

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

Jordane Clarisse Pimenta Gaggino

Papel do eosinófilo na candidíase oral induzida em animais imunossuprimidos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniele da Glória de Souza

Belo Horizonte

2019

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Papel do eosinófilo na candidíase oral induzida em animais imunossuprimidos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas: Microbiologia.

Jordane Clarisse Pimenta Gaggino

Belo Horizonte

2019

043 Gaggino, Jordane Clarisse Pimenta.
Papel do eosinófilo na candidíase oral induzida em animais
imunossuprimidos [manuscrito] / Jordane Clarisse Pimenta Gaggino. – 2019.

86 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa Daniele da Gloria de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Departamento de Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Imunossupressão. 3. Candidíase oral. 4. Eosinófilos. 5.
Dexametasona. 6. Fluoruracila. I. Souza, Daniele da Gloria de. II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Jordane Clarisse Pimenta Gaggino
Nº REGISTRO: 2017665996

Às 14 horas do dia 20 março de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Daniel de Assis Santos (UFMG), Patrícia Campi Santos (UFMG) e a Profa. Daniele da Glória de Souza-Orientadora, para julgar o trabalho final "PAPEL DO EOSINÓFILO NA CANDIDÍASE ORAL INDUZIDA EM ANIMAIS IMUNOSSUPRIMIDOS", da aluna, **Jordane Clarisse Pimenta Gaggino**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de março de 2019.

Dr. Daniel de Assis Santos

Dr^a. Patrícia Campi Santos

Prof^a. Daniele da Glória de Souza (Orientadora)

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

RESUMO

O aumento da expectativa de vida populacional tem contribuído para a instalação de quadros de imunossupressão. Além disso, o aumento da prevalência de doenças crônicas e autoimunes resulta em maior uso de corticoides, quimioterápicos citotóxicos e terapias imunossupressoras pós-transplantes. Esses tratamentos podem comprometer o sistema imune e desencadear infecções oportunistas, como a candidíase. A candidíase oral é uma infecção fúngica oportunista que tem aumentado sua incidência nas últimas décadas. Tem como agente etiológico fungos do gênero *Candida* ssp, principalmente a espécie *C. albicans*. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi padronizar modelos de candidíase oral em camundongos imunossuprimidos pelo corticoide dexametasona e pelo anti-neoplásico 5-FU a fim de estudar a patogênese da doença e o papel de eosinófilos nessa infecção. Foram utilizados camundongos selvagens (WT) da linhagem C57BL/6 e BALB/c. Foi realizada uma padronização para definição do inóculo a ser utilizada e uma cinética de infecção após a inoculação sublingual de *C. albicans* e diversos parâmetros foram avaliados. Nossos resultados com dexametasona demonstram que a infecção por *C. albicans* em camundongos imunossuprimidos induziu uma menor resposta inflamatória frente à infecção, demonstrada por um menor recrutamento de neutrófilos e macrófagos para os sítios de infecção e maior carga fúngica na língua e baço dos animais. Os camundongos infectados apresentaram uma perda de peso corporal significativa em relação ao controle. Ainda, demonstramos alterações histopatológicas importantes na língua dos animais tratados com 5-FU como a perda total da arquitetura tecidual. Além disso, nós notamos através da utilização do antitumoral 5-FU que os camundongos ficam extremamente imunossuprimidos e susceptíveis à candidíase oral, com elevada carga fúngica. Ao utilizar camundongos deficientes em eosinófilos ($\Delta db/Gata1^{-/-}$) observamos que o curso da doença induzida pela infecção oral por *C. albicans* associado ao tratamento com 5-FU é mais brando e está associado a melhora dos parâmetros clínicos e inflamatórios descritos anteriormente. De maneira geral, desenvolvemos dois modelos experimentais em camundongos WT imunossuprimidos que mimetizam alguns parâmetros da candidíase oral clínica. Ainda, demonstramos que, muitas vezes, os eosinófilos podem causar danos ao hospedeiro frente à infecção por *C. albicans*. Estes modelos contribuirão para a elucidação de futuros mecanismos associados à patogênese da interação *C. albicans*-hospedeiro e no desenvolvimento de novos potenciais terapêuticos.

