

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

BRUNA ALINE MICHELOTTO CANTELLI

TRANSCRIPTOMA DO CO-CULTIVO DE MACRÓFAGOS HUMANOS THP-1
COM CONÍDIOS GERMINADOS INATIVADOS DE *Trichophyton rubrum*

RIBEIRÃO PRETO- SP

2021

Bruna Aline Michelotto Cantelli

TRANSCRIPTOMA DO CO-CULTIVO DE MACRÓFAGOS HUMANOS THP-1
COM CONÍDIOS GERMINADOS INATIVADOS DE *Trichophyton rubrum*

Defesa apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia aplicada à saúde.

Orientador: Prof^a Dr^a. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

RIBEIRÃO PRETO- SP

2021

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

C229t Cantelli, Bruna Aline Michelotto, 1988-
Transcriptoma do co-cultivo de macrófagos humanos thp-1
Com conídios germinados inativados de *trichophyton rubrum* /
Bruna Aline Michelotto Cantelli. – Ribeirão Preto, 2021.
80 f.: il.: color.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Fachin Saltoratto.

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

1. Dermatofitos. 2. Infecção profunda. 3. Sequenciamento de
RNA, LPS e IL-32. I. Título.

CDD 660

BRUNA ALINE MICHELOTTO CANTELLI

INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR E MOLECULAR ATRAVÉS DO RNA-SEQ DA INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS THP-1 CO-CULTIVADOS COM *Trichophyton rubrum*

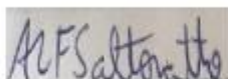
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

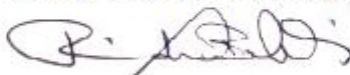
Data da defesa: 16 de junho de 2021

Resultado: Aprovada

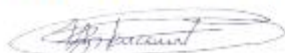
BANCA EXAMINADORA



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



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



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



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



Profa. Dra. Camila Figueiredo Pizan
Universidade de São Paulo – USP

**RIBEIRÃO PRETO
2021**

Dedico essa tese de doutorado a todas as pessoas que me apoiaram durante esse processo. A minha família por ser meu alicerce em todas as fases da minha vida, principalmente aos meus pais. Ao meu marido pelo apoio e compreensão em dias turbulentos. Aos meus amigos, por nunca me abandonaram nessa jornada, principalmente aqueles que me ajudaram dia-a-dia dentro do laboratório, chorando de alegria com bons resultados ou de triste com resultados ruins.

Agradecimento

- Primeiramente a Deus por ter me dado saúde e sabedoria.
- A minha família pelo amor, incentivo, apoio, paciência e acompanhamento de cada etapa deste trabalho.
- Aos amigos que a biotecnologia que me deu, que fizeram e fazem parte da minha formação profissional e pessoal, principalmente Mariana Heinzen de Abreu, Monise Fazolin Petrucelli, Tamires Aparecida Bitencourt e todos os outros que passaram pelo laboratório ao longo desses anos.
- Meu sincero agradecimento a Gabriela Gonzales Segura que me ajudou desde o início chorando ou sorrindo comigo todos os dias.
- Aos meus professores por me proporcionaram o conhecimento, principalmente Professor Dr. Mozart Marins.
- A Professora Dr. Ana Lúcia Fachin Saltorato, que além de orientadora foi minha mãe todos esses anos, serei eternamente grata pelo apoio, dedicação, confiança, paciência, conselhos e inúmeros momentos que passamos juntas.
- A Universidade de Ribeirão Preto, a CAPES e a FAPESP.
- A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, meu muito obrigado.

RESUMO

Os dermatófitos são fungos que utilizam substratos queratinizados como principal fonte de nutrientes, acometendo principalmente pele, cabelos e unhas. Dentre os dermatófitos, o *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) é considerado o principal causador de dermatofitoses em todo o mundo. Apesar da maioria das micoses apresentarem caráter superficial, atualmente *T. rubrum* está causando infecções profundas em pacientes com o sistema imunológico debilitado ocasionando lesões graves e profundas. Assim, torna-se importante compreender o mecanismo de ativação do sistema imunológico do hospedeiro em uma infecção profunda. O presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar a infecção profunda provocada por conídios germinados vivos (CGV) e conídios germinados inativados (CGI) de *T. rubrum* do ponto de vista molecular e celular utilizando o co-cultivo com a linhagem de monócitos/macrófagos humanos (THP-1). Na análise da viabilidade celular dos macrófagos após o contato de CGV de *T. rubrum* por 24h observamos a liberação de 20% da enzima lactato desidrogenase, mostrando que 80% dos macrófagos estavam viáveis. No tempo de 24 h observamos também a maior liberação da IL-6, utilizando CGV ou CGI, dado que indica ativação do sistema imune. A liberação da TNF- α , IL-8 e IL-1 β foi maior utilizando CGV, no entanto, para IL-2 e IL-12 a liberação foi maior utilizando CGI. O sequenciamento de nova geração da resposta ao co-cultivo CGI de *T. rubrum* mostrou 83 genes modulados sendo 65 induzidos e 18 reprimidos. A categorização dos genes modulados evidenciou as vias de transdução de sinais, comunicação celular e resposta imune. Foram selecionados 16 genes para serem validados e verificamos que a relação de Pearson foi de 0,98, indicando uma alta correlação entre o RNA-seq e qPCR. Foi observado que a modulação de expressão para todos os genes foi semelhante utilizando CGV ou CGI no co-cultivo. Entretanto, os valores de fold change foram maiores utilizando CGV. Não foi possível comparar o co-cultivo de THP-1 com *T. rubrum* e estimulado com LPS bacteriano, pois não foi observada a expressão do gene TRL4 (receptor do LPS) no tempo de 24h. Porém, no co-cultivo na presença do LPS em 9h verificamos a repressão dos genes ANKRD1 e indução de TLR8, TLR7 e CD1D. Devido à alta expressão do gene IL-32 no RNAseq, quantificamos a interleucina IL-32 e verificamos a liberação no co-cultivo com *T. rubrum*. Na quantificação da IL-32 também não foi possível comparar com o LPS, devido a diferença dos tempos testados no co-cultivo (9h para LPS e 24h para *T. rubrum*). Desta forma, podemos concluir que o modelo de co-cultivo de macrófagos com *T. rubrum* mostrou a capacidade dos macrófagos em modular a resposta imunológica, através do aumento de liberação de citocinas pro-inflamatórias e pelo perfil de expressão gênica observado no RNA-seq. Através dos resultados obtidos podemos evidenciar possíveis alvos moleculares expressos nos macrófagos que podem ser explorados através de terapias anti-dermatofitos que envolvam a ativação do sistema imune.

Palavras-Chaves: dermatófitos, infecção profunda, sequenciamento de RNA, LPS e IL-32.

ABSTRACT

Dermatophytes are fungi that use keratinized substrates as the main source of nutrients, affecting mainly skin, hair and nails. Among dermatophytes, *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) is considered the main cause of dermatophytoses worldwide. Although most mycoses are superficial, currently *T. rubrum* has been causing systemic infections in patients with weakened immune systems, causing serious and profound injuries. Thus, it is important to understand the mechanism of activation of the host's immune system in a systemic infection. The present work had as main objective to characterize the deep infection caused by live germinated conidia (CGV) and inactivated germinated conidia (CGI) of *T. rubrum* from a molecular and cellular point of view using the co-culture of human monocyte / macrophage cell line (THP-1). In the analysis of the cellular viability of the macrophages after contacting *T. rubrum*'s CGV for 24h, we observed the release of 20% of lactate dehydrogenase enzyme, showing that 80% of the macrophages were viable. Within 24 h, we also observed a greater release of IL-6, using CGV or CGI, as it indicates activation of the immune system. The release of TNF- α , IL-8 and IL-1 β was greater using CGV, however for IL-2 and IL-12 the release was greater using CGI. The RNA sequencing of a new generation of the response to the *T. rubrum* CGI co-culture showed 83 modulated genes, 65 of which were up-regulated and 18 down-regulated. The categorization of the modulated genes showed the signal transduction pathways, cellular communication and immune response. A total of 16 genes were selected to be validated and we found that the Pearson ratio was 0.98, indicating a high correlation between RNA-seq and qPCR. It was observed that the modulation of expression for all genes was similar using CGV or CGI in co-cultivation. It was not possible to compare the co-cultivation of THP-1 with *T. rubrum* and stimulated with bacterial LPS, as no expression of the TLR4 gene (LPS receptor) was observed within 24h. However, not co-cultivation in the presence of LPS at 9h, we verified the repression of ANKRD1 genes and induction of TLR8, TLR7 and CD1D. Due to the high expression of the IL-32 gene in RNA-seq, we quantified the interleukin IL-32 and verified its release in co-cultivation with *T. rubrum*. In the quantification of IL-32, it was not possible to compare with LPS either, due to the difference in the times tested in the co-cultivation (9h for LPS and 24h for *T. rubrum*). Thus, we can conclude that the macrophage co-cultivation model with *T. rubrum* showed the ability of macrophages to modulate the immune response, through the increased release of pro-inflammatory cytokines and the gene expression profile observed in RNA-seq. Through the results obtained, we can evidence possible molecular targets expressed in macrophages that can be explored through anti-dermatophyte therapies that involve the activation of the immune system.

Keywords: dermatophytes, deep infection, sequencing RNA, LPS and IL-32.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Co-cultivo de macrófagos com conídios germinados (CGV) e inativados pelo calor (CGI) de <i>T. rubrum</i> . As setas indicam o co-cultivo. Fonte: Adaptado (SEGURA et al., 2020)..	24
FIGURA 2: Linhagem de monócitos THP-1 em suspensão (A). Linhagem de monócitos diferenciados em macrófagos com 12,5ng/ml de PMA, aderentes (B)	39
FIGURA 3: Co-cultivo de CGV de <i>T. rubrum</i> em linhagem de macrófago humano THP-1 por 24h. Microscopia de fluorescência leica dmi 6000.....	40
FIGURA 4: Comprovação da inativação dos CG de <i>T. rubrum</i> pelo calor. Controle positivo (A), nenhum crescimento fúngico (B).....	40
FIGURA 5: Co-cultivo de CGI de <i>T. rubrum</i> em linhagem de macrófago humano THP-1 por 24h. Microscopia de fluorescência leica dmi 6000.....	41
FIGURA 6: Co-cultivo de CGV de <i>T. rubrum</i> em linhagem de macrófago humano THP-1 por 24h. Aumento de 5 kx. As setas indicam os CGV dentro dos macrófagos.	42
FIGURA 7: liberação de LDH (%) em diferentes tempos do co-cultivo de CGV de <i>T. rubrum</i> . Onde THP-1: somente macrófago e CO-CGV: co-cultivo de CGV de <i>T. rubrum</i> em linhagem de macrófago humano THP-1. TWO WAY ANOVA E BONFERRONI'S	43
FIGURA 8: Quantificação da liberação de IL-6 em diferentes tempos de co-cultivo. THP-1: somente células de macrófagos. CO-CGV: co-cultivo de THP-1 com CG vivos de <i>T. rubrum</i> e CO-CGI: co-cultivo de THP-1 com CG inativados de <i>T. rubrum</i> . TWO WAY ANOVA.	44
FIGURA 9: Quantificação da liberação de citocinas. THP-1: somente os macrófagos. CO-CGV: co-cultivo de THP-1 com CG vivos de <i>T. rubrum</i> e CO-CGI co-cultivo de THP-1 com CG inativados de <i>T. rubrum</i> em 24h. TWO WAY ANOVA E TURKEY.....	45
FIGURA 10: Gel denaturante de RNA contendo as amostras dos macrófagos THP-1 e co-cultivo com CGI de <i>T. rubrum</i>	48
FIGURA 11: Análise das amostras de RNA dos macrófagos THP-1 (7, 8 E 9) e co-cultivo de macrófagos THP-1 com CGI de <i>T. rubrum</i> (10, 11 E 12) utilizando o bioanalisador.....	48
FIGURA 12: Volcano Plot.....	50
FIGURA 13: Categorização funcional baseada em genes diferencialmente expressos. Processos biológicos	51
FIGURA 14: Comparação do perfil de modulação dos genes encontrados no RNA-seq e qPCR. R=0,98, p<0,001	56
FIGURA 15: Comparação do perfil de expressão gênica do co-cultivo de TPH-1 com CGV e CGI de <i>T. rubrum</i>	59
FIGURA 16: Expressão gênica de TLR4 de THP-1 estimulados com LPS por 24h.....	60
FIGURA 17: Macrófagos THP-1 estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). A- Expressão gênica de TLR4. B- % de liberação de LDH (9h).....	61
FIGURA 18: Comparação da expressão gênica. (A)- co-cultivo de THP-1 com CGI de <i>T. rubrum</i>	62
FIGURA 19: Quantificação da IL-32. A- Co-cultivo de THP-1 com CGI de <i>T. rubrum</i> por 24h. B- THP-1 estimuladas com LPS por 9h.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Relatos de casos de infecção profundas causadas por dermatófitos	16
TABELA 2: Limite de detecção das ILs.....	26
TABELA 3: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para a qPCR. Forward (F) e reverse (R)	32
TABELA 4: Concentração dos reagentes para a síntese do cDNA	34
TABELA 5: As reações foram feitas da seguinte forma, para os oligonucleotídeos iniciadores de 50/70/100 NM	35
TABELA 6: Eficiência e concentração dos primers	35
TABELA 7: Descrição das ILs: TNF-A, IL-1B, IL-8, IL-17, IL-2 E IL-12.....	47
TABELA 8: Características gerais das leituras de RNA-seq mapeadas para o genoma de referência humano (HG38)	49
TABELA 9: Genes induzidos no RNA-seq envolvidos em diferentes processos biológicos.....	52
TABELA 10: Genes reprimidos no RNA-seq envolvidos em diferentes processos biológicos.....	52
TABELA 11: Genes induzidos selecionados para validação a partir do RNA-seq do co-cultivo de macrófago THP-1 com CGI de <i>T. rubrum</i> por 24h.....	53
TABELA 12: Genes reprimidos selecionados para validação a partir do RNA-seq do co-cultivo de macrófago THP-1 com CGI de <i>T. rubrum</i> por 24h.....	53
TABELA 13: Genes e funções segundo o site genes card.....	54
TABELA 14: Genes e respectivas funções relacionados com infecções fúngicas segundo a literatura	56
TABELA 15: Descrição dos genes modulados e relacionados com resposta imune e infecção segundo a literatura	58

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- BSA: Albumina sérica bovina
- CD14: Cluster de diferenciação 14
- CGI: Conídios germinados inativados
- CGV: Conídios germinados vivos
- CoV: co-cultivo de macrófagos THP-1 com conídios germinados vivos
- CoI: co-cultivo de macrófagos THP-1 com conídios germinados inativados
- DEG: Genes diferencialmente expressos
- FBS: Soro bovino fetal
- GO: Gene ontology
- HIV: Vírus da imunodeficiência humana
- HCl: Ácido clorídrico
- IL: Interleucina
- LDH: Lactato desidrogenase
- LPS: Lipopolissacarídeo de *E. coli*
- MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
- NTC: Non template control
- PAMPS: Padrões moleculares associados a patógenos
- PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato
- PRRS: Receptores de reconhecimento padrão
- qPCR: PCR quantitativa em tempo real
- RIN: Número de integridade do RNA
- ROX: Corante de referência
- Th1: Células T helper 1
- Th2: Células T helper 2
- THP-1: Linhagem celular de monócito humano
- TMB: 3,3',5, 5' benzidina Tetrametil
- TLR: Receptores do tipo toll

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1.1 Dermatofitoses	14
1.2 Dermatofitoses profundas	15
1.3 Resposta imunológica de <i>T. rubrum</i>	16
1.4 Modelos de estudo patógeno-hospedeiro	18
1.5 Análise do perfil transcricional (RNA-seq)	19
2. HIPÓTESE	20
3.OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS:	22
4.1 Linhagem celular de macrófago humano THP-1	22
4.2 Diferenciação da linhagem celular de monócito humano THP-1 em macrófago	22
4.3 Linhagem de <i>T. rubrum</i>	22
4.4 Co-cultivo de conídios germinados (CG) de <i>T. rubrum</i> em macrófagos humano.....	22
4.4.1 Preparação dos macrófagos.....	22
4.4.2 Preparação da Solução de conídios de <i>T. rubrum</i>	23
4.4.3 Co-cultivo com CGV e CGI de <i>T. rubrum</i> em linhagem celular de macrófago humano THP-1	23
4.5 Comprovação do co-cultivo por meio de microscopia eletrônica.....	24
4.6 Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos co-cultivados com CGV de <i>T. rubrum</i> pelo teste da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH).....	25
4.7 Quantificação de citocinas	25
4.8 Extração de RNA	27
4.9 Verificação da integridade do RNA.....	28
4.10 Construção da biblioteca de RNA e sequenciamento.	28
4.11 Análise dos dados de RNA-seq.....	31
4.12 Validação	31
4.12.1 Seleção dos genes.....	31
4.12.2 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	32
4.12.3 Síntese de cDNA.....	34

4.12.4	Eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores.....	34
4.12.5	Validação por PCR quantitativa (qPCR)	36
4.13	Comparação da resposta do co-cultivo de macrófagos humano THP-1 com <i>T. rubrum</i> e THP-1 estimulados LPS bacteriano	37
4.13.1	Linhagem celular de macrófagos humano THP-1 estimuladas com LPS.....	37
4.13.2	Expressão do gene que codifica o receptor do LPS (TLR4) em macrófagos THP-1	37
4.13.2	Viabilidade celular (LDH) dos macrófagos THP-1 estimulados com LPS	37
4.13.3	Avaliação da expressão gênica dos macrófagos THP-1 estimulados com LPS	38
4.13.4	Quantificação da IL-32	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Diferenciação de monócito THP-1 em macrófago	39
5.2	Co-cultivo de CGV e CGI de <i>T. rubrum</i> em linhagem de macrófago THP-1	40
5.3	Microscopia eletrônica	42
5.4	Ensaio com LDH para avaliar a viabilidade celular dos macrófagos THP-1 co-cultivados com CGV de <i>T. rubrum</i>	42
5.5	Quantificação de citocinas	43
5.6	Extração de RNA e análise da integridade.....	48
5.7	RNA-seq.....	48
5.7.1	Análise das funções gênicas.....	54
5.8	Validação do perfil de expressão	55
5.9	Comparação da resposta do co-cultivo de macrófagos humano THP-1 com <i>T. rubrum</i> e THP-1 estimulados com LPS bacteriano	60
5.9.1	Expressão do gene que codifica o receptor TLR4 e viabilidade celular dos macrófagos THP-1 estimulados com LPS.....	60
5.9.2	Avaliação da Expressão gênica de THP-1 estimulada com LPS	61
5.9.3	Interleucina 32.....	63
6	CONCLUSÃO	65
7	REFERÊNCIAS	67

1.INTRODUÇÃO

1.1 Dermatofitoses

As dermatofitoses são infecções fungicas causadas por fungos patogênicos que acometem animais e principalmente os seres humanos. Esta doença compromete cerca de 900 milhões de pessoas em todo o mundo (HAY, 2020), e são denominadas de dermatofitoses (GNAT *et al.*, 2019). Os fungos filamentosos causadores destas infecções possuem a capacidade de invadir estruturas queratinizadas, como pele, cabelos e unhas, utilizando este nutriente como fonte de energia (KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019).

As dermatofitoses são propagadas através do contato direto com o ser humano ou animal infectado, assim como indiretamente por fômites contaminados, sendo a caracterização clínica da doença dependente da espécie do fungo e do local anatômico acometido (PERES *et al.*, 2010). A nomenclatura dessa patologia inicia-se com a palavra *tineas*, seguida de seu local de acometimento, como por exemplo, *tinea corporis* para infecções no corpo e *tinea unguium* para infecções nas unhas (ACHTERMAN *et al.*, 2011; HUBE *et al.*, 2015).

Os fungos denominados de dermatófitos abrangem 52 espécies que degradam queratina, e são divididos em 9 gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Arthroderma*, *Lophophyton*, *Nannizia*, *Ctenomyces*, *Guarromyces* e *Paraphyton* (MERCER; STEWART, 2019). Dentre os fungos causadores de dermatofitoses em humanos, o *T. rubrum* (*Trichophyton rubrum*) é o principal causador de infecções cutâneas e em pés e unhas (ANTUORI *et al.*, 2019; PETRUCCELLI, M. F. *et al.*, 2020). Infecções causadas pelo dermatófito *T. rubrum* são mais comuns em humanos, devido ao potencial adaptativo do fungo (ZHAN *et al.*, 2018).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2019), os dermatófitos afetam cerca de 25% da população mundial (SAI *et al.*, 2019), sendo que 30% a 70% dos adultos são portadores assintomáticos dessas doenças. Estudos epidemiológicos realizados com estudantes universitários de São Paulo apresentaram a ocorrência 18,2% de dermatófitos nos casos analisados, sendo que destes, 80% dos isolados fúngicos foram caracterizados como *T. rubrum* (SIQUEIRA *et al.*, 2006).

Foi observado que em 268 casos positivos de dermatofitoses, que 252 eram provocados por *Trichophyton* (94%), sendo que a espécie *T. rubrum* foi o agente etiológico predominante (GOMES *et al.*, 2018). SOUZA *et al.*, 2010 avaliaram pacientes portadores de onicomicoses na cidade de Goiânia, localizada em Goiás, no Brasil, entre todas as espécies identificadas, *T.*

rubrum foi responsável por 25,6% das infecções. DE ALBUQUERQUE MARANHÃO *et al.*, 2019 também estudaram a epidemiologia das micoses em Alagoas (nordeste do Brasil), reconheceram que 17,1% eram causados por fungos filamentosos, destes 14,8% sendo do gênero *Trichophyton* e desses 3,3% da espécie *rubrum*.

1.2 Dermatofitoses profundas

As dermatofitoses são infecções prevalentemente superficiais, porém podem se tornar profundas quando associada ao mau estado geral de saúde do paciente (BONGOMIN *et al.*, 2017).

A interação patógeno-hospedeiro inicia através da aderência do fungo, seguido pela formação de hifas que podem se espalhar pelo tecido, liberando enzimas fúngicas e outros fatores patogênicos, que mobilizam os queratinócitos, destroem a barreira epidérmica e aumentam a proliferação do fungo. Consequentemente inicia-se a ativação da resposta imune do hospedeiro (KASPEROVA *et al.*, 2014). Sendo assim, genes envolvidos no processo de resposta a infecção fúngica são modulados, fatores de virulência fúngica são liberados e cascatas inflamatórias são acionadas (BRASCH, 2010).

