc/articles/PMC8064670/)>. Acesso em: 12 ago. 2021.
- PETRUCCELLI, M. F. et al. Dual RNA-Seq analysis of trichophyton rubrum and HaCat keratinocyte co-culture highlights important genes for fungal-host interaction. **Genes**, v. 9, n. 7, p. 362, 19 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4425/9/7/362>>. Acesso em: 4 jun. 2019.
- PETRUCCELLI, M. F. et al. The transcriptional profile of trichophyton rubrum co-cultured with human keratinocytes shows new insights about gene modulation by terbinafine. **Pathogens**, v. 8, n. 4, 1 dez. 2019.
- PETRUCCELLI, M. F. et al. Epidemiology and diagnostic perspectives of dermatophytoses. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–15, 2020.
- RADEMACHER, F.; SIMANSKI, M.; HARDER, J. RNase 7 in cutaneous defense. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, 2016.
- ROTH, W. et al. Keratin 1 maintains skin integrity and participates in an inflammatory network in skin through interleukin-18. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 22, p. 5269–5279, 2012. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.116574>>.
- SAIJO, S.; IWAKURA, Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. **International Immunology**, v. 23, n. 8, p. 467–472, 1 ago. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxr046>>. Acesso em: 4 fev. 2020.
- SANIE-JAHROMI, F.; SAADAT, I.; SAADAT, M. Effects of extremely low frequency electromagnetic field and cisplatin on mRNA levels of some DNA repair genes. **Life Sciences**, v. 166, p. 41–45, 1 dez. 2016.
- SARDANA, K.; GUPTA, A.; MATHACHAN, S. R. Immunopathogenesis of Dermatophytoses and Factors Leading to Recalcitrant Infections. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 12, n. 3, p. 389, 2021. Disponível em: <[pmc/articles/PMC8202482/](https://pmc/articles/PMC8202482/)>. Acesso em: 11 ago. 2021.
- SEO, J.-K. et al. Dermal Infection with Trichophyton rubrum in an Immunocompetent Patient. **Annals of Dermatology**, v. 31, n. Suppl, p. S32, 2019.
- SHI, Y. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. **Cell Research**, v. 16, n. 2, p. 126–133, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cr.7310017>>.
- SHIN, M. D. et al. COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. **Nature Nanotechnology** 2020 15:8, v. 15, n. 8, p. 646–655, 15 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41565-020-0737-y>>. Acesso em: 17 set. 2021.
- SHIRAKI, Y. et al. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during Trichophyton tonsurans and Arthroderma benhamiae infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 1175–1185, 2006.
- SILK, A. W.; MARGOLIN, K. Cytokine Therapy. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 261–274, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.12.004>>.
- SILVA-ROCHA, W. P.; DE AZEVEDO, M. F.; CHAVES, G. M. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**, 2017.
- STENZL, A. Re: Phase III Trial of PROSTVAC in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. **European Urology**, v. 77, n. 1, p. 131–132, 1 jan. 2020.

STOBER, C. B. et al. Slc11a1, formerly Nramp1, is expressed in dendritic cells and influences major histocompatibility complex class II expression and antigen-presenting cell function. **Infection and immunity**, v. 75, n. 10, p. 5059–5067, 2007.

TANG, J.-Y. et al. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on B16F10 cancer cells. <https://doi.org/10.1080/15368378.2019.1591438>, v. 38, n. 2, p. 149–157, 3 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15368378.2019.1591438>>. Acesso em: 1 set. 2021.

TANI, K. et al. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. **Archives of Dermatological Research**, v. 299, n. 8, p. 381–387, 6 set. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00403-007-0780-7>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

VERMOUT, S. et al. RNA silencing in the dermatophyte *Microsporum canis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 275, n. 1, p. 38–45, 1 out. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article/275/1/38/500189>>. Acesso em: 13 set. 2021.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*. **American Society for Microbiology**, , 1995. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7621400/>>. Acesso em: 6 jul. 2021.

WESSLING-RESNICK, M. Nramp1 and other transporters involved in metal withholding during infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 31, p. 18984–18990, 31 jul. 2015.

YAMADA, T. et al. Enhanced gene replacements in Ku80 disruption mutants of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 298, n. 2, p. 208–217, 1 set. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article/298/2/208/520773>>. Acesso em: 13 set. 2021.

YOSHIKAWA, F. S. Y.; FERREIRA, L. G.; DE ALMEIDA, S. R. IL-1 signaling inhibits *Trichophyton rubrum* conidia development and modulates the IL-17 response in vivo. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 449–457, 1 jan. 2015.

ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, p. 77–86, 25 fev. 2017a. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11046-016-0082-8>>. Acesso em: 16 set. 2019.

ZHANG, M. et al. Simultaneous dermatophytosis and keratomycosis caused by *Trichophyton interdigitale* infection: a case report and literature review. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 983, 21 nov. 2019. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-4612-0>>. Acesso em: 15 abr. 2020.

ZHENG, H. et al. Whole-genome resequencing of *Trichophyton rubrum* provides insights into population differentiation and drug resistance. **Mycopathologia**, v. 185, n. 1, p. 103–112, 19 set. 2019.