Palavras chave: candidíase oral; imunossupressão; eosinófilos; 5-FU; Dexametasona

ABSTRACT

The increase in life expectancy as well as the modern lifestyle has contributed to the establishment of immunosuppressive conditions. In addition, the increased prevalence of chronic and autoimmune diseases results in increased use of corticosteroids, cytotoxic chemotherapeutics, and post-transplant immunosuppressive therapies. These treatments can compromise the immune system and trigger opportunistic infections such as candidiasis. Oral candidiasis is an opportunistic fungal infection that has increased its incidence in the last decades. It has as etiological agent fungi of the genus *Candida* ssp, mainly the species *C. albicans*. In this context, the objective of this study was to standardize models of oral candidiasis in mice immunosuppressed by corticoid dexamethasone and anti-neoplastic 5-FU in order to study the pathogenesis of the disease and the role of eosinophils in this infection. Wild mice (WT) of the C57BL/6 and BALB/c strain were used. The standardization was done to define the inoculum to be used and an infection kinetics after sublingual inoculation of *C. albicans* and several parameters were evaluated. Our results with dexamethasone demonstrate that *C. albicans* infection in immunosuppressed mice induced a lower inflammatory response to infection, demonstrated by a lower recruitment of neutrophils and macrophages to the sites of infection and increased fungal load on the tongue and spleen of the animals. The infected mice showed a significant body weight loss in relation to the control. Furthermore, we demonstrated important histopathological changes in the tongue of animals treated with 5-FU as the total loss of tissue architecture. In addition, we demonstrate through the use of anti-tumor 5-FU that mice are extremely immunosuppressed and susceptible to oral candidiasis, with high fungal load. We used eosinophil-deficient mice ($\Delta db / Gata1^{-/-}$) and found that the course of disease induced by oral infection by *C. albicans* associated with 5-FU treatment is milder and is associated with an improvement in the clinical and inflammatory parameters previously describe. In general, we developed two experimental models in immunosuppressed WT mice that mimic most of the parameters of clinical oral candidiasis. Furthermore, we have shown that eosinophils can often cause damage to the host against *C. albicans* infection. These models will contribute to the elucidation of future mechanisms associated with the pathogenesis of *C. albicans*-host interaction and the development of new therapeutic potentials.

Key words: oral candidiasis; immunosuppression; eosinophils; 5-FU; Dexamethasone.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcento

5-FU- 5-Fluorouracil

ALS- *Agglutinin-like sequence*

APC- Células apresentadoras de antígenos

°C – grau Celcius - Escala de medida de temperatura

C. albicans- fungo *Candida albicans*

Candida ssp- espécies do gênero *Candida*

CCL- Quimiocina CC Ligante

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CLR- receptor do tipo lectina C

CO- Candidíase oral

CXCL – Quimiocina CXC Ligante

DC- Células dendríticas

DEX- Dexametasona

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPO- Peroxidase de eosinófilos

ERNs- Espécies reativas de nitrogênio

EROs- espécies reativas de oxigênio

g- grama

h – hora – unidade de tempo

H&E – Hematoxilina & Eosina

HSP: Família de proteínas de choque térmico

HTAB - *Hexadecyltrimethylammonium Bromide* – Brometo de hexadeciltrimetilamónio

IFN – Interferon

IL – *Interleukin* – *Interleucina*

ILC- Célula linfoide inata

i.p- intraperitoneal

µL- Microlitro- Unidade de volume

mL – Mililitro – Unidade de volume

MAPK1- Proteína quinase 1 ativada por mitógenos

MPO – Mieloperoxidase

N.D – Não detectável

NAG – N-acetilglicosaminidase

NETs- armadilhas extracelulares de neutrófilos

NF-κB- Fator nuclear κB

NK – *Natural Killer*

NOD- Receptor do tipo NOD

OPD – *O-Phenylenediamine Dihydrochloride* – Orto-fenilenodiamina

PAMPs- Padrões moleculares associados a patógenos

PAS- Ácido periódico de Shiff

PBS – *Phosphate-Buffered Saline* – Solução salina tamponada com fosfato

PMN – Polimorfonuclear

PRRs- Receptor reconhecedor de padrão

RLR- Receptor do tipo RIG-I

SAP- aspartil proteases secretadas

SSA- membros da família das proteínas de choque térmico

TCR- Receptor de célula T

TLR- receptor do tipo Toll

TNF – Fator de necrose tumoral

Treg- Células T reguladoras

TS- Timidilato sintase

UFC- Unidades formadoras de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WT – *Wild Type* – Animais selvagens

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia das formas de levedura, hifas e pseudo-hifas.

Figura 2: Diagrama das interações de *Candida albicans* com células epiteliais orais, peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) e microbiota oral.

Figura 3: Colonização versus invasão.

Figura 4: Cooperação dos sistemas imune inato e adaptativo em infecções fúngicas.

Figura 5: Esquema representativo dos mecanismos antineoplásicos do 5-fluorouracil (5-FU).

Figura 6: Fases da mucosite.

Figura 7: Protocolo experimental para indução de imunossupressão pelo corticoide dexametasona e pelo antitumoral 5-FU em camundongos C57BL/6 e BALB/c.