Os pacientes com o sistema imunológico debilitado, geralmente sofrem com dermatofitoses profundas, embora essa infecção seja menos frequente, ela pode ser fatal. Ao estabelecer a infecção, este patógeno tem a capacidade de alcançar camadas profundas, como a derme e a hipoderme e se disseminam, através dos linfonodos, cérebro e corrente sanguínea (LANTERNIER *et al.*, 2013).

Essas infecções também são relatadas em pacientes com o sistema imunológico debilitado como: portadores do vírus HIV e diabetes mellitus (BRASCH, 2010; HUBE *et al.*, 2015; PERES *et al.*, 2010), demonstrando a importância do sistema imunológico no controle desta patologia. Existem relatos na literatura mostrando pacientes imunocomprometidos, com presença de abscessos dérmicos recorrentes ocasionados por fungos (TOUSSAINT; STICHERLING, 2019). PETRUCCELLI, M. F. *et al.*, (2020) descreveram alguns relatos de casos de infecções profundas, (tabela 1 com modificações) onde mostraram ser necessário um diagnóstico e tratamento prévio para a melhora e prognósticos dos pacientes.

TABELA 1: Relatos de casos de infecção profundas causadas por dermatófitos

Comorbidade	Sintomas	Referência
Vírus da hepatite C e cirrose hepática	Nódulos subcutâneos	(WARYCHA <i>et al.</i> , 2011)
Vírus da imunodeficiência humana (HIV)	Lesões atípicas, múltiplas ou extensas	(COSTA <i>et al.</i> , 2015)
Pacientes transplantados e em quimioterapia	Nódulos	(KERSHENOVICH <i>et al.</i> , 2017)
Histórico de diabetes mellitus	Nódulos palpáveis no tornozelo	(KIM <i>et al.</i> , 2016)
Paciente sem imunodeficiência, com histórico de onicomicose	Eritema, pápula e nódulos na área submandibular, pescoço e tórax	(SU <i>et al.</i> , 2017)
Uso de drogas imunossupressoras	Abscessos fúngicos	(DAI, Y.; XIA; SHEN, 2019)
Paciente sem imunodeficiência, hipertensão e angina	Manchas avermelhadas com secreção	(SEO <i>et al.</i> , 2019)
Infecção fúngica por 2 anos, onicomicose	Perda da visão	(ZHANG, MINGRUI <i>et al.</i> , 2019).
Histórico de trombose	Infecção persistente por 20 anos	(GU <i>et al.</i> , 2020)
Doença renal, hipertensão e diabetes mellitus tipo II	Infecções nas unhas progredindo para coxa, virilha e nádegas	(TROTIER <i>et al.</i> , 2020)
Deficiência da proteína CARD9	Extensas lesões crônicas e recorrentes	(NAZARIAN <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: Adaptado (PETRUCCELLI, M. F. *et al.*, 2020)

A proteína CARD9 está se destacando no processo de infecção profunda, onde desempenha um papel fundamental na sinalização da imunidade inata e adaptativa. Existe uma associação das infecções graves causadas por dermatófitos e a mutação da proteína CARD9 (PETRUCCELLI, M. F. *et al.*, 2020), levando várias consequências clínicas como: lesões cutâneas crônicas e de difícil tratamento paciente (AZEVEDO CELESTRINO *et al.*, 2021).

Devido problemática das infecções profundas a descoberta de novos medicamentos que podem contribuir no tratamento dessas infecções precisa de estudos adicionais. O desenvolvimento de uma vacina contra dermatofitose se faz cada vez mais necessária, visto a gravidade dos casos, sendo imprescindível a compreensão dos mecanismos imunológicos desta infecção (AL-KHIKANI; AYIT, 2021).

1.3 Resposta imunológica de *T. rubrum*

Acredita-se que o dermatófito *T. rubrum* é capaz de burlar a resposta imune inata da célula hospedeira ocasionando o não reconhecimento do patógeno pelo sistema de defesa, facilitando o processo infeccioso (HUANG *et al.*, 2015). Os dermatófitos tem a capacidade de alterar o seu transcriptoma em resposta às defesas naturais do hospedeiro. Invadindo

principalmente os tecidos queratinizados, causando infecções superficiais com potencial para ser tornarem crônicas e profundas (BURSTEIN *et al.*, 2020).

A produção de fatores inflamatórios e antimicrobianos é responsável pelo controle da infecção (NETEA *et al.*, 2008). Após vencer a primeira barreira de defesa, que é a pele, o microrganismo adentra o tecido e ativa a resposta imunidade inata. As células responsáveis por reconhecerem os patógenos no organismo são os monócitos e os neutrófilos presentes na circulação e os macrófagos nos tecidos infectados, sendo estes as principais células da resposta imune inata (BOYMAN; SPRENT, 2012). No tecido os macrófagos reconhecem, fagocitam e eliminam os microrganismos, sendo estimulados rapidamente em resposta ao contato dos patógenos (SURAM *et al.*, 2013) sendo os principais responsáveis pela produção de citocinas (NETEA *et al.*, 2004).

A inflamação é uma tentativa de proteção, na qual o organismo vai tentar eliminar o agente invasor. Esse processo inicia-se com a ativação de fosfolipases, que degradam os lipídios da membrana celular liberando ácido araquidônico e mediadores inflamatórios, como as citocinas (QUINTANS *et al.*, 2019).

As citocinas são um grupo amplo de proteínas de sinalização que são produzidas por células imunes em áreas lesadas, atuando nas células vizinhas ou nas próprias células que os produzem. Dentre as citocinas, podemos citar as interleucinas (IL) que também são proteínas produzidas e secretadas por células do sistema imune, que atuam na comunicação celular e no combate a infecção. Para melhor compreender a resposta inflamatória é preciso estudar a interação do fungo com seus receptores celulares (GOYAL *et al.*, 2018).

Os receptores toll-likes são moléculas de superfície presentes nas células de defesa do hospedeiro, eles são responsáveis pelo reconhecimento de estruturas microbianas os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), também são responsáveis por geração de sinais, que levam à produção de citocinas pro-inflamatórias essenciais para a ativação das respostas imunes inatas (KUNDU; BASU, 2006).

Durante a interação com o hospedeiro pode ocorrer o reconhecimento de moléculas altamente conservadas em fungos, como os β -glucanos, que são componentes da parede celular de fungos, como os dermatófitos. Eles são responsáveis por estimular a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Na dermatofitose superficial os fungos estimulam os queratinócitos a secretar citocinas para atraírem células inflamatórias, na infecção profunda, o β -glucano é reconhecido pelo receptor Toll-like e dectina 1 (TOKURA; KOBAYASHI;

KABASHIMA, 2008), os receptores de reconhecimento padrão (PRRS) são responsáveis pela detecção dos patógenos (HESSE-MACABATA *et al.*, 2019).

As citocinas pró-inflamatórias levam a ativação de macrófagos, realizando uma interação com as células fúngicas, desencadeando uma resposta inflamatória, favorecendo o recrutamento de outras células fagocíticas em uma situação *in vivo* (CONTI; GAFFEN, 2016).

1.4 Modelos de estudo patógeno-hospedeiro

Diante da problemática em relação as infecções causadas por *T. rubrum*, existem vários modelos biológicos que podem ser utilizados para simular a interação do patógeno com o hospedeiro, avaliando os perfis celulares e moleculares dessa interação. Encontramos na literatura os modelos utilizando queratina e elastina (BITENCOURT *et al.*, 2016), pedaços de pele humana (DE AGUIAR PERES *et al.*, 2010) e também porquinho da índia (SHIMAMURA; KUBOTA; SHIBUYA, 2012).

Nosso grupo de pesquisa padronizou a utilização de células de queratinócitos humanos (HaCat) para o desenvolvimento de projetos que envolvem o estudo da interação patógenos-hospedeiro. Foi avaliado a expressão de alguns genes fúngicos de *T. rubrum* co-cultivado em linhagem de queratinócitos humanos HaCat (simulação de infecção superficial), na presença de antifúngicos comerciais (terbinafina) e naturais (*trans*-chalcona e a α -Solanina) através de qPCR (KOMOTO *et al.*, 2015). Nesse trabalho, verificou-se que a *trans*-Chalcona reprimiu a expressão dos genes envolvidos no ciclo do glioxilato.

Em seguida, no sentido de compreender melhor essa interação foi realizado o perfil transcricional dos dois organismos simultaneamente, através do co-cultivo de *T. rubrum* com linhagem de queratinócitos, através da técnica de RNA-seq duplo (PETRUCELLI, M. F. *et al.*, 2018), como resultado também foi observado modulação de genes específicos do ciclo do glioxilato.

O estudo da infecção profunda teve início no nosso grupo através da publicação de CANTELLI *et al.*, (2017), utilizando o produto natural denominado licochalcona A, que apresentou acentuada atividade antifúngica contra *T. rubrum*, e provocou a repressão de genes codificadores de fatores de virulência como isocitrato liase, citrato sintase e malato sintase (enzimas da via do glioxilato). Além disso, este composto inibiu acentuadamente a atividade enzimática da isocitrato liase, principal enzima da via do glioxilato.

A ativação do ciclo do glioxilato pode ser considerada uma forma do patógeno burlar o sistema imunológico, pois sintetizam a glicose a partir de lipídios e outras fontes alternativas de carbono. Desta forma, esse ciclo contribui com a flexibilidade metabólica favorecendo a sobrevivência microbiana em nichos limitantes de nutrientes, como descrito nas infecção de *Candida albicans* (*C. albicans*) no interior de macrófagos (CHEAH; LIM; SANDAI, 2014). Dessa forma, acredita-se que o mesmo fenômeno biológico pode estar acontecendo em infecções causadas por *T. rubrum*.

1.5 Análise do perfil transcricional (RNA-seq)

No intuito de melhor compreender o processo de infecção profunda provocada por *T. rubrum*, pois o fungo consegue escapar do sistema imunológico e se tornar invasivo, realizamos o co-cultivo desse dermatófito com uma linhagem de macrófagos humanos THP-1. Nosso grupo de pesquisa já descreveu o perfil transcricional de microRNAs humanos envolvidos na infecção fúngica causados por *T. rubrum* (SEGURA *et al.*, 2020), porém ainda não foi descrito pela literatura científica o perfil transcricional de RNAm dessa interação através da técnica de RNA-seq.

O perfil transcricional por RNA-seq é uma ferramenta metodológica recente, utilizada para investigar os detalhes da interação de patógeno e células do sistema imunológico, permitindo uma triagem precisa e abrangente de expressão gênica (GATTO *et al.*, 2020). Essa técnica busca monitorar a expressão de genes permitindo uma visão molecular mais ampla de quais genes são modulados durante a interação de *T. rubrum* com macrófagos humanos THP-1.

Várias tecnologias vêm sendo desenvolvidas para a quantificação do transcriptoma, como por exemplo, técnicas de hibridação com bibliotecas de cDNA utilizando sondas marcadas com corantes fluorescentes na técnica de microarranjo. Entretanto, estas técnicas encontram limitações como por exemplo: necessidade de conhecimento prévio da sequência específica do genoma, dificuldade em análises de diferentes níveis de expressão e elevados níveis de ruídos por hibridação inespecífica (QIAN *et al.*, 2014; WANG, Z.; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

A análise de transcriptomas têm se tornado uma poderosa ferramenta para a identificação de padrões de expressão gênica de genes hipotéticos assim como também para a análise de perfis de expressão de ESTs (assemblies of expressed sequence tags). Fato que levou a necessidade do desenvolvimento de uma técnica mais aprimorada denominada de

sequenciamentos da nova geração, que permite maior leitura de sequencias de um genoma ou transcriptoma em um menor tempo (XU *et al.*, 2015).

O sequenciamento de nova geração do RNAm é uma técnica que permite mapear e quantificar diferentes transcriptomas ao mesmo tempo. Esta nova técnica apresenta várias vantagens em relação aos métodos de sequenciamento já existentes (WANG, Z.; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Atualmente foi aplicada para análises da interação patógenos-hospedeiro de vários microrganismos como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, ratos e células humanas (WANG, Z.; GERSTEIN; SNYDER, 2009), *Candida albicans* (MUNDODI *et al.*, 2021), *Aspergillus* (LIANG *et al.*, 2021), até mesmo com o *T. rubrum* (PETRUCCELLI, M. F. *et al.*, 2018; SEGURA *et al.*, 2020), entre outros microrganismos.

Considerando as vantagens desta técnica em relação a outras de sequenciamento, a análise por RNA-seq consiste em uma ferramenta inovadora e útil, no sentido de facilitar o entendimento dos mecanismos de infecção e das respostas celulares e descobrir novos alvos moleculares específicos para uma atuação mais eficaz dos antifúngicos existentes ou para o desenvolvimento de novas drogas.

2. HIPÓTESE

A interação de conídios de *T. rubrum* com linhagem de macrófagos humanos THP-1 pode modular a expressão gênica e alterar o perfil de citocinas pró-inflamatórias humanas.

O perfil de expressão dos genes validados no RNAseq é semelhante utilizando conídios germinados inativados ou vivos.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a infecção profunda provocada por *T. rubrum* do ponto de vista celular e molecular utilizando a ferramenta de co-cultivo em linhagem celular de macrófagos humanos THP-1.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Padronizar o co-cultivo da linhagem celular de macrófago humano THP-1 com CGV e CGI de *T. rubrum* e comprovar essa interação por microscopia eletrônica.
- b) Avaliar a viabilidade celular da THP-1 através da quantificação da liberação da lactato desidrogenase (LDH) durante o co-cultivo de CGV de *T. rubrum* em linhagem de macrófago humano.
- c) Avaliar a indução da resposta imune através da quantificação das IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12 e IL-17E durante o co-cultivo de CGV e CGI de *T. rubrum* em linhagem celular de macrófago humano THP-1.
- d) Construção da biblioteca de RNAm, sequenciamento de nova geração, análise dos dados.
- e) Validação dos genes selecionados por qPCR utilizando CGV e CGI de *T. rubrum* em linhagem celular de macrófago humano THP-1.
- f) A partir dos resultados obtidos na validação dos dados de RNA-seq comparar a resposta do co-cultivo da linhagem celular de macrófago humano THP-1 com *T. rubrum* e estimuladas com lipopolissacarideo (LPS) bacteriano.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Linhagem celular de macrófago humano THP-1

Foi utilizada a linhagem de monócito humano denominada de THP-1, linhagem celular leucêmica monocítica aguda, isolada de uma criança do sexo masculino de 1 ano. Esta linhagem foi adquirida comercialmente através no banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal com antibióticos (Penicilina-estreptomicina, na concentração de 100 unidades de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina e canamicina), mantida em estufa contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37° C.

4.2 Diferenciação da linhagem celular de monócito humano THP-1 em macrófago

Para diferenciar a linhagem de monócito humano THP-1 em macrófago, foi utilizado 12,5 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) por 24h. Após o intervalo de incubação, a linhagem THP-1 de monócitos que apresentava característica de cultivo de células em suspensão se tornou aderente à garrafa de cultivo, o que caracteriza a sua diferenciação em macrófagos (BENER *et al.*, 2016; MIRANDA; MCGUIRE; JOHNSON, 2002).

4.3 Linhagem de *T. rubrum*

Foi utilizada a linhagem sequenciada pelo Broad Institute denominada CBS 118892. O cultivo da linhagem foi realizado em meio de cultura Sabouraud Dextrose agar por 15 dias a 28° C, segundo os métodos previamente descritos por (FACHIN *et al.*, 2006).

4.4 Co-cultivo de conídios germinados (CG) de *T. rubrum* em macrófagos humano

4.4.1 Preparação dos macrófagos

Após a diferenciação dos monócitos em macrófagos, o meio de cultura contendo PMA foi descartado e foi adicionado novo meio sem PMA (RPMI com 10% de FBS e 1/1 de penicilina-estreptomicina a 5mg/mL e ciprofloxacina 5mg/mL). Os macrófagos foram mantidos neste meio de cultivo durante 24h em estufa de CO₂ 5% a 37 °C.

4.4.2 Preparação da Solução de conídios de *T. rubrum*

Para o preparo da suspensão de conídios, os micélios foram recolhidos com o auxílio de uma espátula estéril e inoculados em solução salina 0,9%, submetidos a vigorosa agitação para promover a desagregação dos conídios. Em seguida a solução foi filtrada em lã de vidro e a concentração dos conídios foi ajustada para 1×10^7 conídio/mL em hematímetro. A solução foi centrifugada a 1730g por 10min, em seguida os conídios foram adicionados em 50 ml de meio Sabourad líquido e foram incubados num agitador orbital por 7h para germinação dos conídios (CANTELLI *et al.*, 2017). Em seguida, a solução de CG foi centrifugada novamente e ressuspensa em salina. A solução foi usada para o co-cultivo utilizando os CGV e foi mantida a temperatura ambiente até o uso. Para inativação dos conídios, a solução foi mantida em banho-maria por 60 min à 56°C (CHAI *et al.*, 2009), em seguida, os CGI foram plaqueados em meio Sabourad ágar e cultivados por 72h a 28C para confirmar a inativação (SEGURA *et al.*, 2020).

4.4.3 Co-cultivo com CGV e CGI de *T. rubrum* em linhagem celular de macrófago humano THP-1

Após 24 h de cultivo da linhagem celular de macrófagos (já diferenciados com PMA) o meio de cultura RPMI foi descartado e foi adicionado novo meio RPMI, contendo os CGV e CGI de *T. rubrum*, proporção (1:10). As garrafas contendo os conídios vivos ou inativados foram mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 24 h. O procedimento de co-cultivo com os CGI foi resumidamente descrito na figura 1 conforme descrito por (SEGURA *et al.*, 2020).

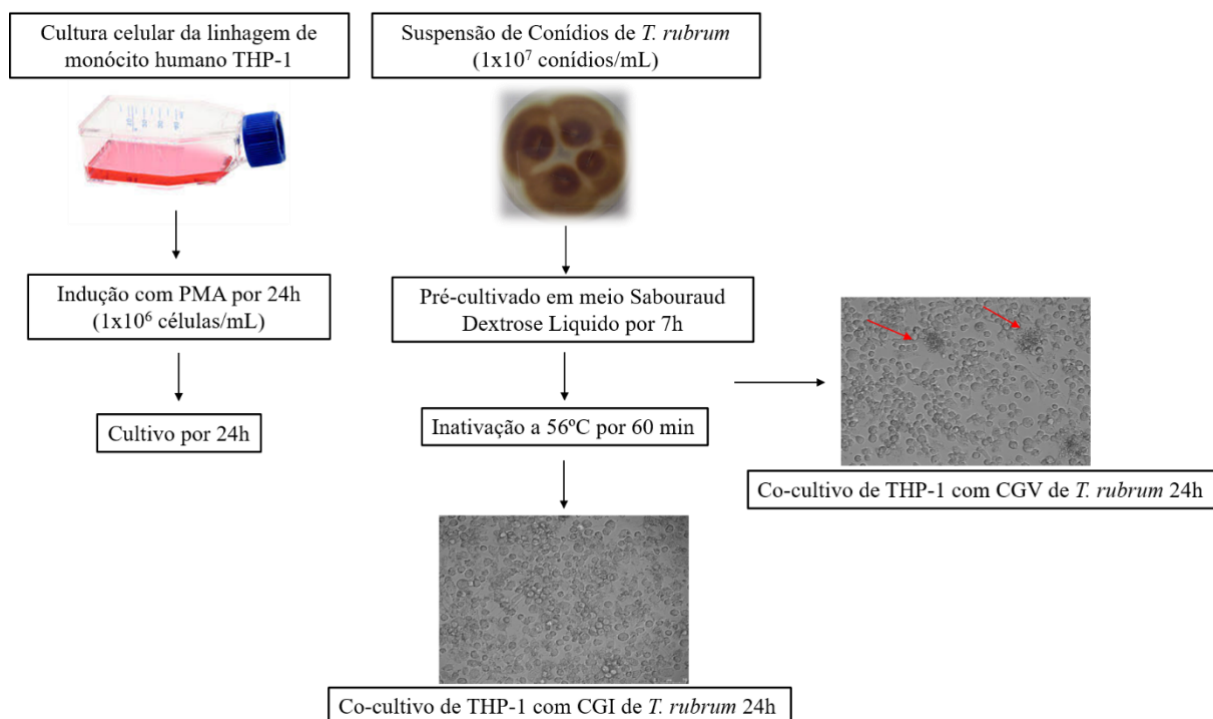


FIGURA 1: Co-cultivo de macrófagos com conídios germinados (CGV) e inativados pelo calor (CGI) de *T. rubrum*. As setas indicam o co-cultivo. Fonte: Adaptado (SEGURA *et al.*, 2020)

Após o período de incubação de 24 h, o sobrenadante do co-cultivo foi reservado para realizar os testes de LDH (descrito no item 4.6) e para o ensaio de ILs (descrito no item 4.7). Além disso, as células de THP-1 resultantes do co-cultivo de macrófagos com *T. rubrum* aderidas na garrafa de cultura celular, foram utilizadas para a extração de RNA utilizando o reagente Quiazol (descrito no item. 4.8).

4.5 Comprovação do co-cultivo por meio de microscopia eletrônica

A comprovação do processo de interação dos CGV de *T. rubrum* na cultura de macrófagos humanos no tempo de 24h foi realizada em placas de 6 poços. A microscopia eletrônica foi realizada utilizando um microscópio eletrônico JEOL JEM 100CXII no Laboratório de Microscopia Eletrônica Multiusuário do Departamento de Biologia Celular e Molecular (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

4.6 Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos co-cultivados com CGV de *T. rubrum* pelo teste da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)

Para avaliar a viabilidade celular da linhagem de macrófagos durante o co-cultivo com os CGV de *T. rubrum*, foi realizado o teste de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (SANTIAGO *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2006), utilizando o kit TOX7 (Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo do fabricante.

A atividade enzimática foi quantificada a fim de fornecer um valor respectivo à liberação de LDH humana no sobrenadante consequente de danos e/ou permeabilização da membrana. A técnica é baseada na redução de NAD, cofator na conversão de lactato a piruvato pela LDH. O NADH resultante é utilizado na transformação estequiométrica de um corante de tetrazólio, composto que denota atividade da LDH colorimetricamente (BORTOLOTTI *et al.*, 2017; GROSSE; EVJE; SYVERSEN, 2012).

Para o ensaio de LDH, foram recolhidos 50 µL do sobrenadante de cada amostra (macrófago humano THP-1 e co-cultivo de CGV de *T. rubrum* com macrófagos THP-1 nos tempos de 5, 8, 12, 24 e 48 h (em seguida foram transferidos para uma placa de 96 poços).

O controle positivo foi o cultivo de macrófagos THP-1 tratados com Triton X-100 a 1% e o controle negativo foi o meio de cultura RPMI 1640. Nas placas contendo os sobrenadantes foram adicionados 100 µL/poço de uma mistura contendo os três reagentes do kit TOX7 no mesmo volume: solução de substratos, preparação de cofatores e solução corante. A placa foi protegida da incidência direta de luz e incubada à temperatura ambiente por 30 min. A reação foi finalizada pela adição de 15 µL de HCl 1N em cada poço. Finalmente, foram determinadas as absorbâncias das placas por meio de leitor universal de microplacas (Multiskan FC Thermo scientific) a 490nm.

A partir dos valores de absorbância foram calculadas os valores das médias, as quais foram utilizadas para o cálculo da equação: “Porcentagem de LDH liberado = [(média de absorbância de poços teste - média de controle negativo) / (média de controle positivo - média de controle negativo)] x 100”, segundo (GROSSE; EVJE; SYVERSEN, 2012). O experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.

4.7 Quantificação de citocinas

A quantificação de citocinas foi realizada através da coleta do sobrenadante do co-cultivo de macrófago THP-1 com CGV e CGI de *T. rubrum*. Como controle negativo foi

utilizado o cultivo de macrófagos THP-1. A quantificação foi realizada em duplicata em dois experimentos independentes com o kit ELISA Development Mini TMB EDK (PeproTech), segundo recomendações do fabricante e como descreve (BOMFIM *et al.*, 2017).

Inicialmente, realizou-se a quantificação da IL-6 (limite de detecção 6-2000 pg/mL) das células de macrófagos (THP-1) e do co-cultivo de CGV e CGI de *T. rubrum* em 3 diferentes tempos de co-cultivo (3, 6 e 24h), no intuito de confirmar a ativação do sistema imunológico, determinar o melhor tempo de cultivo para fazer a quantificação das outras citocinas e também para realizar o RNAseq. A tabela 2 mostra o limite de detecção de cada IL.

TABELA 2: Limite de detecção das ILs

ILs	Limite de detecção (pg/mL)
IL-6	6-2000
IL-1 β	6-750
TNF- α	16-2000
IL-17E	16-4000
IL-8	1-150
IL-2	31-8000
IL-12	31-8000

Preparamos a solução de lavagem *Wash Buffer*, que consiste na diluição de 0,05% Tween 20 em PBS 1x. Também foi realizada a preparação do diluente, sendo feita através da diluição de 0,1% BSA e 0,05% de Tween 20 em PBS 1x e do *Block Buffer* contendo 1% de BSA em PBS 1x.

Primeiramente depositou-se o anticorpo de captura em placa de 96 poços e incubou 12-16h, para aderência desse anticorpo na placa e, posteriormente ligação ao antígeno das amostras ou do padrão. Na manhã seguinte foi realizado a lavagem com *Wash Buffer* para remover os analitos não ligantes a placa do anticorpo de captura. Em seguida adicionou o *block Buffer* por 1 h para bloquear inespecificidade. Novamente a placa foi lavada, em seguida o padrão foi adicionado em diferentes concentrações no intuito de obter uma curva padrão e consequentemente, uma equação para encontrar as concentrações das amostras testadas, que também foram adicionadas nos outros poços, eles foram incubados por 2 h. Após esse período houve uma nova lavagem e adicionou o anticorpo de detecção, que vai se ligar ao complexo que foi formado pelo anticorpo de captura e as amostras ou padrão, esse anticorpo é conjugado com peroxidase, que juntamente com streptavidina terá atividade no substrato que é o TMB, a

placa for incubada por mais 2h a temperatura ambiente. Novamente os poços foram lavados e streptavidina foi adicionada seguindo-se incubação por mais 30 minutos sob a proteção de luz direta. Posteriormente os poços receberam a última lavagem e adicionou o TMB (substrato), também na ausência da luz direta, observamos o aparecimento da coloração azul por no máximo 20min, seguidamente foi adicionado solução para interromper a reação (HCL1 M). Foi feita a leitura da placa em um leitor universal de microplacas (Multiskan FC Thermo scientific) no comprimento de onda de 450nm e 620nm (onde a leitura em 620nm é o valor de correção, que foi subtraído de 450nm) o valor resultante dessa subtração foi utilizado para a determinação da concentração das ILs secretadas (pg/mL), a partir da curva padrão gerada.

4.8 Extração de RNA

A extração de RNA do co-cultivo de CGI de *T. rubrum* com macrófagos THP-1 (item 4.4) foi realizada utilizando o Kit miRNeasy® Mini Kit (50) Quiagen (Germany), conforme recomendações do fabricante.

Resumidamente, adicionou-se 700 µL de Quiazol®, para lisar a membrana das células, posteriormente foram acrescentados 140 µl de clorofórmio em cada amostra por 3min, em seguida houve uma centrifugação por 15min a 4°C a 12000G. A partir dessa centrifugação foi possível observar a divisão de fases havendo a fase aquosa (transparente, na parte de cima) aqui se encontra o RNA e a fase orgânica (branca, na parte de baixo). A fase aquosa foi coletada e acrescida de etanol, adicionada na coluna do kit e novamente centrifugada a 22°C por 1min a 8000g. Em seguida adicionou-se os tampões de lavagem RWT e RPE, sendo primeiramente 700µL de Buffer RWT, e as amostras foram novamente centrifugadas. Acrescentou-se 500µL de Buffer RPE, e novamente houve a centrifugação. Foram acrescentados mais 500µL de Buffer RPE na coluna, e novamente centrifugados a 22°C por 2min a 8000G. Todo o resíduo gerado após a centrifugação ficou no tubo coletor, sendo ele descartado.

Por fim, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor, o RNA foi eluído em RNA-free water. A concentração de RNA das amostras foi quantificada espectroscopicamente em aparelho nanofotômetro (IMPLAN).

Todas as amostras foram tratadas com DNase (Sigma Aldrich) para remover qualquer contaminação genômica por DNA.

4.9 Verificação da integridade do RNA

Foi realizado um gel denaturante (formaldeído) para verificar a integridade dos RNAs e a presença de DNA. Para confirmar e avaliar a integridade, o RNA foi submetido ao bioanalisador (GE Healthcare, Life Sciences), no qual o RNA foi avaliado através da escala de RIN (RNA Integrity Number), neste as amostras devem ter o RIN > 7 para comprovar a qualidade adequada do RNA para sequenciamento. Este procedimento foi realizado pela pesquisadora técnica Kamila Chagas Peronni em colaboração com o Prof Dr Wilson Araújo da Silva Junior do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática no Hemocentro de Ribeirão-Preto.

4.10 Construção da biblioteca de RNA e sequenciamento.

Após confirmar que os RNAs estavam integros e com a qualidade ideal, as bibliotecas de cDNA foram construídas em triplicata para cada condição (macrófago THP-1, co-cultivo de THP-1 com CGI de *T. rubrum*) e o sequenciamento foi realizado pela pesquisadora técnica Kamila Chagas Peronni em colaboração com o Prof Dr Wilson Araújo da Silva Junior do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática no Hemocentro de Ribeirão-Preto (serviço tercerizado) utilizando o sequenciador Illumina NextSeq 500 Sequencing System, com o kit Illumina NextSeq, e as bibliotecas foram realizadas em *paired end*, conforme descrito por (PETRUCCELLI, M. F. *et al.*, 2018).

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o sequenciamento em larga escala denominado RNA-seq. A maioria dos reagentes utilizados faz parte do kit de preparo da amostra para RNA-seq (TruSeq RNA Sample Prep v.2, Illumina Inc.). O primeiro passo dessa técnica é purificar o RNA mensageiro (RNAm), caracterizado por conter sequências de poliadenina (poli A+) na porção 3'. A partir de 0,1-1µg de RNA total, o RNAm foi purificado, utilizando-se sequências complementares de timinas (poli T) ligadas a esferas magnéticas. Durante a segunda eluição, o RNA poliA+ isolado é fragmentado e preparado para a síntese de DNA complementar (cDNA). O cDNA é obtido por meio de transcrição reversa, utilizando hexâmeros randômicos e a enzima Superscript II® (Invitrogen, Carlsbad, CA), gerando assim a primeira fita de DNA complementar (cDNA). Em seguida, a fita de RNAm que gerou a primeira fita de cDNA foi removida e sintetizada uma segunda fita de cDNA. Nessa reação utilizamos esferas paramagnéticas (AMPure XP beads, Beckman Coulter) para purificar o cDNA, separando-o do restante de reagentes e enzimas utilizados na reação. Em seguida, as

extremidades do cDNA foram removidas utilizando-se o mix End Repair (Illumina) que contém uma 3-5' exonuclease, capaz de remover as bases excedentes nas extremidades 3', para obtenção de fragmentos de pontas coesas e também de preencher os espaços vazios nas extremidades 5'. Depois disso, foi adicionada uma única base "A" (adenina) às extremidades 3' do cDNA. Essa base vai ajudar na próxima etapa, de ligação dos adaptadores, pois estes possuem uma base T (timina) complementar ao A nas suas extremidades 3'. Além de auxiliar na ligação dos adaptadores, a adição da base A ao cDNA evita a formação de concatâmeros de cDNA. Múltiplos adaptadores podem então ser ligados às extremidades do cDNA, utilizando-se enzima ligase e tampões apropriados contidos no kit TruSeq. Depois da ligação dos adaptadores, foi feita uma PCR para enriquecer de forma seletiva os fragmentos de cDNA aos quais foram ligados os adaptadores às duas extremidades e para amplificar a quantidade de DNA na biblioteca. São usados *primers* complementares aos adaptadores na PCR, que deve ser feita com poucos ciclos de amplificação para evitar amplificação tendenciosa (*bias*). Depois da amplificação, a biblioteca está pronta e o tamanho dos fragmentos formados é avaliado utilizando-se o equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies), que faz uma eletroforese digital em um chip (DNA-1000). O tamanho dos fragmentos deve ser de aproximadamente 260 pb. Também é muito importante a quantificação dos fragmentos formados na biblioteca e para isso recomenda-se uma quantificação absoluta por qPCR, utilizando-se o kit comercial KAPA SYBR FAST (KAPA Biosystems), que contém uma curva-padrão e todos os demais reagentes. Após a quantificação precisa, as bibliotecas foram diluídas e 1,8 pM de cada uma foram usadas para desnaturação, clusterização em uma *flow cell* e sequenciamento no equipamento *Illumina NextSeq 500 Sequencing System* utilizando o *Kit High Output NextSeq 500 V2*.

A clusterização consiste de 3 etapas: 1) amplificação dos clusters, 2) linearização, bloqueio e 3) hibridação dos primers. Durante a geração dos clusters, cada fragmento de cDNA das bibliotecas é incorporado à superfície da *flow cell* (suporte sólido), que foi coberta com oligonucleotídeos complementares aos adaptadores, usados para amplificar o cDNA de forma isotérmica, dando origem aos clusters, ou seja, grupos ou colônias de fragmentos ligados a *flow cell*. A linearização é uma reação feita para retirar os adaptadores para assegurar que a hibridação e o sequenciamento ocorram somente em uma das fitas de cada cluster. A etapa de bloqueio refere-se a neutralização das hidroxilas presentes nas extremidades 3' dos clusters linearizados, para evitar a adição de substratos de fluoróforos ou qualquer outro segmento que não seja o *primer* de sequenciamento. Uma desnaturação garantirá a formação de templates de fita simples, que são hibridados aos primers de sequenciamento. Nesse ponto, a biblioteca estará

pronta para o sequenciamento, na configuração *paired-end* 2 x 150bp (de cada extremidade dos transcritos serão sequenciados 150 nucleotídeos), baseado na tecnologia Solexa ou SBS (“Sequencing-by-Synthesis”), que permite a leitura massiva e paralela (simultânea) da sequência de nucleotídeos de milhões de fragmentos de DNA capturadas das regiões codificadoras. A tecnologia SBS baseia-se na terminação da síntese da cadeia de DNA após a detecção do sinal fluorescente. Por terminação entende-se a clivagem do nucleotídeo marcado já detectado que possibilita a adição do próximo nucleotídeo. Os eventos de incorporação e clivagem do nucleotídeo marcado e modificado ocorrem sucessivas vezes, dentro da *flow cell*, permitindo, desta forma, a leitura base a base e ao mesmo tempo elimina possíveis erros em sequências com repetições da mesma base (regiões homopoliméricas).

4.11 Análise dos dados de RNA-seq

As análises foram realizadas pelo Prof Dr Pablo Sanches do Departamento de Genética da FMRP-USP. Os dados brutos obtidos usando RNA-seq foram filtrados para controle de qualidade das leituras com a ferramenta FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e aparados usando Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) para remover adaptadores e outras seqüências específicas do Illumina das leituras. As leituras de extremidade emparelhada aparadas de cada amostra foram então alinhadas ao genoma humano de hg38 usando o alinhador STAR (DOBIN *et al.*, 2013). As contagens de leitura no nível de genes foram quantificadas usando o parâmetro "-quantMode GeneCounts" da STAR. A análise da expressão diferencial foi realizada com o pacote DESeq2 Bioconductor (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). O limiar de valor p ajustado de Benjamini e Hochberg para denotar significância estatística das alterações nos níveis de expressão de um determinado gene foi definido como 0,05, com uma variação de $\pm 1,0$ considerada como um nível significativamente alterado de abundância de transcrição. Os genes acima desses limiares de requisitos foram referidos como genes diferencialmente expressos (DEG). A análise de enriquecimento GO para os DEG foi realizada usando a ferramenta de análise Funcional Enriquecimento FunRich (<http://www.funrich.org/>).

4.12 Validação

4.12.1 Seleção dos genes

Baseados nos genes mais modulados e pela categorização funcional escolhemos os genes para serem validados por qPCR, sendo a maioria responsáveis pela resposta imunológica, pois buscamos compreender a resposta dos macrófagos humanos THP-1 estimulados com os CGI de *T. rubrum*. Para auxiliar a escolha desses genes e encontrar suas funções utilizamos o site (Genes Cards, <https://www.genecards.org/>). Os genes escolhidos foram: CRLF2, MMP10, ANKRD1, CCL24, SLC43A2, CSF1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8 e IL-32 (induzidos) e S1PR1, TLR8, TLR7, CD1D e FCGBP (reprimidos).

4.12.2 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Após a seleção dos genes os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando os seguintes sites:

NCBI, nucleotides: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>, para encontrar a sequência dos genes.

IDT: <https://www.idtdna.com>, para desenhar os primers.

Reverse complement: <http://reverse-complement.com/>, para realizar a sequência reversar.

Todos os oligonucleotídeos iniciadores com suas sequencias e tamanhos estão sendo demonstrados na tabela 3, sendo que β - actina e GAPDH foram os genes normalizadores (constitutivos).

TABELA 3: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para a qPCR. Forward (F) e reverse (R)

GENE	SEQUÊNCIA	TAMANHO DO FRAGMENTO (pb)
CRLF2 NM_001012288.2	F: TGAGATTTTCGTGGCATCAG R: TTCTATGGTGACGTTGCAGG	147
MMP10 NM_002425.3	F:GGAGTTGAGCCTAAGGTTGATG R: TCGCCTAGCAATGTAACCAG	145
ANKRD1 NM_014391.2	F:GGTGAGACTGAACCGCTATAAG R: GGCTGTCTGAATATTGCTTTGG	140
CCL24 NM_002991.2	F: TTCTGTTCCCTTGGTGTCTGTG R: CACTCGGTTCTCAGGAATTCTC	109
SLC43A2 NM_001284498.1	F: GGGCTTTTACTCCTACCTGTG R: AATTTAGCATCTCGTCCTGGG	140
CSF1 NM_000757.6	F: CGCTTCAGAGATAACACCCC R: TCATAGAAAGTTCGGACGCAG	128
CXCL1 NM_001511.3	F: AACCGAAGTCATAGCCACAC R: GTTGGATTTGTCACTGTTTCAGC	109
CXCL2	F: AACCGAAGTCATAGCCACAC	116

NM_002089.4	R: TCTGGTCAGTTGGATTTGCC	
CXCL3	F: AACCGAAGTCATAGCCACAC	105
NM_002090.2	R: GTGCTCCCCTTGTTTCAGTATC	
CXCL8	F: TCCTGATTTCTGCAGCTCTG	138
NM_000584.4	R: GTCCACTCTCAATCACTCTCAG	
IL-32	F: AAACCTGCTTATACTTCCCTGG	138
NM_001012631.2	R:CTTTATACATCACCCAGTCTCAGG	
S1PR1	F:GGGAAGGGAGTATGTTTGTGG	127
NM_001400.4	R:AGGAAGAGGCGGAAGTTATTG	
TLR8	F: TGGTTCCTGTGAGTTATGCG	139
NM_016610.3	R: CACATATTTGCCACCGTTTG	
TLR7	F: TTCCTAAAACCTCTGCCCTGTG	141
NM_016562.4	R: TGTGGTTAATGGTGAGGGTG	
CD1D	F: TCATTGTGGGCTTTACCTCC	148
NM_001766.3	R: TTCAATTCCTGAGCAGACCAG	
FCGBP	F:GTGACGTTGACTCCAAACAAG	83
NM_003890.2	R: ACGGACACAGATGCTAACTTC	
β-actina	F:GTTGCGTTACACCCTTTCTTG R:TGCTGTCACCTTCACCGTTC	(DAI, Z. J. <i>et al.</i> , 2012)
GAPDH	F:AATCCCATCACCATCTTCCAG R:GAGCCCCAGCCTTCTCCAT	(MA <i>et al.</i> , 2015)
TLR4	F: 5'-TCTACAAAATCCCCGACAACC-3' R: 5'- TGTCTGGATTTACACCTGG-3'	143

Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela Sigma Aldrich.

4.12.3 Síntese de cDNA

Para realizar a conversão de RNA em cDNA utilizamos 1 µg do mesmo RNA usado para o RNA-seq. Utilizamos o kit Applied Biosystems (cidade de Foster, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e conforme descreve a tabela 4:

TABELA 4: Concentração dos reagentes para a síntese do cDNA

10X RT Buffer	2µl
10x RT Randon primers	2µl
dNTP Mix 100 mM	0,8µl
Multi Scribe Reverse Transcriptase	1 µl
Volume Total: 20 µL	

Abaixo é mostrado os parametros para conversão do cDNA:

1°: 25°C-10 min

2°: 37°C-2h

3°: 85°C-5min

Em seguida os cDNAs foram armazenado no-80°C.

4.12.4 Eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores

Todos os oligonucleotídeos iniciadores foram analisados para verificar sua eficiência através de uma curva padrão. Para esse fim, os cDNAs das amostras de THP-1 foram diluídos em quatro concentrações seriadas (1, 500, 250 e 125µg) e cada par de oligonucleotídeos inicializadores foi diluído nas concentrações de 50, 70 e 100nM. As concentrações ideais são aquelas cuja eficiência ficou entre 90 e 110%.

A eficiência de todos os oligonucleotídeos iniciadores foi realizada por qPCR, utilizando o kit Sybr Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma), nas condições recomendadas

pelo fabricante. Foi também realizada uma curva de dissociação. Em todas as reações foi utilizado o corante ROX para normalizar o sinal de fluorescência (tabela 5).

TABELA 5: As reações foram feitas da seguinte forma, para os oligonucleotídeos iniciadores de 50/70/100 nM

2x JumpStart <i>Taq</i> ReadyMix	12,5 µL
Reference Dye**	0,5 µL
PrimerFWD(1µM)	50/70/100nM
PrimerREV(1µM)	50/70/100nM
cDNA	1 µL
Água qsp	25 µL

Todas as reações foram feitas em triplicata, com três experimentos independentes. Os experimentos foram realizados utilizando o aparelho Mx QPCR da Stratagene, software MxPro.

Abaixo seguem os parâmetros de ciclagem das reações:

1° ciclo: 94°C – 10 min; desnaturação

2° ciclo: 94°C – 2 min; (40 ciclos)

3° ciclo: 60°C – 1 min;

4° ciclo: 72°C – 1 min

5° ciclo: Curva de dissociação que se baseia em: 95°C-1 min; 55°C-30s e 95°C-30s, para verificar a amplificação de um único produto.

Equação de Quantificação Relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$CT = \Delta\Delta(Ct_{goi} - Ct_{norm})_{unknown} - (Ct_{goi} - Ct_{norm})_{calibrador}$

As eficiências e as concentrações dos oligonucleotídeos inicializadores estão demonstradas na tabela 6.

TABELA 6: Eficiência e concentração dos primers

Eficiência (%)	Concentração nM
----------------	-----------------

<u>Up-regulated</u>		
CRLF2	96,5	50
MMP10	101,8	70/100
ANKRD1	93,2	100
CCL24	99,5	100
SLC43A2	90,9	70
CSF1	103,8	50/70
CXCL1	94,3	50/70
CXCL2	108,1	100
CXCL3	92,2	100
CXCL8	105,2	50
IL-32	93,1	40/50
<u>Down-regulated</u>		
S1PR1	99,3	50/70
TLR8	108,1	70
TLR7	104,4	100
CD1D	92,7	70
FCGBP	97,3	70

4.12.5 Validação por PCR quantitativa (qPCR)

A validação dos genes foi realizado por qPCR conforme descrito no item 4.12.4, porém para cada gene analisado incluímos dois genes normalizadores (β -actina e GAPDH) e um branco que denominou-se NTC (Non-Template-Control) e que no nosso caso foi somente as células de macrófago THP-1.

Os resultados são relatados como a média \pm desvio padrão em triplicata. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação entre as técnicas qPCR e RNA-seq.

Também foi realizado o qPCR do co-cultivo com os CGV de *T. rubrum* no intuito de verificar se existe alguma diferença na resposta de expressão gênica.

Os experimentos foram realizados utilizando o aparelho Mx QPCR da Stratagene, software MxPro, e os cálculos de quantificação relativa foram gerados conforme descreve o item 4.12.4.

4.13 Comparação da resposta do co-cultivo de macrófagos humano THP-1 com *T. rubrum* e THP-1 estimulados LPS bacteriano

4.13.1 Linhagem celular de macrófagos humano THP-1 estimuladas com LPS

Com o objetivo de verificar se os genes validados encontrados no RNA-seq também possuem atividade nos componentes bacterianos, os macrófagos humanos THP-1 foram estimulados com LPS (Sigma-Aldrich). A preparação dos macrófagos foi semelhante ao item 4.4.1. Porém na última etapa foi adicionado o meio RPMI sem antibióticos e com diferentes concentrações de LPS (5 µg/mL, 1 µg/mL, 500ng/ml e 250ng/ml) e diferentes tempos (3, 6, 9 e 24h) conforme descrito por (CHANPUT *et al.*, 2010; DE CAMARGO PEREIRA *et al.*, 2013). Em seguida os macrófagos THP-1 com as diferentes concentrações de LPS foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Somente os macrófagos THP-1 foram utilizados como controle.