Figura 8: Carga fúngica de animais infectados com *C. albicans* por via sublingual.

Figura 9: Animais tratados com DEX e infectados com *C. albicans* apresentam maior perda de peso.

Figura 10: Carga fúngica de animais infectados com *C. albicans* após 5, 7 e 10 dias de infecção.

Figura 11: A infecção por *Candida albicans* após sete dias induz aumento do recrutamento de neutrófilos no baço e maior recrutamento de macrófagos em ambos os tecidos.

Figura 12: Contagem total de leucócitos do sangue de animais após dois dias de infecção por *C. albicans*.

Figura 13: Carga fúngica de animais infectados com *C. albicans* por via sublingual ,tratados com DEX ou veículo.

Figura 14: A infecção oral por *C. albicans* e tratamento com DEX induz aumento do recrutamento de neutrófilos e macrófagos no baço dos camundongos.

Figura 15: A infecção oral por *C. albicans* induz maior perda de peso corporal em camundongos tratados com DEX.

Figura 16: Seções histológicas do dorso da língua de camundongos com candidíase oral.

Figura 17: Seções histológicas do dorso da língua de camundongos com candidíase oral.

Figura 18: Escore histopatológico e infiltrado inflamatório na língua de camundongos com candidíase oral.

Figura 19: Letalidades induzidas pelas doses de 75 e 150 mg/kg de 5-FU.

Figura 20: Perda de peso corporal induzida pelas doses de 75 e 150 mg/Kg de 5-FU.

Figura 21: Score clínico referente ao uso de 5-FU nas doses de 75 e 150 mg/Kg.

Figura 22: Contagem total de leucócitos do sangue de animais tratados com 5-FU (75 mg/Kg) e infectados com *C.albicans* após 2 dias de infecção.

Figura 23: Carga fúngica em animais tratados com 5-FU após dois dias de infecção por *C. albicans*.

Figura 24: Animais tratados com 5-FU 75 mg/Kg infectados com *C. albicans* têm redução do recrutamento de neutrófilos na língua e no baço no segundo dia de infecção.

Figura 25: Níveis de citocina e quimiocinas em animais tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans* após dois dias de infecção.

Figura 26: O tratamento com DF 2156A não altera a depuração fúngica.

Figura 27: O recrutamento de neutrófilos, em animais tratados com DF 2156A, foi significativamente reduzido no baço e não detectável na língua.

Figura 28: O tratamento com DF 2156A não altera, significativamente, a perda de peso corporal induzida por 5-FU e pela infecção por *C. albicans*.

Figura 29: Contagem total de leucócitos em animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*.

Figura 30: Score clínico de animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*.

Figura 31: A carga fúngica dos animais $\Delta db/Gata1^{-/-}$ infectados com *C. albicans* é menor que a dos WT *C. albicans*.

Figura 32: Recrutamento de neutrófilos e macrófagos em animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*.

Figura 33: Níveis de citocinas e quimiocinas em animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*.

Figura 34: Seções histológicas da língua de animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*.

Figura 35: Escore histopatológico e infiltrado inflamatório da língua de animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1. <i>Candida albicans</i> : de comensal à patógeno.....	12
1.1.1 Fatores de virulência	16
1.1.2 Colonização x invasão.....	22
1.2 CANDIDÍASE	24
1.2.1 Candidíase oral (CO).....	25
1.3 INTERAÇÃO <i>Candida albicans</i> /hospedeiro.....	27
1.4 IMUNOSSUPRESSÃO.....	36
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. METODOLOGIA	44
4.1 ANIMAIS	44
4.2. <i>Candida albicans</i>	44
4.3 DROGAS UTILIZADAS	45
4.4 INDUÇÃO DE CANDÍDÍASE ORAL EXPERIMENTAL.....	45
4.4.1 Preparo do inóculo.....	45
4.4.2 Carga fúngica.....	46
4.5. INDUÇÃO DE IMUNOSSUPRESSÃO NOS ANIMAIS	46
4.6 DETECÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILOS (MPO)	47
4.7 DETECÇÃO INDIRETA DE MACRÓFAGOS (NAG).....	48
4.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS	49
4.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	50