4.13.2 Expressão do gene que codifica o receptor do LPS (TLR4) em macrófagos THP-1

Foi realizada a avaliação da expressão gênica do receptor padrão que reconhece LPS (TLR4) para verificar se as concentrações e os tempos de estimulação com LPS foram suficientes para ativar o receptor. É conhecido que o TLR4 é amplamente expresso e funciona no reconhecimento de produtos microbianos (WANG, M. *et al.*, 2011). Ele é um membro importante da família TLR e é altamente expresso em macrófagos e reconhece LPS presente em bactérias Gram negativas (GLASS *et al.*, 2010).

4.13.2 Viabilidade celular (LDH) dos macrófagos THP-1 estimulados com LPS

Para avaliar se o LPS alterou a viabilidade celular dos macrófagos, realizamos a quantificação de LDH. O ensaio foi realizado da mesma forma como descrito no item 4.6.

4.13.3 Avaliação da expressão gênica dos macrófagos THP-1 estimulados com LPS

Os genes validados no co-cultivo com *T.rubrum* descritos no item 4.12.2 (tabela 2) também foram utilizados para verificar se há diferença de modulação gênica nos macrófagos THP-1 estimulados com LPS.

4.13.4 Quantificação da IL-32

Após verificarmos a indução da expressão do gene da IL-32 no RNA-seq durante o co-cultivo de THP-1 com CGI e a validação confirmar esse dado obtido, quantificamos a liberação da IL-32 em nível de proteína, através do teste de elisa. A quantificação da IL-32 também foi realizada nos macrófagos THP-1 estimulados com LPS. O kit utilizado foi R&D (limite de detecção 78,1-5000 pg/mL) seguindo as recomendações do fabricante, sendo que o protocolo é semelhante ao descrito no item 4.7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diferenciação de monócito THP-1 em macrófago

Após o tratamento com 12,5 ng/ml de PMA, observamos a diferenciação celular dos monócitos THP-1 em macrófagos (figura 2). Os monócitos são células em suspensão e possuem formato arredondado, quando eles se diferenciam em macrófagos se caracterizam pela aderência celular e adquirem o formato mais alongado.

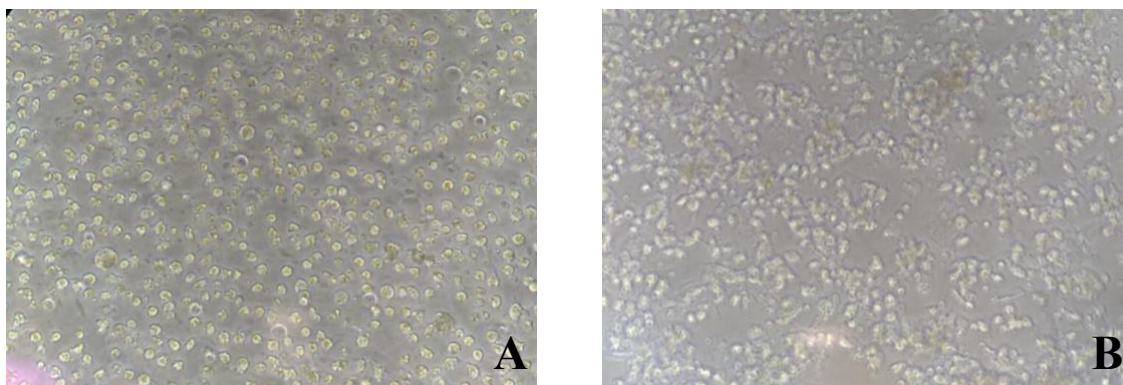


FIGURA 2: Linhagem de monócitos THP-1 em suspensão (A). Linhagem de monócitos diferenciados em macrófagos com 12,5ng/ml de PMA, aderentes (B)

A linhagem de monócitos humano THP-1 é utilizada como modelo experimental *in vitro*, para estudos com interação de patógenos com hospedeiros e doenças inflamatórias em macrófagos humanos (HJORT *et al.*, 2003). Depois da diferenciação, essa linhagem celular se comporta como macrófagos derivados de monócitos nativos (KOHLI, 1991). Ambos tipos celulares possuem uma similaridade metabólica e morfológica, uma vez que a linhagem THP-1 pode ser induzidas em macrófagos por meio da utilização do forbol 12-miristato 13- acetato (PMA), provocando a diferenciação de monócitos em macrófagos (DAIGNEAULT *et al.*, 2010), onde acontece a ativação da proteína quinase C, que é semelhante à diferenciação que acontece naturalmente nos macrófagos humanos (CAO *et al.*, 2014)

A análise da expressão do marcador molecular humano, CD14, foi necessária para comprovar que a linhagem THP-1 é, verdadeiramente, monócitos (resultados não mostrados). Visto que dados da literatura mostraram que CD14 é altamente expressa em monócitos e principalmente em macrófagos, mas, não são encontradas em células dendríticas (STUART; EZEKOWITZ, 2005).

5.2 Co-cultivo de CGV e CGI de *T. rubrum* em linhagem de macrófago THP-1

Observou-se que após o período de 24h de co-cultivo com os CGV de *T. rubrum*, havia alguns conídios, tubos germinativos e formação de hifas característicos do dermatófito (figura 3). Esses dados estão de acordo aos já foram publicados pelo nosso grupo de pesquisa, em que realizou-se o co-cultivo com queratinócitos humanos por 24h (CANTELLI *et al.*, 2017; KOMOTO *et al.*, 2015; PETRUCELLI *et al.*, 2018).

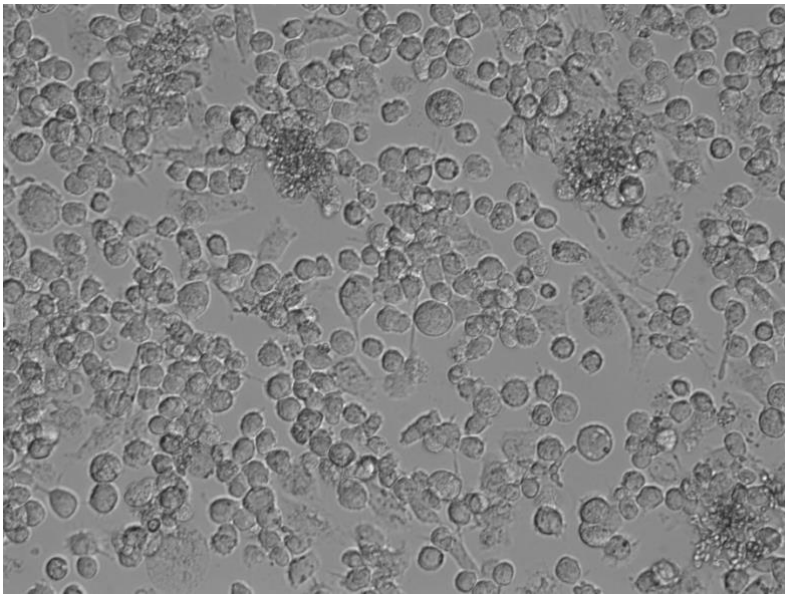


FIGURA 3: Co-cultivo de CGV de *T. rubrum* em linhagem de macrófago humano THP-1 por 24h. Microscopia de fluorescência leica dmi 6000

Também foi realizado o co-cultivo de macrófagos THP-1 com os CGI de *T. rubrum*, na figura 4 mostramos que o tempo e a temperatura utilizadas foram adequadas para inativar esses CG, pois não foi possível observar o crescimento de *T. rubrum* nas placas de meio Sabouraud (figura 4B).

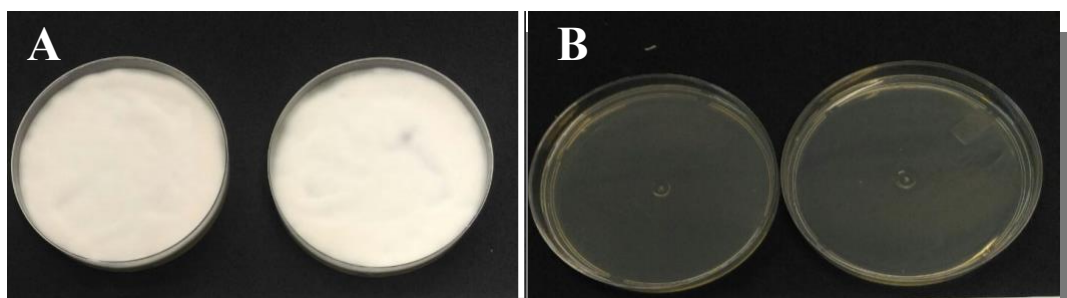


FIGURA 4: Comprovação da inativação dos CG de *T. rubrum* pelo calor. Controle positivo (A), nenhum crescimento fúngico (B)

Utilizamos os CGI, pois o foco do trabalho foi analisar somente a resposta humana (macrófagos) durante o co-cultivo com *T. rubrum*. Os CG mesmos inativados apresentam proteínas de parede preservadas que podem ser utilizadas para estimular as células de macrófagos e ativar o sistema imunológico (CHEN *et al.*, 2015; DAS GUPTA *et al.*, 2014). Caso contrário, seria necessário realizar um sequenciamento duplo de RNA dos dois tipos de organismos ao mesmo tempo, como já foi realizado por (PETRUCCELLI, *et al.*, 2018). A diferença do tamanho do genoma de *T. rubrum* em relação ao tamanho enorme do genoma humano foi uma dificuldade observada durante a análise dos dados fúngicos desse sequenciamento de RNA duplo.

A inativação de microrganismos é uma estratégia muito utilizada para a produção de vacinas. Recentemente vem sendo aplicada na vacina contra o vírus SARS-CoV₂ para o controle da pandemia causada pelo COVID-19 (LI *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2020) .

Na figura 5, podemos observar o co-cultivo de CGI de *T. rubrum* em linhagem de macrófagos humano THP-1. No co-cultivo com CGV observamos os conídios e hifas bem nítidas, porém quando eles foram inativados observamos somente fragmentos celulares fúngicos.

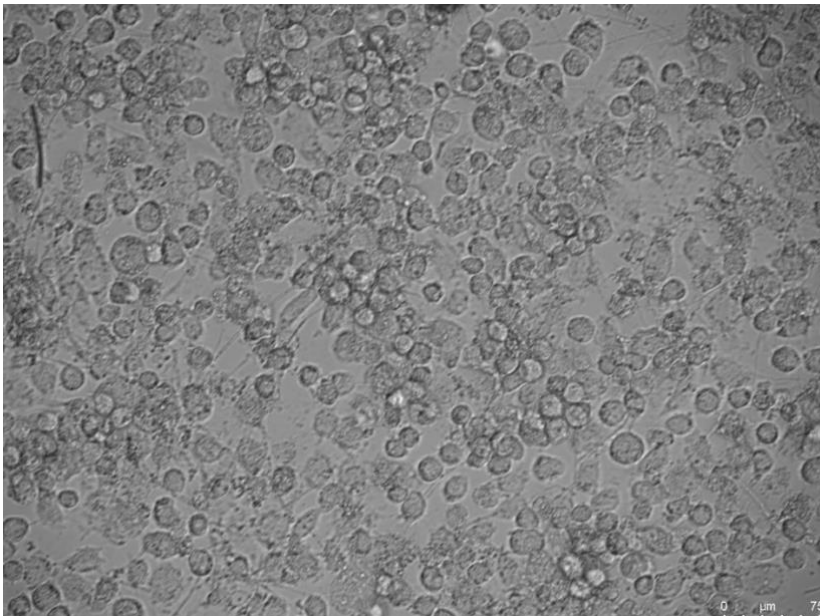


FIGURA 5: Co-cultivo de CGI de *T. rubrum* em linhagem de macrófago humano THP-1 por 24h. Microscopia de fluorescência leica dmi 6000

5.3 Microscopia eletrônica

Na busca de melhor compreender a interação dos CGV de *T. rubrum* com as células do sistema imunológico (macrófagos), realizamos a microscopia eletrônica do co-cultivo dos dois organismos (figura 6). Notamos que os conídios estão internalizando nos macrófagos (figura 6A) já na figura 6B, conseguimos verificar o conídio no interior do macrófago. Nossos resultados corroboram com a literatura, onde YOSHIKAWA *et al.*, 2017 descreveram que macrófagos de camundongos foram capazes de englobar conídios de *T. rubrum* e este foi capaz de desenvolver hifas no interior dos macrófagos, burlando o sistema imunológico.

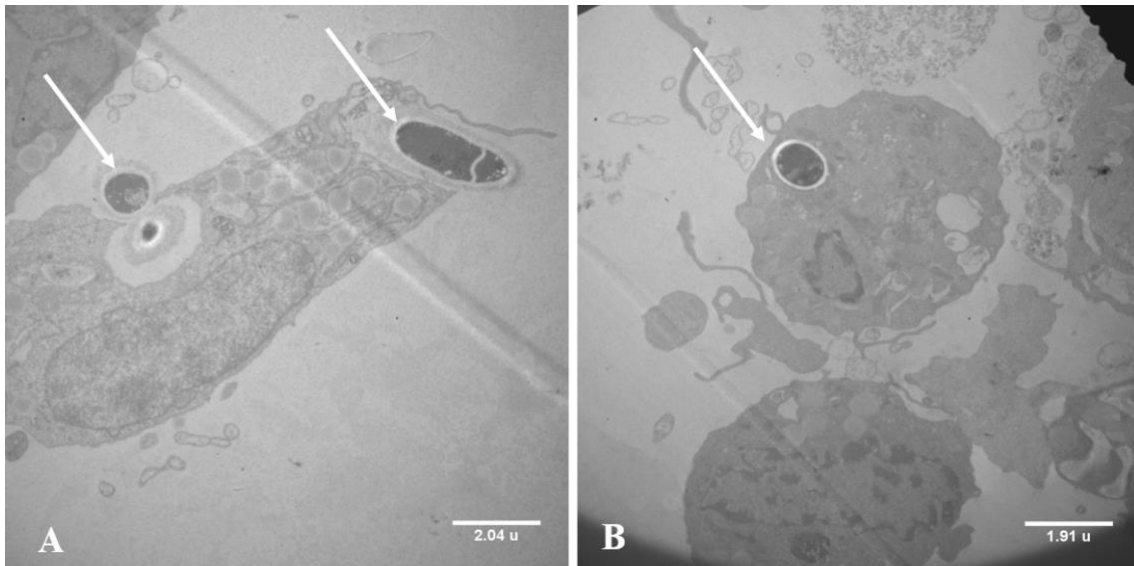


FIGURA 6: Co-cultivo de CGV de *T. rubrum* em linhagem de macrófago humano THP-1 por 24h. Aumento de 5 kx. As setas indicam os CGV dentro dos macrófagos.

5.4 Ensaio com LDH para avaliar a viabilidade celular dos macrófagos THP-1 co-cultivados com CGV de *T. rubrum*

No intuito de verificar a viabilidade celular da linhagem de macrófago durante o co-cultivo com CGV de *T. rubrum* foi quantificado a porcentagem de liberação de LDH em diferentes tempos de incubação.

A figura 7 mostra que a porcentagem de liberação de LDH foi maior em 48 h (38%), mostrando que nesse tempo a viabilidade celular dos macrófagos estava reduzida. Confirmamos que o tempo de 24 h foi adequado para realização dos experimentos de co-cultivo, pois os CG foram internalizados por macrófagos (figura 6). A liberação de LDH em 24h foi moderada (20%), sendo considerada adequada para avaliar a expressão gênica dos macrófagos ainda viáveis (80%), em situação de co-cultivo. PETRUCELLI *et al.*, 2018 mostrou que houve liberação de 18% de LDH durante co-cultivo de *T. rubrum* com queratinócitos humanos por 24h, SANTIAGO *et al.*, 2014 também demonstraram que a viabilidade dos macrófagos diminuiu com o aumento de tempo de cultivo. Além disso, SEGURA *et al.*, 2020 avaliaram a viabilidade do co-cultivo de macrófagos THP-1 em resposta a *T. rubrum* inativados e verificaram que após 24h de interação 70% das células estavam viáveis.

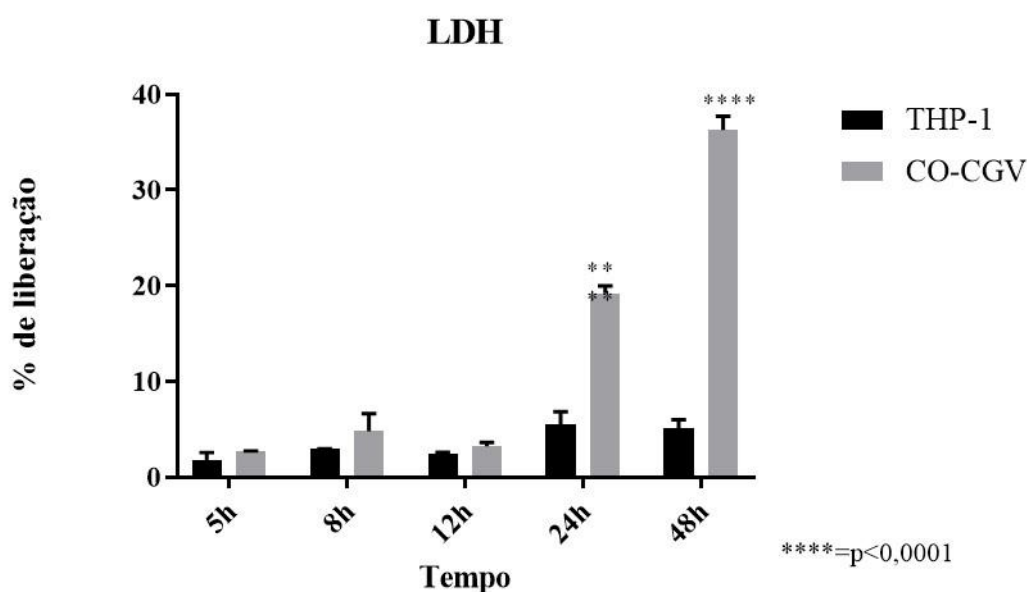


FIGURA 7: liberação de LDH (%) em diferentes tempos do co-cultivo de CGV de *T. rubrum*. Onde THP-1: somente macrófago e CO-CGV: co-cultivo de CGV de *T. rubrum* em linhagem de macrófago humano THP-1. TWO WAY ANOVA E BONFERRONI'S

5.5 Quantificação de citocinas

A quantificação da IL-6 foi realizada para avaliar o efeito dos CG de *T. rubrum* nos macrófagos, afim de analisar a indução do processo inflamatório e ativação do sistema imunológico via IL-6, mostramos que CGV e CGI de *T. rubrum* são capazes de ativar macrófagos *in vitro* (figura 8), (SEGURA *et al.*, 2020).

Observou-se que a liberação da IL-6 ocorreu em todos os tempos e condições (co-cultivo com os CGV e CGI de *T. rubrum*), porém no tempo de 24h a liberação foi maior. Quando comparamos a liberação da IL-6 somente dos macrófagos THP-1 (controle), notamos que a liberação a IL-6 foi maior durante o co-cultivo, mostrando que os CG mesmo inativados foram capazes de induzir a ativação de macrófagos e consequentemente o estresse celular.

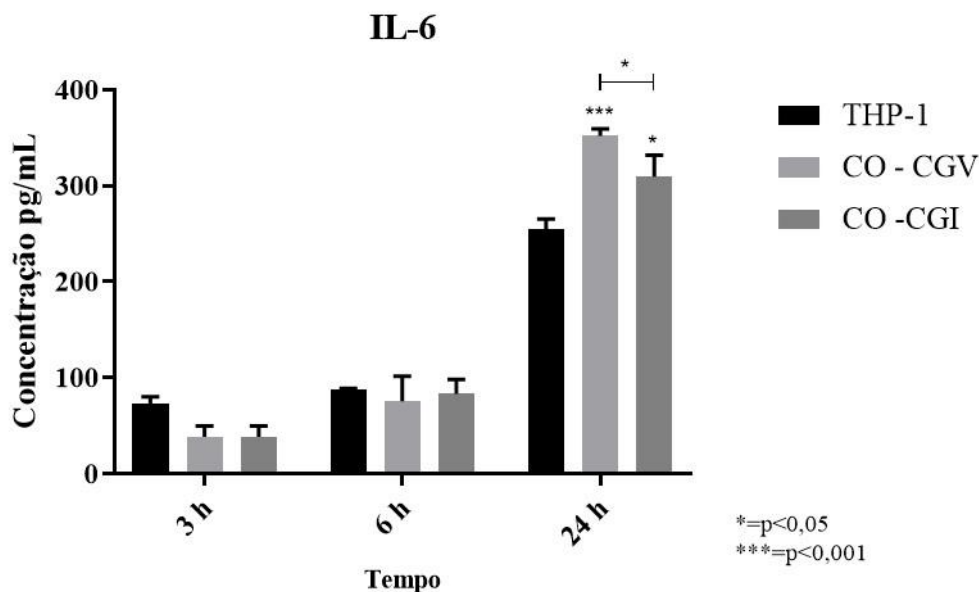


FIGURA 8: Quantificação da liberação de IL-6 em diferentes tempos de co-cultivo. THP-1: somente células de macrófagos. CO-CGV: co-cultivo de THP-1 com CG vivos de *T. rubrum* e CO-CGI: co-cultivo de THP-1 com CG inativados de *T. rubrum*. TWO WAY ANOVA.

Níveis aumentados de IL-6 foram encontrados em danos ou estresse tecidual e em doenças de caráter inflamatório. Sendo assim, a liberação de IL-6 pode contribuir para o efeito inflamatório durante a progressão da doença, colaborando com a defesa do hospedeiro por meio da estimulação de resposta imunológica (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). A IL-6 foi identificada pela primeira vez na década de 1980 sendo produzida por células imunes inatas (macrófagos, células dendríticas e mastócitos) (RINCON, 2012).

O aumento da liberação da IL-6 foi um indicativo de ativação da resposta inune provocada pelo contato com o *T. rubrum* (DAS GUPTA *et al.*, 2014), onde o tempo de 24h foi o mais adequado para realizar o co-cultivo, sendo este o escolhido para continuar a dosagem das outras ILs.

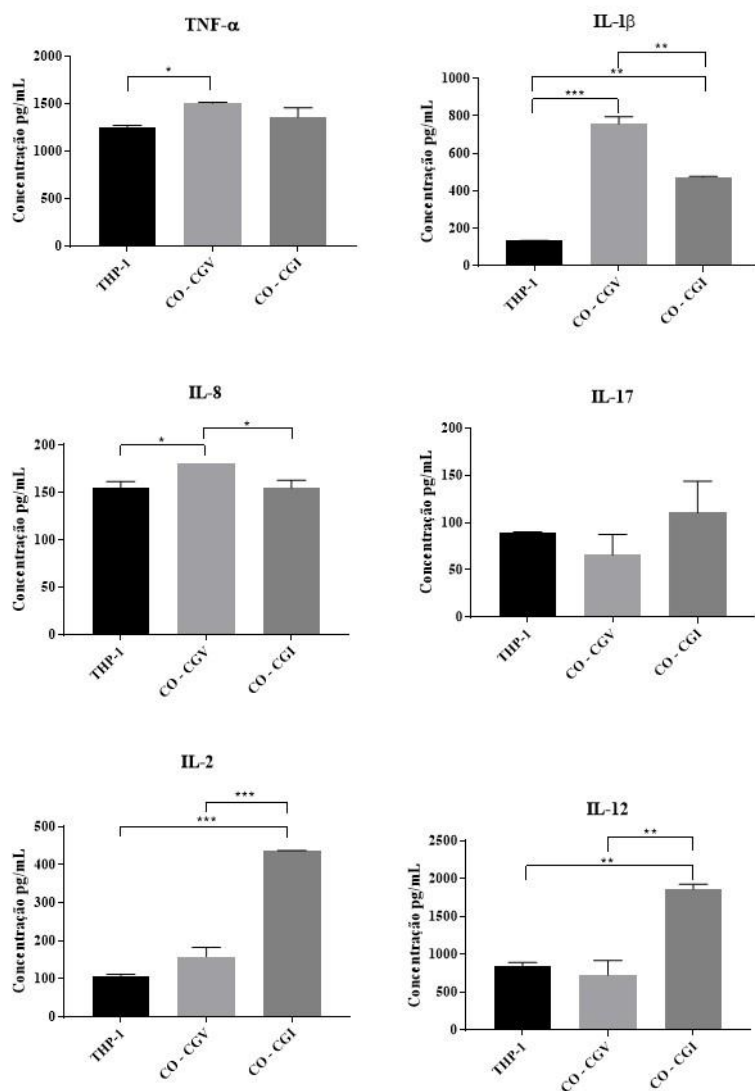


FIGURA 9: Quantificação da liberação de citocinas. THP-1: somente os macrófagos. CO-CGV: co-cultivo de THP-1 com CG vivos de *T. rubrum* e CO-CGI co-cultivo de THP-1 com CG inativados de *T. rubrum* em 24h. TWO WAY ANOVA E TURKEY

A figura 9 mostra a quantificação de TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12 e IL-17E. Verificamos que no co-cultivo com *T. rubrum* ocorreu um aumento na liberação de algumas ILs quando comparado com o controle (linhagem de macrófago THP-1).

Na figura 9A, a liberação de TNF- α não apresentou diferença estatística durante o co-cultivo com CGI de *T. rubrum* comparado com o controle THP-1. Já no co-cultivo com os CGV observamos o aumento da liberação com diferença estatística.

Houve o aumento da liberação de IL-1 β (figura 9B), no co-cultivo com os CGV e CGI de *T. rubrum* comparado com o controle. Ressaltamos que a liberação foi maior no co-cultivo com os CGV de *T. rubrum*.

Observamos pequena diferença estatística na liberação de IL-8 nas condições testadas entre os co-cultivos (figura 9C), esse fato pode ter ocorrido, pois essa interleucina é responsável pelo recrutamento de neutrófilo para o local da infecção (NAGY *et al.*, 2011; PINKE *et al.*, 2016), sendo assim, nessa situação estamos simulando uma infecção onde a inflamação já está acontecendo.

A figura 9D demonstrou que a liberação da IL-17 foi semelhante em todas as condições estudadas (controle e co-cultivo), não apresentando diferença estatística entre as situações ensaiadas. De acordo com CONTI; GAFFEN (2016) a IL-17 atua em infecções superficiais, pois se faz presente nas barreiras dos tecidos, recrutando os neutrófilos, monócitos e macrófagos e, principalmente, desempenhando um papel de proteção inicial para o hospedeiro (SPARBER *et al.*, 2018). Outro dado encontrado na literatura foi que os macrófagos THP-1 tratados diretamente com a interleucina IL-17 não apresentaram expressão desse gene (LI, Q. *et al.*, 2014).

Nas figuras 9A, 9C e 9D verificamos uma alta liberação das citocinas somente no controle (THP-1) isso pode ser explicado pelo fato de PMA também ser utilizado para induzir inflamação (ZHANG, G. *et al.*, 2013).

As figuras 9E e 9F evidenciam a quantificação das IL-2 e IL-12, conjuntamente observamos uma liberação maior no co-cultivo com os CGI de *T. rubrum*. Isso pode significar que, embora o CG estejam inativados, suas proteínas foram suficientes para estimular as células e assim levar a uma liberação dessas ILs.

A figura 9 mostra que os CG de *T. rubrum* co-cultivados com macrófagos THP-1 foram capazes de estimular a liberação a maioria das citocinas estudadas nesse trabalho, comprovando a interação entre os dois organismos. Baseado nesses dados, acreditamos que o presente trabalho foi capaz de simular uma infecção profunda e demonstrar que o sistema imunológico foi ativado.

Na tabela 7 descrevemos algumas funções biológicas descritas na literatura científica sobre as ILs que foram estimuladas nas concentrações testadas.

TABELA 7: Descrição das citocinas: TNF-A, IL-1B, IL-8, IL-17, IL-2 E IL-12

Citocinas		Referências
TNF-α	Proteína chave para o processo inflamatório;	(BRADLEY, 2008).
	Responsável por cascatas de sinalização: respostas celulares de morte, sobrevivência, diferenciação, proliferação e migração.	
	Após co-cultivo de <i>Malassezia pachydermatis</i> com queratinócitos humanos foi observado maior produção de TNF- α foi em 24h.	(CONTI; GAFFEN, 2016)
	Macrófagos de camundongos infectados com conídios de <i>T. rubrum</i> secretaram TNF- α , mostrando a importância dessa IL em fatores inflamatórios e controle de infecção	(YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 2017)
	Pacientes que fazem o uso de medicamentos inibidores do TNF- α (imunossupressores) tornam-se mais suscetíveis às infecções profundas por <i>T. rubrum</i> , demonstrando a atuação dessa IL.	(LOWTHER <i>et al.</i> , 2007).
IL-1β	Citocina que atua na amplificação da resposta pró-inflamatória durante a infecção por vários patógenos.	(CHU <i>et al.</i> , 2016).
	A sinalização de IL-1 β é importante para controle do desenvolvimento das hifas fúngicas.	(YOSHIKAWA, YAMADA; DE ALMEIDA, 2015)
IL-2	Aumento da liberação de IL-2 foi observada em co-cultivo de THP-1 com <i>T. rubrum</i>	(SEGURA <i>et al.</i> , 2020)
IL-12	A IL-12 é essencial no controle da infecção fúngica causada por <i>T. rubrum</i> , onde as células de camundongos deficientes em IL-12 apresentaram baixo índice fagocitário e aumento da carga de fungos na pele dos camundongos.	(BALTAZAR <i>et al.</i> , 2014a)

5.6 Extração de RNA e análise da integridade

Para a verificação inicial da integridade dos RNAs e ausência de DNA genômico, foi realizado um gel desnaturante (figura 10). Encontramos 2 bandas integras sem sinal de degradação e nenhuma presença de DNA genômico.

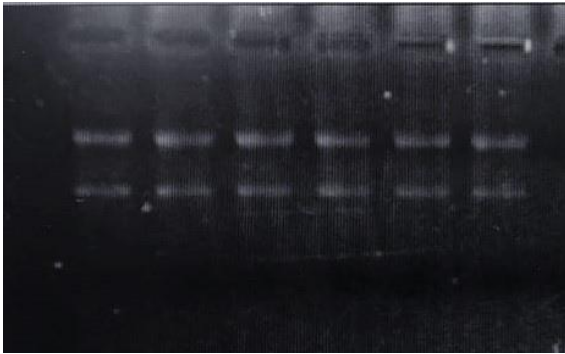


FIGURA 10: Gel desnaturante de RNA contendo as amostras dos macrófagos THP-1 e co-cultivo com CGI de *T. rubrum*

Em seguida realizamos a análise da integridade do RNA utilizando o bioanalisador (figura 11) e observamos um número adequado de integridade de RNA (RIN) acima de 9, evidenciando que estes RNAs estão com qualidades para realizar as bibliotecas e seguir com o sequenciamento.

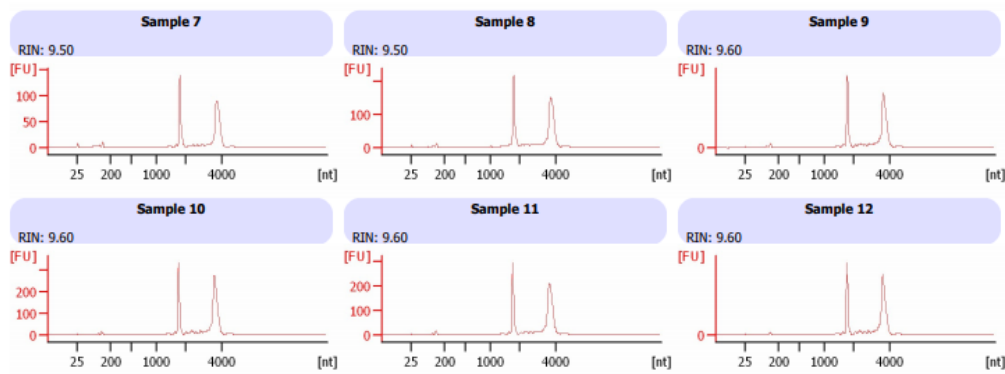


FIGURA 11: Análise das amostras de RNA dos macrófagos THP-1 (7, 8 E 9) e co-cultivo de macrófagos THP-1 com CGI de *T. rubrum* (10, 11 E 12) utilizando o bioanalisador

5.7 RNA-seq

O sequenciamento gerou reads de qualidade e grande percentual de alinhamento com o genoma humano (tabela 8). Houve um alinhamento com cerca de 95% com o genoma humano padrão (hg38) com as células da linhagem THP-1, comprovando que o sequenciamento foi confiável.

TABELA 8: Características gerais das leituras de RNA-seq mapeadas para o genoma de referência humano (HG38)

Amostras	Leituras brutas	Leituras de alta qualidade	Leituras mapeadas	Percentual de alinhamento com o genoma de referência hg38 (%)
THP-1 (Controle 1)	92,503,239	88,111,148	83,912,255	95.23
THP-1 (Controle 2)	93,650,266	88,951,289	84,891,979	95.44
THP-1 (Controle 3)	102,973,651	98,294,201	93,696,535	95.32
Co-THP-1 (Tratamento 1)	93,481,073	89,058,976	83,691,093	93.97
Co-THP-1 (Tratamento 2)	95,946,772	91,427,461	86,957,411	95.11
Co-THP-1 (Tratamento 3)	98,841,212	93,565,192	88,590,607	94.68

De acordo com a distribuição dos genes, foi estabelecido um corte de Log2 Fold Change +/- 1 para considerar os genes que foram mais diferencialmente expressos, a figura 12 demonstra o volcano plot.

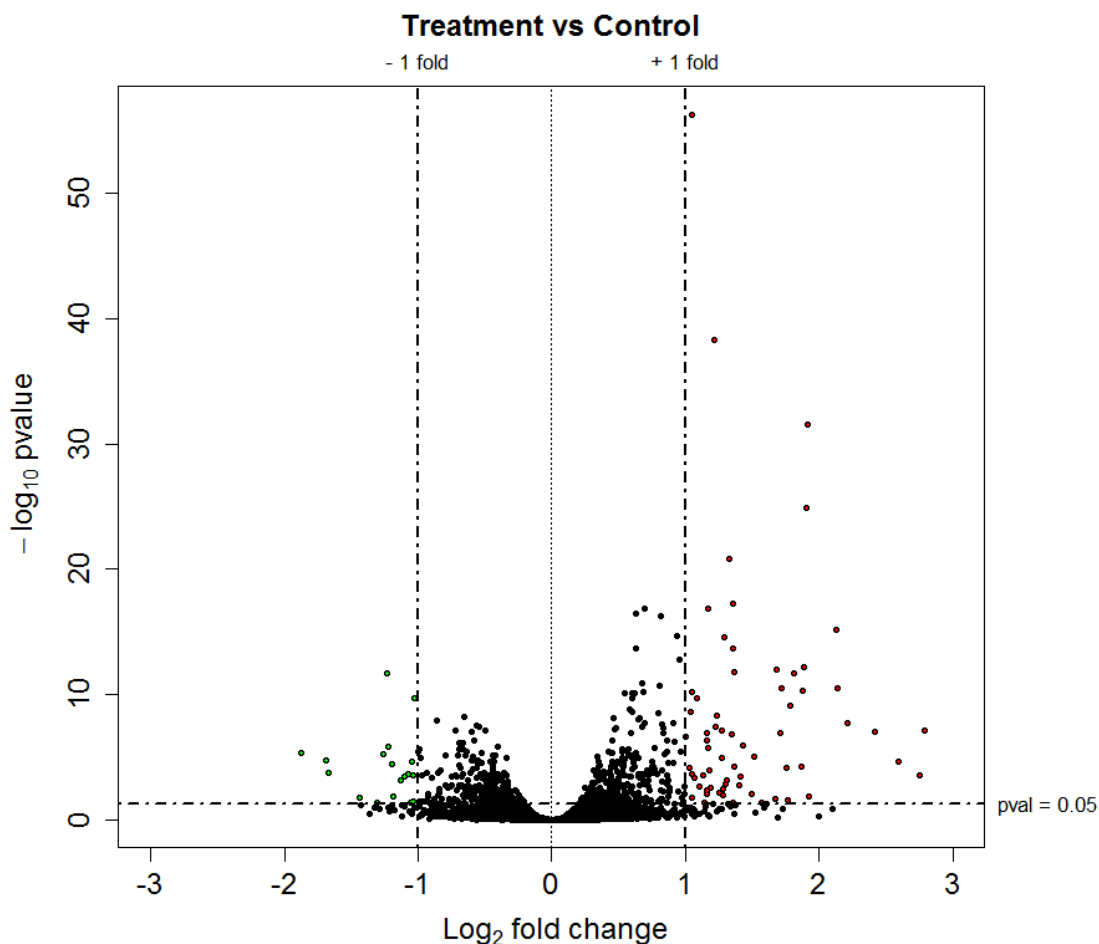


FIGURA 12: Volcano Plot

Foram encontrados cerca de 83 genes (anexo1) com um valor referência em log2 (fold change) ≥ 1.0 e ≤ -1.0 , sendo eles reprimidos e induzidos, com diferentes funções e categorias (anexos).

Esses genes são pertencentes a 3 categorias, componentes celulares, função molecular e processos biológicos, no presente estudo, classificação relacionado aos processos biológicos foram selecionados. Segue abaixo o gráfico do enriquecimento funcional das DEGs da categoria de processos biológicos (figuras 13), as outras duas categorias estão em anexo 2 e 3.

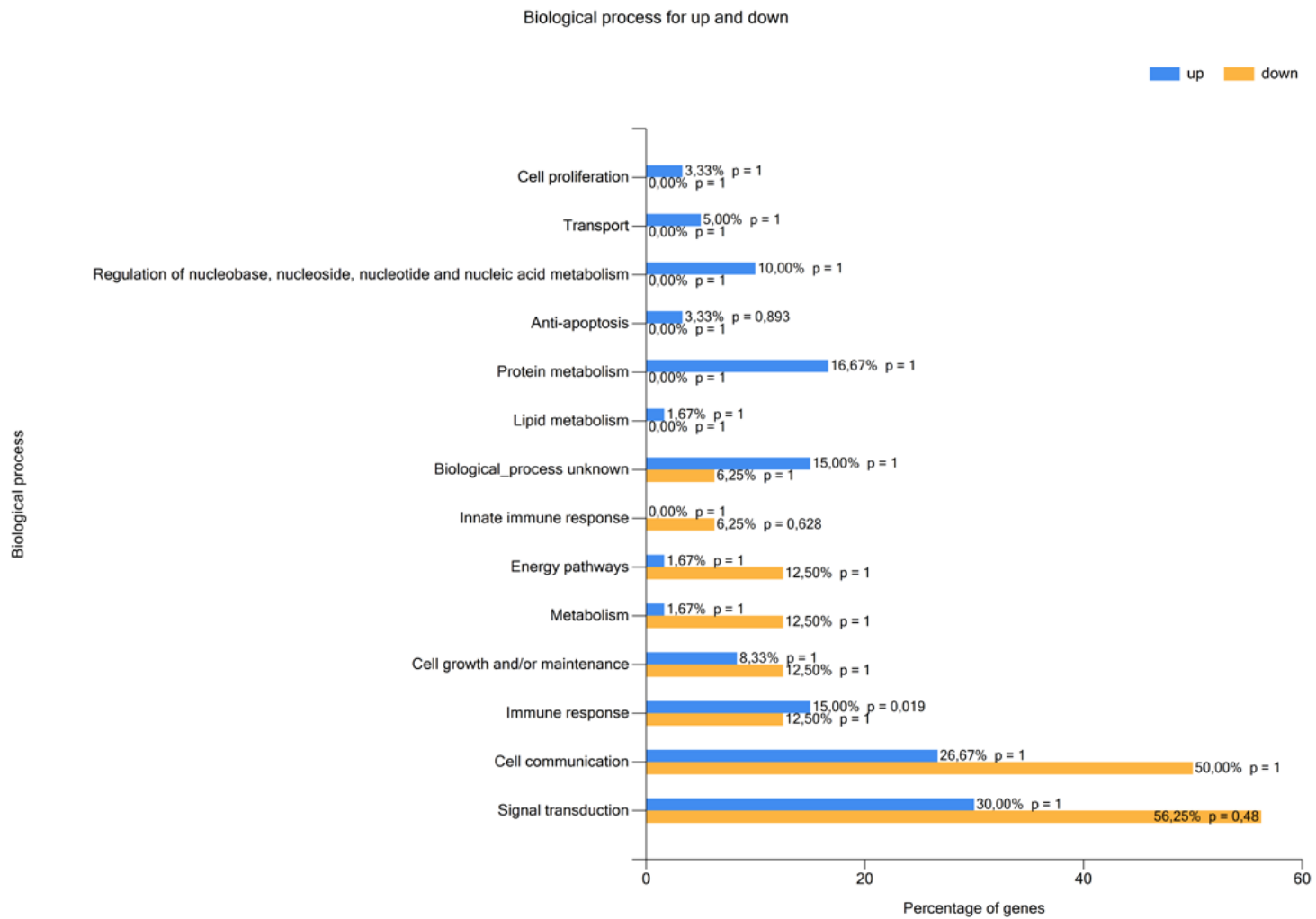


FIGURA 13: Categorização funcional baseada em genes diferencialmente expressos. Processos biológicos

A tabela 9 mostra todos os genes que foram induzidos e a tabela 10 os genes que foram reprimidos e seus respectivos processos biológicos.

TABELA 9: Genes induzidos no RNA-seq envolvidos em diferentes processos biológicos

PROCESSOS BIOLÓGICOS	GENES
Processo biológico desconhecido	LIF; IFI44L; TMEM119; FAM216B; IFIT1; KIAA1644; PHF24; IGFN1; TDRD6;
Metabolismo de proteínas	MMP10; TFPI2; PRSS22; P3H2; SCG5; MMP8; MME; SERPINE1; TIMP4; MMP9;
Metabolismo	MGAM;
Vias de energia	MGAM;
Crescimento e / ou manutenção celular	COL12A1; FMN1; TNFAIP6; CLDN1; SOD2;
Transporte	SLC43A2; ATP1B4; SLC28A3;
Comunicação celular	CRLF2; GREM1; GRASP; NRG1; CLEC5A; BIRC3; TNFRSF18; SYN2; MET; TNF; TGFB3; SEMA3C; MX1; STC1; TRAF1; RRAD;
Transdução de sinal	CRLF2; GREM1; CSF1; GRASP; NRG1; CLEC5A; BIRC3; TNFRSF18; SYN2; MET; SRC; TNF; TGFB3; SEMA3C; MX1; STC1; TRAF1; RRAD; EBF1; ANKRD1; HIVEP2; NR4A3; HR; TBX21;
Regulação do metabolismo de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e ácidos nucleicos	
Resposta imune	CRLF2; CCL24; CSF1; CXCL3; CXCL1; CXCL8; IL32; FCAR; CXCL2;
Anti-apoptose	TNFRSF18; SOD2;
Metabolismo de peptídeos	MME;
Proliferação celular	CSF1; SOD2;
Diferenciação celular	CSF1;
Hemopoiese	CSF1;
Metabolismo lipídico	MGLL;

TABELA 10: Genes reprimidos no RNA-seq envolvidos em diferentes processos biológicos

PROCESSOS BIOLÓGICOS	GENES
Processo biológico desconhecido	SH3TC2;
Metabolismo	HPSE; BBOX1;
Vias de energia	HPSE; BBOX1;
Crescimento e / ou manutenção celular	VCAN; MMRN2;
Comunicação celular	PLK2; TLR7; ROBO4; TLR8; PDE7B; NTS; S1PR1; P2RY12;
Transdução de sinal	PLK2; TLR7; ROBO4; TLR8; PDE7B; NLRP12; NTS; S1PR1; P2RY12;
Resposta imune	CD1D; FCGBP;
Resposta imune inata	TLR8;

Baseado nas categorias biológicas descritas selecionamos os genes que foram validados. O critério para escolha dos genes foi o maior valor de fold change e a relação com a resposta

imunológica. As tabelas 11 e 12 mostram os genes selecionados com seus valores de expressão em \log_2 (fold change).

TABELA 11: Genes induzidos selecionados para validação a partir do RNA-seq do co-cultivo de macrófago THP-1 com CGI de *T. rubrum*, por 24h

ID	Nome do gene	Categorização	\log_2 (Fold change)
CRLF2	Receptor de citocina como fator 2	Resposta Imune	2.79
MMP10	Metalopeptidase 10 da matriz	Metabolismo de proteínas	2.41
ANKRD1	Domínio de repetição ankyrin 1	Regulação do metabolismo de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e ácidos nucleicos	2.21
CCL24	Ligante de quimiocina com motivo C-C 24	Resposta Imune	1.92
SLC43A2	Família de portadores de soluto 43 membros 2	Transporte	1.92
CSF1	Fator estimulador de colônia 1	Resposta Imune	1.90
CXCL1	Ligando 1 da quimiocina (motivo C-X-C)	Resposta Imune	1,71
CXCL2	Ligante 2 de quimiocina (motivo C-X-C)	Resposta Imune	1,10
CXCL3	Ligante 3 de quimiocina (motivo C-X-C)	Resposta Imune	1,88
CXCL8	Ligante 8 da quimiocina (motivo C-X-C)	Resposta Imune	1,71
IL-32	interleucina 32	Resposta Imune	1,27

TABELA 12: Genes reprimidos selecionados para validação a partir do RNA-seq do co-cultivo de macrófago THP-1 com CGI de *T. rubrum* por 24h

ID	Nome do gene	Categorização	\log_2 (Fold change)
SIPR1	receptor 1 de esfingosina-1-fosfato	Comunicação celular, Transdução de sinal	-1.69

TLR8	Receptor toll-like 8	Resposta imunológica inata	-1,06
TLR7	Receptor toll-like 7	Comunicação celular, Transdução de sinal	-1,04
CD1D	Molécula CD1D	Resposta imune	-1,03
FCGBP	Fragmento Fc da proteína de ligação a IgG	Resposta imune	-1,22

5.7.1 Análise das funções gênicas

Após a análise dos dados do RNA-seq, foi utilizado o site (<https://www.genecards.org/>) para encontrar as funções dos genes (tabela 13).

TABELA 13: Genes e funções segundo o site genes card

Genes	Função	Genes card
MMP10	As metaloproteinases são enzimas envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos.	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMP10&keywords=MMP10
ANKRD1	Algumas anquirinas são proteínas de repetição altamente expressas no músculo cardíaco. Sua indução pode estar correlacionada com a morte celular apoptótica em células de hepatoma	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ANKRD1&keywords=ANKRD1
SLC43A2	São responsáveis pelo transporte de glicose e outros açúcares através da membrana plasmática	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC43A2&keywords=SLC43A2
S1PR1	Esse gene é responsável pela diferenciação de células endoteliais e adesão célula-célula.	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=S1PR1&keywords=S1PR1
CRLF2 (TSLP)	Codifica um membro da família de receptores de citocinas do tipo I, como a citocina do tipo IL-7.	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CRLF2&keywords=CRLF2
CCL24	Pertence à subfamília de pequenos genes de citocinas CC, estão envolvidas em processos imunorregulatórios e inflamatórios.	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCL24&keywords=CCL24
CSF1	É uma citocina que desempenha um papel essencial na regulação da sobrevivência, proliferação e diferenciação celular.	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CSF1&keywords=CSF1
CXCL1	É uma proteína secretada que é um fator de crescimento importante para a inflamação	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL1&keywords=CXCL1
CXCL2	É um gene antimicrobiano que faz parte da superfamília das quimiocinas, ele codifica proteínas envolvidas em processos imunorreguladores e inflamatórios. São produzidos por monócitos ativados e neutrófilos, e são expressos nos locais da inflamação.	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL2&keywords=CXCL2

CXCL3	A proteína codificada é um fator de crescimento secretado que sinaliza através do receptor acoplado à proteína G, essa proteína desempenha um papel na inflamação e como quimioatraente para neutrófilos.	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL3&keywords=cxcl3
CXCL8 (IL-8)	É um importante mediador da resposta inflamatória, pois direciona os neutrófilos para o local da infecção.	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL8&keywords=cxcl8
IL-32	A expressão desta proteína é aumentada após a ativação de células T por mitógenos ou a ativação de células NK por IL-2. Esta proteína induz a produção de TNF- α a partir de células de macrófagos.	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL32&keywords=IL-32
TLR7 E 8	As proteínas codificadas pelos genes TLR7 e TLR8 são membros da família do receptor do tipo Toll, que desempenham um papel fundamental no reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata. Eles reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) que são expressos em agentes infecciosos	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR7&keywords=TLR.7
CD1D	O gene CD1D codifica um membro da família CD1 de glicoproteínas transmembranares, que estão estruturalmente relacionadas às proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC).	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD1D&keywords=CD1d
FCGBP	Pode estar envolvido na manutenção da estrutura da mucosa como um componente semelhante à gel da mucosa	https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FCGBP&keywords=FCGBP

5.8 Validação do perfil de expressão

O coeficiente da correlação de Pearson foi determinado para medir o grau de correlação entre as técnicas de expressão gênica utilizadas (RNA-seq e qPCR) dos 16 genes selecionados para validação (figura 14). Encontramos uma forte correlação ($R=0,98$) entre os valores encontrados no RNA-seq e no qPCR. Observamos na figura 14 que o perfil de modulação dos genes selecionados nesse trabalho foi semelhante utilizando a técnica de RNA-seq e qPCR.

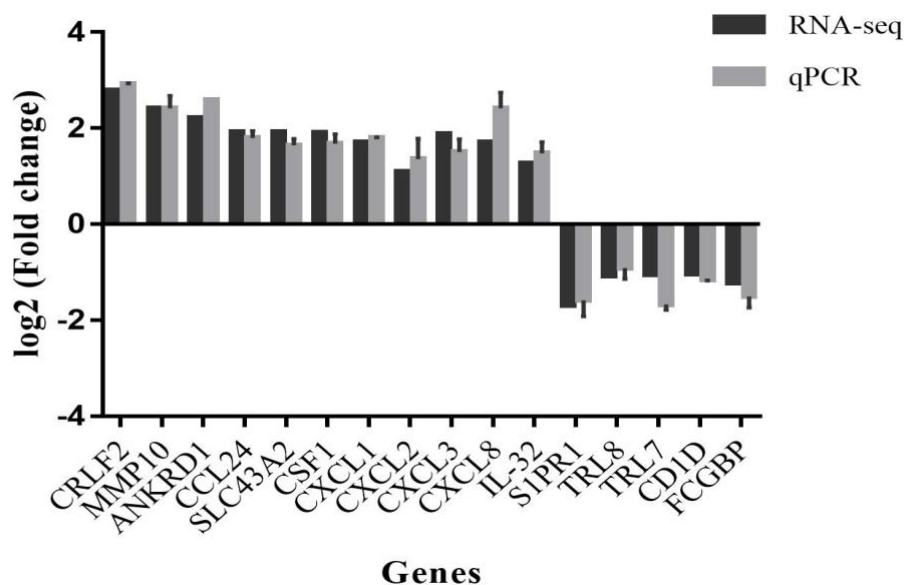


FIGURA 14: Comparação do perfil de modulação dos genes encontrados no RNA-seq e qPCR. R=0,98, p<0,001

Em seguida realizamos uma revisão bibliográfica de todos os genes validados, as tabelas 14 e 15 mostram as informações sobre os genes e suas respectivas funções conforme descrito na literatura. Na tabela 14 são descritos os genes que possuem dados na literatura relacionados diretamente com resposta a infecção fúngica, principalmente provocadas pelo patógeno *C. albicans*. O único gene modulado no presente trabalho e que já foi descrito na literatura com o *T. rubrum* foi o CXCL1.

TABELA 14: Genes e respectivas funções relacionados com infecções fúngicas segundo a literatura

Genes	Função	Referência
MMP10	São derivadas de macrófagos e estão envolvidas com queratite fúngica	(YUAN; MITCHELL; WILHELMUS, 2009)
	Inibe a migração de macrófagos e está relacionado com a cicatrização de feridas.	(MURRAY <i>et al.</i> , 2013)
	Indução da MMP10 em ceratite bacteriana e fúngica após análise do transcriptoma microarray. Foi induzido após exposição de THP-1 com <i>Trichosporon asahii</i>	(CHIDAMBARAM <i>et al.</i> , 2017) (ZHANG, MINGWANG <i>et al.</i> , 2021)
SLC43A2	Após o co-cultivo de macrófagos com <i>C. albicans</i> foi observado o aumento da proteína de SLC43A2. <u>Fosfopeptídeos</u> de macrófagos que aumentaram significativamente em abundância em resposta a <i>C. albicans</i> .	(REALES-CALDERÓN <i>et al.</i> , 2013)

TLR7	Camundongos deficientes em TLR7 apresentaram maior suscetibilidade à infecção profunda causada por <i>C. albicans</i> .	(PATIN <i>et al.</i> , 2016)
CRLF2 (TSLP)	É produzido em excesso quando a pele está lesionada na dermatite atópica Foi excretado por células epiteliais em infecções iniciais causadas por <i>Aspergillus fumigatus</i> A modulação desse após análise de transcriptoma de monócitos do sangue exposto com <i>Cryptococcus neoformans</i> .	(SHERRILL <i>et al.</i> , 2010) (DAI, C. <i>et al.</i> , 2019) (CHEN <i>et al.</i> , 2015)
CCL24	Em análise de microarranjo do perfil de quimiocinas em queratite causada <i>C. albicans</i> , esse gene foi induzido. Após estimulação de macrófago murino com <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , foi observada a indução desse gene.	(YUAN; HUA; WILHELMUS, 2010) (STAVRUM, 2011)
CSF1	O microarranjo de macrófagos de camundongos com <i>C. albicans</i> diversos genes pró-inflamatórios foram encontrados, dentre eles a CSF1.	(SURAM <i>et al.</i> , 2013)
CXCL1	A simulação da infecção fúngica utilizando camundongo infectado com <i>T. rubrum</i> evidenciou uma maior liberação da citocina CXCL1 no início da infecção. Camundongos imunocompetentes infectados com <i>C. albicans</i> revelaram a modulação dessa quimiocina após análise de microarranjo. Após co-cultivo de queratinócitos e fibroblastos com <i>Trichophyton benhamiae</i> foi observado a indução desse gene conforme foi aumentado o tempo de incubação.	(BALTAZAR <i>et al.</i> , 2014b) (CONTI <i>et al.</i> , 2009) (HESSE-MACABATA <i>et al.</i> , 2019)
CXCL2	O microarranjo de células endoteliais da artéria pulmonar e células epiteliais alveolares com <i>A. fumigatus</i> mostrou a indução desse gene. Camundongos infectados com <i>C. albicans</i> induziram fortemente essa quimiocina.	(MORTON <i>et al.</i> , 2014) (ALTMEIER <i>et al.</i> , 2016)
CXCL3	Após microarranjo do co-cultivo de monócitos humano com <i>A. fumigatus</i> esse gene foi induzido. O sequenciamento de monócitos proveniente do sangue periférico infectados com <i>C. neoformans</i> inativado pelo calor evidenciou a expressão desse gene.	(JUERGEN LOEFFLER <i>et al.</i> , 2009) (CHEN <i>et al.</i> , 2015)
CXCL8 (IL-8)	Durante a infecção por <i>Candida</i> spp ocorreu o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção através dessa citocina. Esse gene foi induzido após análise de microarranjo de <i>A. fumigatus</i> . Na infecção por <i>T. benhamiae</i> esse gene também foi induzido após 24h de co-cultivo com queratinócitos e fibroblastos. Na infecção causada por <i>C. parapsilosis</i> , a IL-8 recrutou neutrófilos e auxiliou a migração das	(PINKE <i>et al.</i> , 2016) (CORTEZ <i>et al.</i> , 2006) (HESSE-MACABATA <i>et al.</i> , 2019) (NAGY <i>et al.</i> , 2011)

células T para o epitélio, a fim de realizar o controle da infecção fúngica.

Na tabela 15 descrevemos alguns genes modulados no presente trabalho que embora não apresentem uma relação direta com infecções causadas por *T. rubrum*, a maioria está relacionada com as respostas celulares e imunes a outros tipos de microrganismos. Podemos sugerir que esses genes podem ser estudados futuramente por apresentar potencial para serem utilizados com alvos para o controle da infecção causada por *T. rubrum*

TABELA 15: Descrição dos genes modulados e relacionados com resposta imune e infecção segundo a literatura

Genes	Função	Referência
ANKRD1	Indução do gene ANKRD1 em uma infecção causada pelo vírus da hepatite C.	(PAPIC <i>et al.</i> , 2012)
	O silenciamento desse gene levou ao aumento da carga viral do vírus herpes simplex	(BIN <i>et al.</i> , 2018)
	Aumento do gene ANKRD1 em lesão cutânea (importante na cicatrização e fechamento de feridas)	(SAMARAS <i>et al.</i> , 2015)
S1PR1	O gene S1PR está envolvido com o desenvolvimento de sepse, podendo aumentar a sobrevida de pacientes.	(FENG <i>et al.</i> , 2020)
	S1PR1 diminuem a lesão pulmonar aguda induzidas pelo vírus influenza H1N1.	(ZHAO <i>et al.</i> , 2019)
	O gene S1PR1 possui relevância na fisiopatologia de <i>P. aeruginosa</i> .	(LORÈ <i>et al.</i> , 2020)
IL-32	A IL-32 contribui com o controle do desenvolvimento de infecção, induzindo a expressão de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias. Pode estar envolvida na sinalização intracelular.	(KHAWAR; ABBASI; SHEIKH, 2016)
	Tem a função de defender o hospedeiro contra <i>M. tuberculosis</i> .	(BAI <i>et al.</i> , 2010)
	Após silenciamento de IL-32 em macrófagos THP-1 infectados com <i>Leishmania</i> , foi observado o aumento da infecção.	(DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2017)
TLR8	O gene TLR8 foi induzido após fagocitose de <i>Mycobacterium bovis</i> , podendo estar associado com a tuberculose pulmonar causada por <i>M. tuberculosis</i> .	(DAVILA <i>et al.</i> , 2008)
	Foi encontrada a indução do gene TLR8 na fagocitose de <i>Helicobacter pylori</i> por células ativas de THP-1.	(GANTIER <i>et al.</i> , 2010)
CD1D	O gene CD1D pode estar relacionado com a evolução da terapia do Câncer, onde os tumores escapam do tratamento e alteram a expressão dele.	(GADOLA <i>et al.</i> , 2002)

	A infecção causada pelo vírus HIV reduz a expressão desse gene.	(CHEN, N. <i>et al.</i> , 2006)
FCGBP	O gene FCGBP foi induzido em microarranjo realizado para estudar asma alérgica.	(LEWIS <i>et al.</i> , 2009)
	Repressão desse gene em macrófagos THP-1, infectados pelo vírus da dengue usando qPCR	(AFROZ <i>et al.</i> , 2016)

Dados da literatura não evidenciaram a relação desses genes com *T. rubrum*, porém destacamos a importância deles na infecção profunda causada por *T. rubrum* usando o modelo de co-cultivo em macrófagos THP-1. A partir dos resultados obtidos no transcriptoma descrevemos dados recentes e inéditos para a literatura científica que podem ser explorados a fim de evidenciar genes biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos para o controle dessa infecção.

A fim de verificar o efeito da inativação dos conídios no perfil de modulação dos genes selecionados comparamos o co-cultivo de CGV com CGI de *T. rubrum*. A figura 15 mostra que a maioria dos genes apresentaram maior nível de expressão quando utilizamos os CGV, porém não encontramos diferença no perfil de modulação (indução ou repressão) nas duas situações ensaiadas (vivos ou inativados).

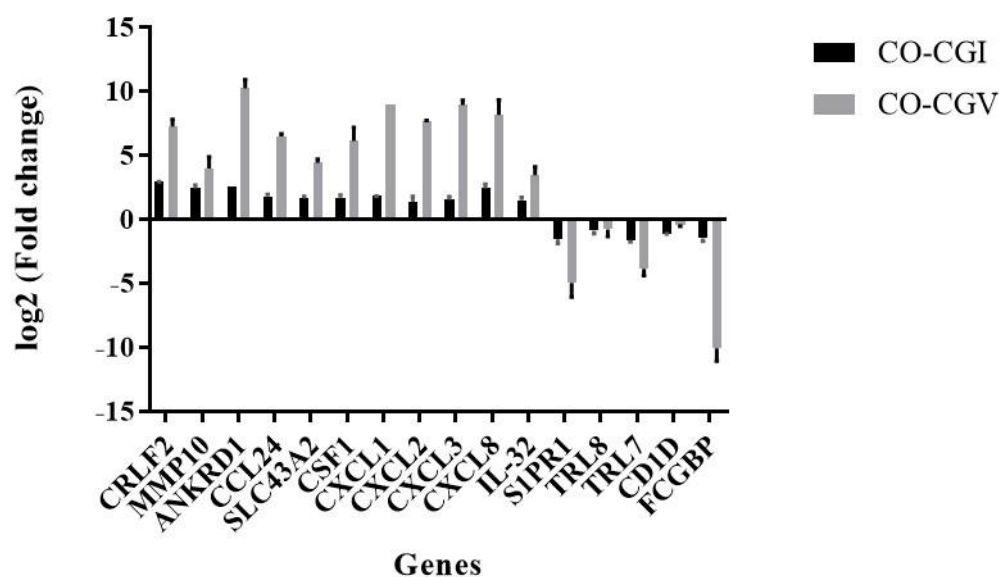


FIGURA 15: Comparação do perfil de expressão gênica do co-cultivo de TPH-1 com CGV e CGI de *T. rubrum*

5.9 Comparação da resposta do co-cultivo de macrófagos humano THP-1 com *T. rubrum* e THP-1 estimulados com LPS bacteriano

5.9.1 Expressão do gene que codifica o receptor TLR4 e viabilidade celular dos macrófagos THP-1 estimulados com LPS

Inicialmente realizamos o ensaio no tempo de 24h com diferentes concentrações de LPS (1 µg/mL, 500ng/ml e 250ng/ml), com objetivo de comparar os dois ensaios, porém não observamos a indução do gene TLR4 (receptor do LPS) e sim a sua repressão (figura 16).

Dessa forma, realizamos os ensaios seguintes nos tempos de 3, 6 e 9h nas concentrações de 500 e 250 ng/mL, e verificamos uma maior expressão do gene TLR4 nesses tempos (figura 16A). O TLR4 é um gene de resposta rápida, por isso sugerimos que o tempo de 24h não foi suficiente para observar expressão desse gene. Segundo (CHEN, L. Y. *et al.*, 2003) os monócitos/macrófagos se ligam ao LPS e como resposta sintetizam e secretam rapidamente produtos biologicamente ativos, como as citocinas.

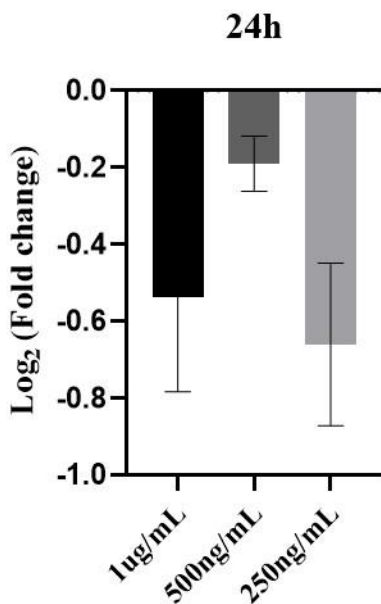


FIGURA 16: Expressão gênica de TLR4 de THP-1 estimulados com LPS por 24h

Após realizar os ensaios com diferentes concentrações e tempo de estimulação com LPS, optamos por dar continuidade utilizando 500ng/mL de acordo com (IM *et al.*, 2008) e o tempo de 9h de estimulação (figura 17A), pois se aproximava mais do tempo de 24h.

Em seguida, verificamos a viabilidade celular dos macrófagos THP-1 estimulados com LPS no tempo de 9h e observamos na figura 17B que cerca de 80% desses macrófagos estavam viáveis.

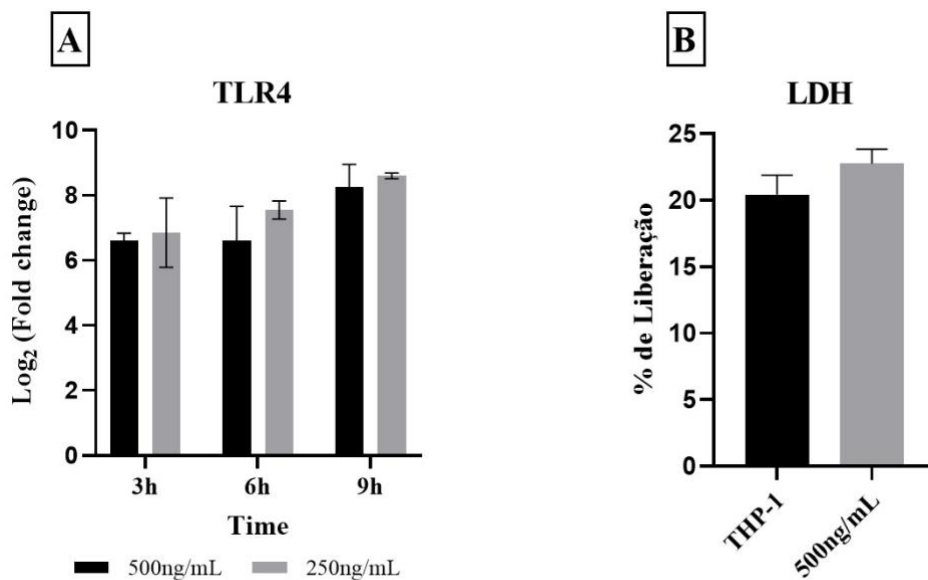


FIGURA 17: Macrófagos THP-1 estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). A- Expressão gênica de TLR4. B- % de liberação de LDH (9h)

5.9.2 Avaliação da Expressão gênica de THP-1 estimulada com LPS

Embora o tempo tenha sido diferente, a maioria dos genes apresentaram diferentes níveis de expressão, porém notamos que alguns deles possuem diferença no perfil de modulação nos 2 ensaios analisados (figura 18).

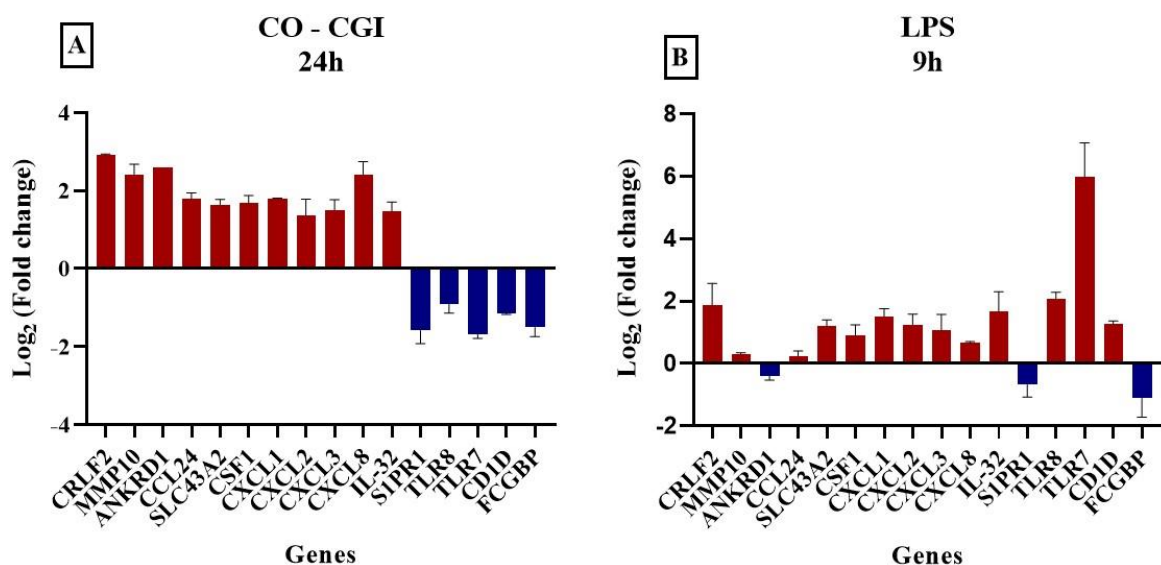


FIGURA 18: Comparação da expressão gênica. (A)- co-cultivo de THP-1 com CGI de *T. rubrum* (24h). (B)- THP-1 estimuladas com LPS (9h). Cores vermelhas e azuis indicam indução e repressão, respectivamente

Os genes ANKRD1, TLR8, CD1D e principalmente TLR7 apresentaram distinção no perfil de modulação, demonstrando a diferença nas condições testadas já os genes MMP10, CCL24 e CXCL8 foi possível observar uma maior expressão no co-cultivo com *T. rubrum*. Dessa forma, podemos sugerir através dos resultados encontrados nesse trabalho, que esses genes são importantes nas infecções causadas por *T. rubrum*. Pois eles foram modulados diferentemente na presença de LPS, situação que simula uma infecção bacteriana. Porém são necessários mais estudos para que esses genes possam ser explorados de forma detalhada afim de serem utilizados como novos alvos antifúngicos para o controle dessas infecções.

Existe um número limitado da relação desses genes com a infecção causada pelo *T. rubrum*, principalmente na comparação da modulação de expressão gênica do co-cultivo com *T. rubrum* e estimulação com LPS. Dessa forma salientamos a inovação do presente trabalho e sua contribuição para compreensão do processo para amenizar as infecções causadas por esse patógeno.

O gene TLR7 foi o que mais se destacou, pois, o perfil de modulação foi diferente nas duas condições estudadas, desta forma evidenciamos sua importante na infecção fúngica. (JANNUZZI *et al.*, 2020) demonstraram que houve uma redução da carga fúngica na pele em infecções causadas por *Fonsecaea pedrosoi*, após tratamento com imiquimod (agonista do TLR7), sugerindo que a ativação do TLR7 seria importante na proteção da doença, (BOURGEOIS *et al.*, 2011) também mostraram o papel da sinalização endossômica de TLR7

no reconhecimento de patógenos fúngicos na modulação da resposta imune do hospedeiro *C. glabrata*. (ELLA *et al.*, 2021) relataram que a estimulação de TLR7 por uma vacina inativada de vírus de SARS-CoV-2 gerou uma maior resposta imune. Essa poderia ser estratégia usada no combate ou prevenção da infecção por *T. rubrum*.

5.9.3 Interleucina 32

Na figura 19A observamos a quantificação da liberação da IL-32 no co-cultivo de *T. rubrum* e na figura 19B sua liberação após a estimulação com LPS. Verificamos que a liberação de IL-32 no co-cultivo foi maior quando comparado com a estimulação de LPS, demonstrando sua possível atuação em infecção fúngica causadas por *T. rubrum*. O co-cultivo com *T. rubrum* apresentou liberação de 200pg/ml e o controle do ensaio THP-1 liberou 100pg/ml. Enquanto que a liberação da IL-32 na estimulação com LPS (50pg/ml) foi menor comparado com o controle da THP-1 (40pg/ml) em 9h.

Devido a importância desse gene para a resposta do processo de infecção fúngica causado por *T. rubrum*, foi realizado a estimulação da linhagem celular THP-1 com LPS afim de comparar a resposta nesses diferentes microrganismos.

A IL-32 possui propriedades pró-inflamatórias e é responsável por participar da produção de TNF- α , IL-6 entre outras citocinas (BAI *et al.*, 2010).

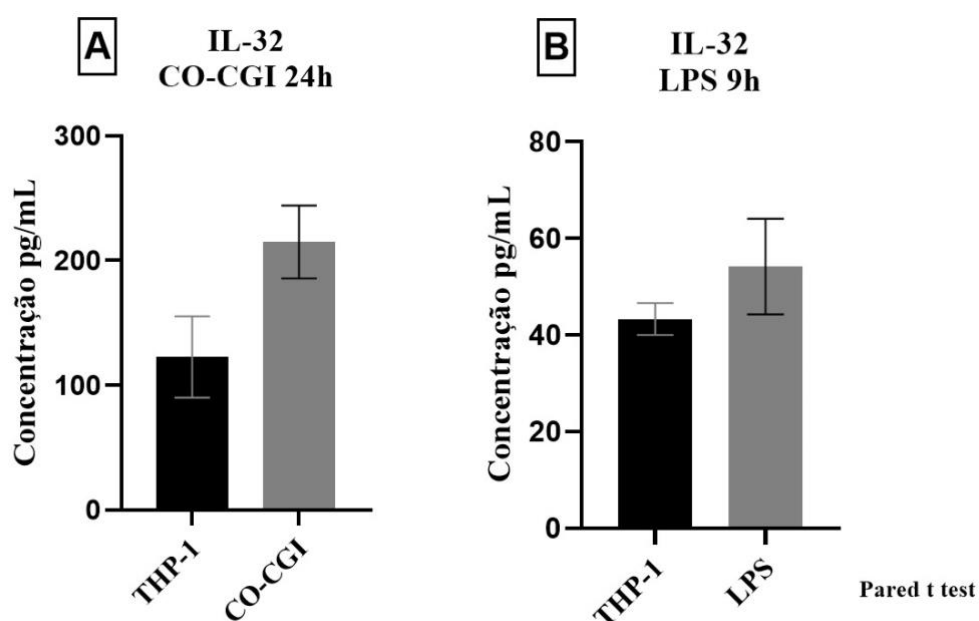


FIGURA 19: Quantificação da IL-32. **A-** Co-cultivo de THP-1 com CGI de *T. rubrum* por 24h. **B-** THP-1 estimuladas com LPS por 9h

O aumento da expressão dessa interleucina em epitélio das vias aéreas de pulmões infectados com *Mycobacterium avium*, induziram a apoptose dessas células infectadas, indicando que a IL-32 auxilia na defesa do hospedeiro contra esse patógeno. Essa interleucina também possui um papel importante na gravidade de inflamação de mucosa gástrica afetada por *H. pylori* (SHAHI; KIAEE, 2020).

Também foi descrito a importância da IL-32 em resposta a diferentes infecções com vírus HIV-1 e influenza (ZEPP *et al.*, 2011), doenças caracterizadas por inflamações, artrite reumatoide (JOOSTEN *et al.*, 2006), inflamações intestinais (SHIOYA *et al.*, 2007), alguns tipos de câncer (HONG *et al.*, 2017) e micose fungóide (linfoma cutâneo de células T) (OHMATSU *et al.*, 2014). Recentemente (GUIMARÃES DE MATOS *et al.*, 2021) a IL-32 foi detectada em lesões orais de pacientes com *Paracoccidioides* spp. Nosso trabalho descreveu a associação da IL-32 com infecção fúngica causada por *T. rubrum*.

Apesar de não observarmos diferença significativa na expressão gênica dessa interleucina no co-cultivo com *T. rubrum* e estimulação com LPS, quando analisamos o nível proteico de IL-32 observamos que a liberação foi maior no co-cultivo com *T. rubrum* comparado à estimulação com LPS bacteriano. Devido a importância da IL-32 nas infecções citada anteriormente, podemos sugerir que a ativação dessa via também é importante na

infecção por *T. rubrum* e possivelmente pode ser um alvo explorado para o tratamento de dermatofitoses.

6. CONCLUSÃO

Estabelecemos o tempo de 24h para o co-cultivo de CGV e CGI de *T. rubrum* com a linhagem de macrófago humano THP-1, através da observação dos conídios no interior dos macrófagos pela microscopia eletrônica, liberação de LDH e quantificação da IL-6.

Diante disso, as citocinas IL-2, IL-8, IL-12, IL-17E, TNF- α e IL-1- β foram quantificadas no tempo de 24h. A liberação de TNF- α , IL-8 e IL-1 β foi maior utilizando CGV. Para a IL-2 e IL-12 a liberação foi maior utilizando CGI. Não houve diferença estatística entre as condições testadas para a IL-17E.

O sequenciamento de nova geração do co-cultivo de THP-1 com CGI de *T. rubrum* resultou na modulação de 83 genes, sendo que 65 foram induzidos e 18 foram reprimidos. A categorização dos genes modulados evidenciou as vias de transdução de sinais, comunicação celular e resposta imune.

A maioria dos genes selecionados para validação estão relacionados com as ILs avaliadas neste trabalho, demonstrando a importância de ativação do sistema imunológico via ILs na resposta a infecção fúngica profunda provocada por *T. rubrum*.

O índice de correlação de Pearson dos genes validados foi de 0,98, indicando uma forte correlação entre os resultados de RNA-seq e qPCR.

A comparação do perfil de expressão dos 16 genes humanos validados utilizando CGV e CGI mostrou que a inativação dos conídios de *T. rubrum* não alterou o perfil de modulação (indução ou repressão). No entanto, o uso dos CGV mostrou maior nível de expressão de todos os genes.

Não foi possível comparar o co-cultivo de THP-1 com *T. rubrum* e estimulado com LPS bacteriano, pois não foi observada a expressão do gene TLR4 (receptor do LPS) no tempo de 24h. Porém na presença do LPS em 9h verificamos a repressão dos genes ANKRD1 e indução de TLR8, TLR7 e CD1D.

Na quantificação da IL-32 também não foi possível comparar, devido a diferença dos tempos testados no co-cultivo (9h para LPS e 24h para *T.rubrum*), porém observamos a maior liberação da IL-32 no co-cultivo com *T. rubrum*.

7. REFERÊNCIAS

ACHTERMAN, R. R. *et al.* Sequenced dermatophyte strains: Growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. *Fungal Genetics and Biology*, v. 48, n. 3, p. 335–341, 2011.

AFROZ, S. *et al.* Transcriptome meta-analysis reveals a dysregulation in extra cellular matrix and cell junction associated gene signatures during Dengue virus infection. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1–12, 21 set. 2016.

AL-KHIKANI, F. .; AYIT, A. Major challenges in dermatophytosis treatment: current options and future visions. *Egyptian Journal of Dermatology and Venerology*, 2021.

ALTMEIER, S. *et al.* IL-1 Coordinates the Neutrophil Response to *C. albicans* in the Oral Mucosa. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 9, p. e1005882, 15 set. 2016.

ANTUORI, A. *et al.* Epidemiology of dermatophytic infections between 2008 and 2017 in Barcelona, Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 7 maio 2019.

AUWERX, J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, v. 47, n. 1, p. 22–31, 1991.

AZEVEDO CELESTRINO, G. *et al.* Host immune responses in dermatophytes infection. *Mycoses*, 2021.

BAI, X. *et al.* IL-32 Is a Host Protective Cytokine against *Mycobacterium tuberculosis* in Differentiated THP-1 Human Macrophages . *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 7, p. 3830–3840, 1 abr. 2010.

BALTAZAR, L. DE M. *et al.* IFN- γ impairs *Trichophyton rubrum* proliferation in a murine model of dermatophytosis through the production of IL-1 β and reactive oxygen species. *Medical Mycology*, v. 52, n. 3, p. 293–302, 1 abr. 2014a.

BALTAZAR, L. DE M. *et al.* IFN- γ impairs *Trichophyton rubrum* proliferation in a murine model of dermatophytosis through the production of IL-1 β and reactive oxygen species. *Medical Mycology*, v. 52, n. 3, p. 293–302, 1 abr. 2014b.

BENER, G. *et al.* Silencing of CD47 and SIRP α by Polypurine reverse Hoogsteen hairpins to promote MCF-7 breast cancer cells death by PMA-differentiated THP-1 cells. *BMC Immunology*, v. 17, n. 1, p. 32, 2016.

BIN, L. *et al.* Ankyrin repeat domain 1 regulates innate immune responses against herpes simplex virus 1: A potential role in eczema herpeticum. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 141, n. 6, p. 2085- 2093.e1, 1 jun. 2018.

BITENCOURT, T. A. *et al.* Transcription profile of *Trichophyton rubrum* conidia grown on keratin reveals the induction of an adhesin-like protein gene with a tandem repeat pattern. *BMC Genomics*, 2016.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.

- BOMFIM, L. G. S. *et al.* Leishmania infantum Induces the Release of sTREM-1 in Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 2265, 16 nov. 2017.
- BONGOMIN, F. *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of Fungi*. [S.l.]: MDPI AG. , 1 dez. 2017
- BORTOLOTTO, L. F. B. *et al.* Cytotoxicity of trans-chalcone and licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 85, p. 425–433, 2017.
- BOURGEOIS, C. *et al.* Conventional Dendritic Cells Mount a Type I IFN Response against Candida spp. Requiring Novel Phagosomal TLR7-Mediated IFN- β Signaling . *The Journal of Immunology*, v. 186, n. 5, p. 3104–3112, 1 mar. 2011.
- BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 3, p. 180–190, 17 mar. 2012.
- BRADLEY, J. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, v. 214, n. 2, p. 149–160, jan. 2008.
- BRASCH, J. Pathogenesis of tinea. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 8, n. 10, p. 780–786, 30 jul. 2010.
- BURSTEIN, V. L. *et al.* Skin Immunity to Dermatophytes: From Experimental Infection Models to Human Disease. *Frontiers in Immunology*. [S.l.: s.n.]. , 2020
- CANTELLI, B. A. M. *et al.* Caffeic acid and licochalcone A interfere with the glyoxylate cycle of Trichophyton rubrum. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 96, p. 1389–1394, 2017.
- CAO, J. *et al.* Curcumin inhibits EMMPRIN and MMP-9 expression through AMPK-MAPK and PKC signaling in PMA induced macrophages. *Journal of Translational Medicine*, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2014.
- CHAI, L. Y. A. *et al.* Modulation of toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 responses by Aspergillus fumigatus. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 5, p. 2184–2192, 2009.
- CHANPUT, W. *et al.* Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: A tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food and Function*, v. 1, n. 3, p. 254–261, 30 dez. 2010.
- CHEAH, H. L.; LIM, V.; SANDAI, D. Inhibitors of the glyoxylate cycle enzyme ICL1 in Candida albicans for potential use as antifungal agents. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, 2014.
- CHEN, L. Y. *et al.* Involvement of protein tyrosine kinase in toll-like receptor 4-mediated NF- κ B activation in human peripheral blood monocytes. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2003.
- CHEN, N. *et al.* HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef. *European Journal of Immunology*, v. 36, n. 2, p. 278–286, 1 fev. 2006.
- CHEN S, YAN H, ZHANG L, KONG W, SUN Y, ZHANG W, CHEN Y, D. A. Cryptococcus Neoformans Infection and Immune Cell Regulation in Human Monocytes. *Cell Physiol*

Biochem, p. 537–547, 2015.

CHIDAMBARAM, J. D. *et al.* Persistence of innate immune pathways in late stage human bacterial and fungal keratitis: results from a comparative transcriptome analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, n. MAY, p. 193, 18 maio 2017.

CHU, J.-Q. *et al.* Production of IL-1 β and Inflammasome with Up-Regulated Expressions of NOD-Like Receptor Related Genes in *Toxoplasma gondii*-Infected THP-1 Macrophages. *The Korean journal of parasitology*, v. 54, n. 6, p. 711–717, dez. 2016.

CONTI, H. R. *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *Journal of Experimental Medicine*, v. 206, n. 2, p. 299–311, 16 fev. 2009.

CONTI, H. R.; GAFFEN, S. L. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. v. 195, n. 3, p. 780–788, 2016.

CORTEZ, K. J. *et al.* Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*, v. 74, n. 4, p. 2353–65, abr. 2006.

COSTA, J. E. F. *et al.* Dermatophytosis in patients with human immunodeficiency virus infection: Clinical aspects and etiologic agents. *Acta Tropica*, v. 150, p. 111–115, 1 out. 2015.

DAI, C. *et al.* Interactions of thymic stromal lymphopoietin with TLR2 and TLR4 regulate anti-fungal innate immunity in *Aspergillus fumigatus*-induced corneal infection. *Experimental Eye Research*, v. 182, p. 19–29, 1 maio 2019.

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, 20 dez. 2019.

DAI, Z. J. *et al.* Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. *Cancer Cell International*, v. 12, 19 dez. 2012.

DAIGNEAULT, M. *et al.* The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, v. 5, n. 1, 2010.

DAS GUPTA, M. *et al.* *Aspergillus fumigatus* induces microRNA-132 in human monocytes and dendritic cells. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 304, n. 5–6, p. 592–596, 2014.

DAVILA, S. *et al.* Genetic Association and Expression Studies Indicate a Role of Toll-Like Receptor 8 in Pulmonary Tuberculosis. *PLoS Genetics*, v. 4, n. 10, p. e1000218, 10 out. 2008.

DE AGUIAR PERES, N. T. *et al.* Dermatofitos: Interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, n. 5, p. 657–667, 2010.

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, 1 out. 2019.

DE CAMARGO PEREIRA, G. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* LPS stimulation downregulates

- DNMT1, DNMT3a, and JMJD3 gene expression levels in human HaCaT keratinocytes. *Clinical Oral Investigations*, 2013.
- DOBIN, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, v. 29, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2013.
- DOS SANTOS, J. C. *et al.* Cytokines and microbicidal molecules regulated by IL-32 in THP-1-derived human macrophages infected with New World Leishmania species. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 2, p. e0005413, 27 fev. 2017.
- ELLA, R. *et al.* Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: a double-blind, randomised, phase 1 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 21, n. 5, p. 637, 2021.
- FACHIN, A. L. *et al.* Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, n. 8, p. 1093–1099, 2006.
- FENG, A. *et al.* S1PR1-Associated Molecular Signature Predicts Survival in Patients with Sepsis. *Shock*, 2020.
- GADOLA, S. D. *et al.* V α 24-J α Q-Independent, CD1d-Restricted Recognition of α -Galactosylceramide by Human CD4 + and CD8 $\alpha\beta$ + T Lymphocytes . *The Journal of Immunology*, v. 168, n. 11, p. 5514–5520, 1 jun. 2002.
- GANTIER, M. P. *et al.* Genetic modulation of TLR8 response following bacterial phagocytosis. *Human Mutation*, v. 31, n. 9, p. 1069–1079, 1 set. 2010.
- GAO, Q. *et al.* Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, v. 369, n. 6499, p. 77–81, 3 jul. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7202686/>. Acesso em: 28 abr. 2021.
- GATTO, M. *et al.* Transcriptional analysis of THP-1 cells infected with leishmania infantum indicates no activation of the inflammasome platform. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2020.
- GLASS, C. K. *et al.* *Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration*. Cell. [S.l: s.n.], 2010
- GNAT, S. *et al.* The host range of dermatophytes, it is at all possible? Phenotypic evaluation of the keratinolytic activity of *Trichophyton verrucosum* clinical isolates. *Mycoses*, v. 62, n. 3, p. 274–283, 1 mar. 2019.
- GOMES, B. S. *et al.* *Etiologia das dermatofitoses diagnosticadas em pacientes atendidos no Laboratório de Micologia Médica no Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco*, entre. . [S.l: s.n.], 2018
- GOYAL, S. *et al.* *The interaction of human pathogenic fungi with C-type lectin receptors*. *Frontiers in Immunology*. [S.l: s.n.], 2018
- GROSSE, S.; EVJE, L.; SYVERSEN, T. Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture. *Toxicology in Vitro*, v. 27, n. 1, p. 305–313, 2012.

GU, D. *et al.* Treatment-resistant dermatophytosis: A representative case highlighting an emerging public health threat. *JAAD Case Reports*, 2020.

GUIMARÃES DE MATOS, G. *et al.* Paracoccidioides brasiliensis induces IL-32 and is controlled by IL-15/IL-32/vitamin D pathway in vitro. *Microbial Pathogenesis*, 2021.

HAY, R. J. Superficial Mycoses. p. 648–652, 1 jan. 2020.

HESSE-MACABATA, J. *et al.* Innate immune response of human epidermal keratinocytes and dermal fibroblast to in vitro incubation of *Trichophyton benhamiae* DSM 6916. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, p. jdv.15472, 5 fev. 2019.

HJORT, M. R. *et al.* Alveolar epithelial cell-macrophage interactions affect oxygen-stimulated interleukin-8 release. *Inflammation*, v. 27, n. 3, p. 137–145, 2003.

HONG, J. T. *et al.* Interleukin 32, inflammation and cancer. *Pharmacology and Therapeutics*. [S.l.]: Elsevier Inc.

HUANG, X. *et al.* Trichophyton rubrum conidia modulate the expression and transport of Toll-like receptor 2 in HaCaT cell. *Microbial Pathogenesis*, v. 83–84, p. 1–5, 2015.

HUBE, B. *et al.* Dermatomycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. *Journal de Mycologie Medicale*. [S.l: s.n.], 2015

IM, J. *et al.* 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) attenuates LPS-induced IL-8 expression by decreasing mRNA stability in THP-1 cells. *Toxicology Letters*, v. 177, n. 2, p. 108–115, 2008.

JANNUZZI, G. P. *et al.* Intracellular PRRs Activation in Targeting the Immune Response Against Fungal Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A.

JOOSTEN, L. A. B. *et al.* IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 9, p. 3298–3303, 28 fev. 2006.

JUERGEN LOEFFLER, 1 *et al.* Interaction analyses of human monocytes cocultured with different forms of *Aspergillus*. . [S.l: s.n.], 2009

KASPEROVA, A. *et al.* Exposition of dermatophyte Trichophyton mentagrophytes to L-cystine induces expression and activation of cysteine dioxygenase. *Mycoses*, v. 57, n. 11, p. 672–8, nov. 2014.

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*, 2017.

KHAWAR, M. B.; ABBASI, M. H.; SHEIKH, N. IL-32: A Novel Pluripotent Inflammatory Interleukin, towards Gastric Inflammation, Gastric Cancer, and Chronic Rhino Sinusitis. *Mediators of inflammation*, v. 2016, p. 8413768, 2016.

KHURANA, A.; SARDANA, K.; CHOWDHARY, A. Antifungal resistance in dermatophytes:

Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genetics and Biology*, v. 132, p. 103255, 1 nov. 2019.

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, 17 jun. 2016.

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 : eCAM*, v. 2015, p. 180535, 2015.

KUNDU, M.; BASU, J. IL-32: An Emerging Player in the Immune Response Network against Tuberculosis? *PLoS Medicine*, v. 3, n. 8, p. e274, 15 ago. 2006. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.0030274>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

LANTERNIER, F. *et al.* Deep Dermatophytosis and Inherited CARD9 Deficiency. 2013.

LEWIS, C. C. *et al.* Unique and overlapping gene expression patterns driven by IL-4 and IL-13 in the mouse lung. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 123, n. 4, p. 795- 804.e8, 2009.

LI, L. *et al.* SARS-CoV-2 vaccine candidates in rapid development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 17, n. 3, p. 644–653, 4 mar. 2021.

LI, Q. *et al.* Interleukin-17 indirectly promotes M2 macrophage differentiation through stimulation of COX-2/PGE2 pathway in the cancer cells. *Cancer Research and Treatment*, v. 46, n. 3, p. 297–306, 2014.

LIANG, J. *et al.* Comparative Transcriptome Analysis Providing Resistance Mechanism of *Aspergillus oryzae* Under Arsenate Stress . *Geomicrobiology Journal*, 2021.

LORÈ, N. I. *et al.* Collaborative cross mice yield genetic modifiers for *Pseudomonas aeruginosa* infection in human lung disease. *mBio*, 2020.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LOWTHER, A. L. *et al.* Invasive *Trichophyton rubrum* infection occurring with infliximab and long-term prednisone treatment. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, v. 11, n. 2, p. 84–8, 16 mar. 2007.

MA, R. *et al.* HOXB7-S3 inhibits the proliferation and invasion of MCF-7 human breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 12, n. 4, p. 4901–4908, 1 out. 2015.

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

MIRANDA, M. B.; MCGUIRE, T. F.; JOHNSON, D. E. Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. *Leukemia*, v. 16, n. 4, p. 683–92, 16 abr. 2002.

MORTON, C. O. *et al.* Gene Expression Profiles of Human Dendritic Cells Interacting with

Aspergillus fumigatus in a Bilayer Model of the Alveolar Epithelium/Endothelium Interface. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. e98279, 28 maio 2014.

MUNDODI, V. *et al.* Global translational landscape of the *Candida albicans* morphological transition. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 2021.

MURRAY, M. Y. *et al.* Macrophage Migration and Invasion Is Regulated by MMP10 Expression. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, 14 maio 2013.

NAGY, I. *et al.* In vitro interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. *BMC Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 122, 29 maio 2011.

NAZARIAN, R. M. *et al.* Novel CARD9 mutation in a patient with chronic invasive dermatophyte infection (tinea profunda). *Journal of Cutaneous Pathology*, 2020.

NETEA, M. G. *et al.* An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology* 2008 6:1, v. 6, n. 1, p. 67, 1 jan. 2008.

NETEA, M. G. *et al.* Human dendritic cells are less potent at killing *Candida albicans* than both monocytes and macrophages. *Microbes and Infection*, v. 6, n. 11, p. 985–989, 1 set. 2004.

OHMATSU, H. *et al.* IL32 is progressively expressed in mycosis fungoides independent of helper T-cell 2 and helper T-cell 9 polarization. *Cancer immunology research*, 2014.

PAPIC, N. *et al.* RNA-Sequencing Analysis of 5' Capped RNAs Identifies Many New Differentially Expressed Genes in Acute Hepatitis C Virus Infection. [S.l.: s.n.], 2012.

PATIN, E. C. *et al.* IL-27 Induced by Select *Candida* spp. via TLR7/NOD2 Signaling and IFN- β Production Inhibits Fungal Clearance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 197, n. 1, p. 208–21, 2016.

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.

PETRUCELLI, M. *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.

PETRUCELLI, 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, 2018.

PETRUCELLI, M. F. *et al.* Epidemiology and diagnostic perspectives of dermatophytoses. *Journal of Fungi*. [S.l.: s.n.], 2020

PINKE, K. H. *et al.* Decreased production of proinflammatory cytokines by monocytes from individuals presenting *Candida*-associated denture stomatitis. *Cytokine*, v. 77, p. 145–151, 1 jan. 2016.

QIAN, X. *et al.* RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics. *Omics : a journal of integrative biology*, v. 18, n. 2, p. 98–110, 2014.

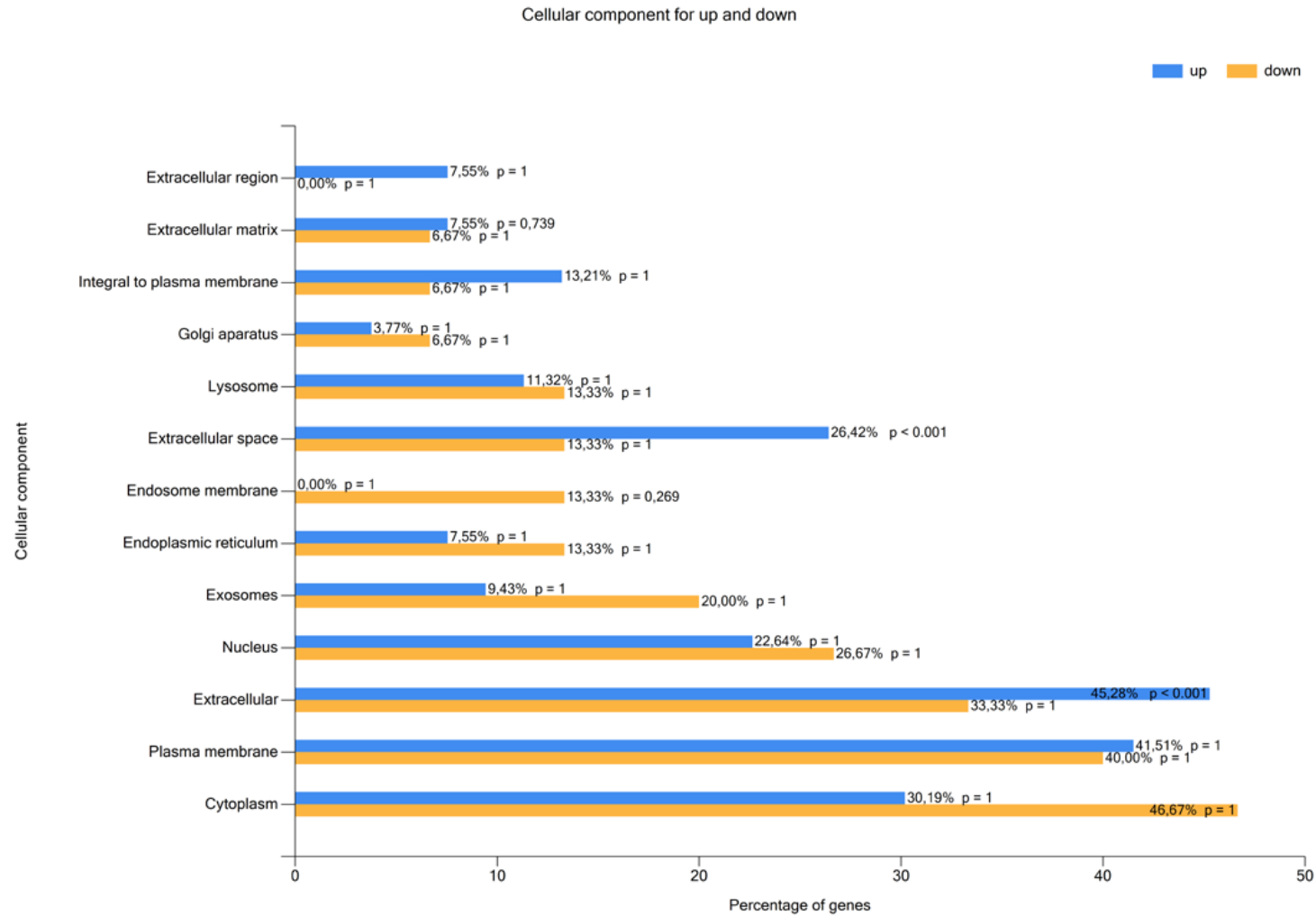
- QUINTANS, J. S. S. *et al.* Monoterpenes modulating cytokines - A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 123, n. October 2018, p. 233–257, 2019.
- REALES-CALDERÓN, J. A. *et al.* Candida albicans induces pro-inflammatory and anti-apoptotic signals in macrophages as revealed by quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Journal of Proteomics*, v. 91, p. 106–135, 2013.
- RINCON, M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends in Immunology*, v. 33, n. 11, p. 571–577, 2012.
- SAI, M. B. S. *et al.* SPECIATION AND IN VITRO ACTIVITY OF FOUR ANTIFUNGAL DRUGS AGAINST CLINICAL ISOLATES OF DERMATOPHYTES BY E-TEST METHOD. *International Journal of Scientific Research*, v. 8, n. 6, 28 jun. 2019.
- SAMARAS, S. E. *et al.* Global deletion of ankrd1 results in a wound-healing phenotype associated with dermal fibroblast dysfunction. *American Journal of Pathology*, v. 185, n. 1, p. 96–109, 1 jan. 2015.
- SANTIAGO, K. *et al.* Monocyte-Derived Dendritic Cells from Patients with Dermatophytosis Restrict the Growth of Trichophyton rubrum and Induce CD4-T Cell Activation. v. 9, n. 11, p. 1–8, 2014.
- SEGURA, G. G. *et al.* Cellular and molecular response of macrophages thp-1 during co-culture with inactive trichophyton rubrum conidia. *Journal of Fungi*, v. 6, n. 4, p. 1–14, 2020.
- SEO, J.-K. *et al.* Dermal Infection with Trichophyton rubrum in an Immunocompetent Patient. *Annals of Dermatology*, v. 31, n. Suppl, p. S32, 2019.
- SHAHI, H.; KIAEE, F. Association between expression of interleukin-32 gene and various helicobacter pylori virulence factors in human infected gastric biopsy. *Acta Medica Iranica*, 2020.
- SHARMA, O. *et al.* A Review of the Progress and Challenges of Developing a Vaccine for COVID-19. *Frontiers in Immunology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A.
- SHERILL, J. D. *et al.* b r i e f c o m m u n i c a t i o n s Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. *Nature Publishing Group*, v. 42, n. 4, p. 289–291, 2010.
- SHIMAMURA, T.; KUBOTA, N.; SHIBUYA, K. *Animal model of dermatophytosis*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. [S.l.: s.n.], 2012
- SHIN, M. D. *et al.* COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. *Nature Nanotechnology*. [S.l.]: Nature Research.
- SHIOYA, M. *et al.* Epithelial overexpression of interleukin-32 α in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 149, n. 3, p. 480–486, set. 2007.
- SIQUEIRA, E. R. *et al.* Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2006.
- SOUZA, L. K. H. *et al.* Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiania, Brazil. *Mycoses*, v. 53, n. 1, p. 68–71, 1 jan. 2010.

- SPARBER, F. *et al.* Langerin+ DCs regulate innate IL-17 production in the oral mucosa during *Candida albicans*-mediated infection. *PLoS pathogens*, v. 14, n. 5, p. e1007069, 2018.
- STAVRUM, R. Modulation of Transcriptional and Inflammatory Responses in Murine Macrophages by the Mycobacterium tuberculosis Mammalian Cell Entry (Mce) 1 Complex. v. 6, n. 10, 2011.
- STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. B. Phagocytosis : Elegant Complexity Review. v. 22, p. 539–550, 2005.
- SU, H. *et al.* Trichophyton rubrum Infection Characterized by Majocchi's Granuloma and Deeper Dermatophytosis: Case Report and Review of Published Literature. *Mycopathologia*, v. 182, n. 5–6, p. 549–554, 1 jun. 2017.
- SURAM, S. *et al.* Cytosolic Phospholipase A 2 α and Eicosanoids Regulate Expression of Genes in Macrophages Involved in Host Defense and Inflammation. v. 8, n. 7, p. 1–17, 2013.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 6, n. 10, p. a016295, 4 set. 2014.
- TOKURA, Y.; KOBAYASHI, M.; KABASHIMA, K. Epidermal chemokines and modulation by antihistamines, antibiotics and antifungals. *Experimental Dermatology*, v. 17, n. 2, p. 81–90, 1 fev. 2008.
- TOUSSAINT, F.; STICHERLING, M. Multiple Dermal Abscesses by Trichophyton rubrum in an Immunocompromised Patient. *Frontiers in medicine*, v. 6, p. 97, 2019.
- TROTTIER, C. A. *et al.* Beyond the superficial: Disseminated trichophyton rubrum infection in a kidney transplant recipient. *Open Forum Infectious Diseases*, 2020.
- VACCINES, C.-19. *COVID-19 vaccines*. . [S.l.]: National Library of Medicine (US).
- WANG, M. *et al.* Mannan-binding lectin directly interacts with Toll-like receptor 4 and suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine secretion from THP-1 cells. *Cellular and Molecular Immunology*, 2011.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.
- WARYCHA, M. A. *et al.* Deep dermatophytosis caused by Trichophyton rubrum. *Dermatology online journal*, v. 17, n. 10, p. 21, 15 out. 2011.
- XIA, S. *et al.* Effect of an Inactivated Vaccine Against SARS-CoV-2 on Safety and Immunogenicity Outcomes: Interim Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 324, n. 10, p. 951–960, 8 set. 2020.
- XU, X. *et al.* Proteogenomic analysis of trichophyton rubrum aided by RNA sequencing. *Journal of Proteome Research*, v. 14, n. 5, p. 2207–2218, 2015.
- 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.

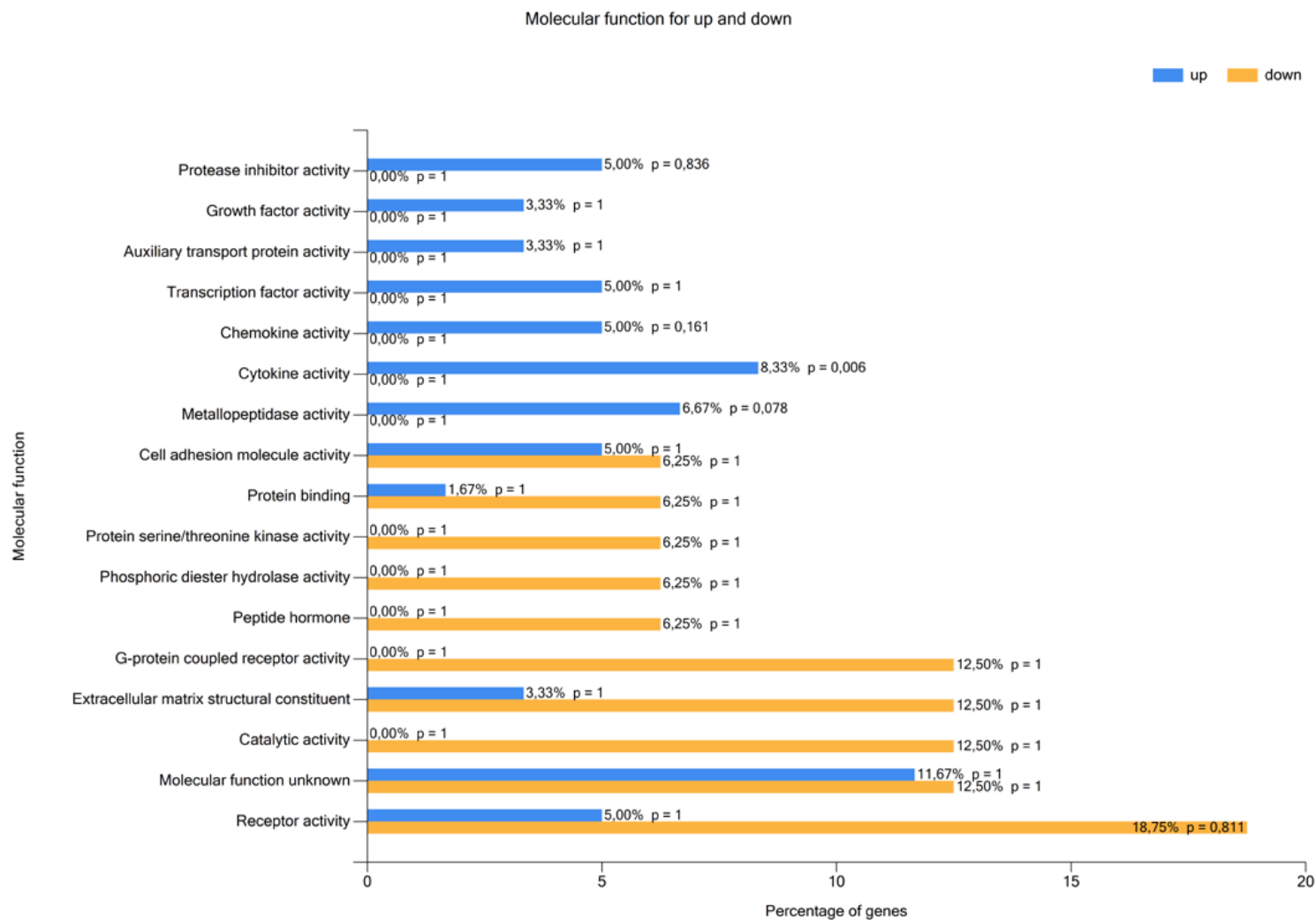
- YOSHIKAWA, Y. *et al.* The Role of Phagocytes and NETs in Dermatophytosis. p. 263–272, 2017.
- YUAN, X.; HUA, X.; WILHELMUS, K. R. Proinflammatory chemokines during *Candida albicans* keratitis. *Experimental Eye Research*, v. 90, n. 3, p. 413–419, 2010.
- YUAN, X.; MITCHELL, B. M.; WILHELMUS, K. R. Expression of Matrix Metalloproteinases during Experimental *Candida albicans* Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 50, n. 2, p. 737, 1 fev. 2009.
- ZEPP, J. A. *et al.* Protection from RNA and DNA Viruses by IL-32. *The Journal of Immunology*, v. 186, n. 7, p. 4110–4118, 1 abr. 2011.
- ZHAN, P. *et al.* Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Studies in Mycology*, 2018.
- ZHANG, G. *et al.* Resolution of PMA-Induced skin inflammation involves interaction of IFN- γ and ALOX15. *Mediators of Inflammation*, 2013.
- ZHANG, MINGRUI *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.
- ZHANG, MINGWANG *et al.* Specific microRNA/mRNA expression profiles and novel immune regulation mechanisms are induced in THP-1 macrophages by in vitro exposure to *Trichosporon asahii*. *Mycoses*, 2021.
- ZHAO, J. *et al.* Combination of sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) agonist and antiviral drug: a potential therapy against pathogenic influenza virus. *Scientific Reports*, 2019.

8. ANEXOS

Anexo 1:



Categorização funcional baseada em genes diferencialmente expressos. Componente Celular.



Categorização funcional baseada em genes diferencialmente expressos. Função Molecular.

Anexo 3: Genes provenientes do RNA-seq do co-cultivo de macrófago THP-1 com CGI de *T. rubrum* com.corte de Log2 Fold Change +/- 1 Total 83 gens. p<0,05.

ID	Log2FoldChange	Gene Product Name
CRLF2	2.79	cytokine receptor like factor 2
GREM1	2.75	gremlin 1, DAN family BMP antagonist
EBF1	2.59	EBF transcription factor 1
MMP10	2.41	matrix metalloproteinase 10
ANKRD1	2.21	ankyrin repeat domain 1
LIF	2.14	LIF interleukin 6 family cytokine
HIVEP2	2.12	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2
CCL24	1.92	C-C motif chemokine ligand 24
SLC43A2	1.92	solute carrier family 43 member 2
CSF1	1.90	colony stimulating factor 1
CXCL3	1.88	C-X-C motif chemokine ligand 3
TFPI2	1.88	tissue factor pathway inhibitor 2
GRASP	1.86	general receptor for phosphoinositides 1 associated scaffold protein
NR4A3	1.81	nuclear receptor subfamily 4 group A member 3
ATP1B4	1.78	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting family member beta 4
PRSS22	1.77	serine protease 22
COL12A1	1.75	collagen type XII alpha 1 chain
CXCL1	1.72	C-X-C motif chemokine ligand 1
CXCL8	1.71	C-X-C motif chemokine ligand 8
MGLL	1.68	monoglyceride lipase
MGAM	1.67	maltase-glucoamylase
IFI44L	1.57	interferon induced protein 44 like
FMN1	1.51	formin 1
BAALC-AS2	1.49	BAALC antisense RNA 2
TMEM119	1.43	transmembrane protein 119
FAM216B	1.41	family with sequence similarity 216 member B
SLC28A3	1.40	solute carrier family 28 member 3
NRG1	1.37	neuregulin 1
P3H2	1.37	prolyl 3-hydroxylase 2
SCG5	1.36	secretogranin V
CLEC5A	1.36	C-type lectin domain containing 5A
TNFAIP6	1.35	TNF alpha induced protein 6
MMP8	1.35	matrix metalloproteinase 8
BIRC3	1.33	baculoviral IAP repeat containing 3
TNFRSF18	1.30	TNF receptor superfamily member 18
MME	1.30	membrane metalloendopeptidase
SERPINE1	1.29	serpin family E member 1
IFIT1	1.28	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1
SYN2	1.28	synapsin II
IL32	1.27	interleukin 32

TIMP4	1.27	TIMP metallopeptidase inhibitor 4
KIAA1644	1.25	[]
PHF24	1.23	PHD finger protein 24
MET	1.23	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
SRC	1.21	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
LOC653513	1.19	[]
HR	1.18	HR lysine demethylase and nuclear receptor corepressor
CLDN1	1.17	claudin 1
FCAR	1.17	Fc fragment of IgA receptor
IGFN1	1.16	immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1
TNF	1.16	tumor necrosis factor
TGFB3	1.16	transforming growth factor beta 3
TDRD6	1.15	tudor domain containing 6
LINC00877	1.15	long intergenic non-protein coding RNA 877
SEMA3C	1.14	semaphorin 3C
CXCL2	1.10	C-X-C motif chemokine ligand 2
NCF1	1.09	neutrophil cytosolic factor 1
MX1	1.06	MX dynamin like GTPase 1
STC1	1.05	stanniocalcin 1
MMP9	1.05	matrix metallopeptidase 9
TRAF1	1.05	TNF receptor associated factor 1
RRAD	1.05	RRAD, Ras related glycolysis inhibitor and calcium channel regulator
SOD2	1.04	superoxide dismutase 2
LINC01050	1.02	long intergenic non-protein coding RNA 1050
TBX21	1.00	T-box 21
CD1D	-1.03	CD1D molecule
PLK2	-1.04	polo like kinase 2
TLR7	-1.04	toll like receptor 7
ROBO4	-1.05	roundabout guidance receptor 4
TLR8	-1.05	toll like receptor 8
C2orf91	-1.08	chromosome 2 open reading frame 91
VCAN	-1.11	versican
SH3TC2	-1.13	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2
MMRN2	-1.19	multimerin 2
PDE7B	-1.20	phosphodiesterase 7B
FCGBP	-1.22	Fc fragment of IgG binding protein
HPSE	-1.24	heparanase
NLRP12	-1.26	NLR family pyrin domain containing 12
LINC01537	-1.31	long intergenic non-protein coding RNA 1537
BBOX1	-1.44	gamma-butyrobetaine hydroxylase 1
NTS	-1.67	neurotensin
S1PR1	-1.69	sphingosine-1-phosphate receptor 1
P2RY12	-1.88	purinergic receptor P2Y12