4.10 AVALIAÇÃO DA GRADUAÇÃO CLÍNICA DA MUCOSITE ASSOCIADA À CANDIDÍASE ORAL	50
4.11 ANÁLISE DO LEUCOGRAMA	50
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5. RESULTADOS	52
5.1 Padronização de candidíase oral em modelo de imunossupressão utilizando dexametasona.....	52
5.1.1 Em animais C57BL/6.....	52
5.1.2 Em animais BALB/c.....	55
5.2. Padronização da candidíase oral em modelo de imunossupressão utilizando o quimioterápico 5-FU.....	62
5.2.1 Testes de doses de 5-FU em camundongos C57/BL6.....	62
5.2.2 Definição do tempo de infecção oral por <i>C. albicans</i> em animais tratados com 5-FU(75mg/Kg).....	64
5.2.3 Efeito do antagonista do receptor CXCR2 na candidíase oral em animais tratados com 5-FU.....	68
6. Modelo de candidíase oral associada ao quimioterápico 5-FU 75 mg/Kg em animais BALB/c WT e BALB/c deficientes em eosinófilos ($\Delta db/Gata1^{-/-}$)	70
6.1 Alterações da resposta imune induzidas pela infecção oral com <i>C. albicans</i> em animais Balb/c, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratados com 5-FU 75 mg/Kg	70
6.2 Alterações histopatológicas induzidas pela infecção oral com <i>C. albicans</i> em animais Balb/c, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU 75 mg/K.....	75
7. DISCUSSÃO.....	84
ANEXO 1	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Candida albicans*: de comensal à patógeno

A população humana tem passado pelos processos de transição demográfica e epidemiológica caracterizadas pela modernização e elevação da expectativa de vida. Nas duas últimas décadas as doenças de etiologia fúngica têm se tornado um grave problema de saúde pública e isso reflete o expressivo aumento no número de pessoas com algum comprometimento do sistema imune (Vallabhaneni *et al.*, 2016). Essa alta incidência de micoses tem sido relacionada a fatores como o número crescente de transplantes de órgãos e a consequente utilização de terapias imunossupressoras, com o aumento de pessoas com câncer e diabetes (Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2014), pelo envelhecimento da população que vem acompanhado de comorbidades, ao aumento na quantidade de pacientes que recebem alimentação através de cateteres ou sondas e uso de antibióticos de amplo espectro, bem como pela alta taxa de indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Terças *et al.* 2017).

Poucos estudos multicêntricos foram publicados no Brasil, abordando a incidência de candidemia, de populações suscetíveis, de taxas brutas de mortalidade, etiologia e taxas de resistência antifúngica *in vitro* (Doi *et al.*, 2016). O estudo mais recente foi realizado pela Vigilância e Controle Brasileiro de Agentes Patogênicos de Importância Epidemiológica (BrSCOPE) e envolveu 16 hospitais públicos e privados participantes das cinco regiões do Brasil. Relataram que *Candida* spp foi a 7^a causa mais prevalente (5,6%) de infecção da corrente sanguínea nosocomial entre todos os patógenos estudados no SCOPE Brasil e foi responsável por 72,2% da taxa de mortalidade desse estudo. A ordem de classificação dos principais isolados *Candida* spp foi *C. albicans* (34,3%), *Candida parapsilosis* (24,1%), *Candida tropicalis* (15,3%), *Candida glabrata* (10,2%), *Candida krusei* (1,5%), *Candida pelliculosa* (1,5%), *Candida lusitaniae* (0,7%), *Candida famata* (0,7%) e *Candida guilliermondii* (0,7%) (Doi *et al.*, 2016). Além disso, dados relatados por uma pesquisa nacional de prevalência pontual realizada em 183 centros nos

EUA revelaram que *Candida* spp se tornou o microrganismo mais comum de infecções da corrente sanguínea (Magill *et al.*, 2014; Doi *et al.*, 2016).

A espécie *Candida albicans* foi descrita pela primeira vez há aproximadamente 150 anos e, atualmente, é reconhecida como o mais importante fungo comensal e patogênico de seres humanos (Noble *et al.* 2016). Como comensal, *C.albicans* coloniza o trato gastrointestinal, a pele e o trato genitourinário feminino de pelo menos 70 % de adultos saudáveis. Todavia, a colonização pode se tornar patogênica se os hospedeiros desenvolverem deficiências imunes, danos epiteliais ou disbiose (Noble *et al.* 2016).

A *C. albicans* possui pelo menos quatro tipos celulares diferentes, e dentre esses, as hifas e as leveduras são os mais bem descritos, enquanto pseudo-hifas e clamidósporos são menos caracterizados (Sudbery, 2011; Noble *et al.*, 2016). As leveduras são unicelulares e de maneira geral apresentam morfologia variando de arredondada a oval, se reproduzem por brotamento e a divisão celular é um processo finamente regulado que envolve a divisão nuclear, rearranjo do citoesqueleto e polarização dos componentes citoplasmáticos em direção ao broto em formação. Ao final do processo o broto (célula-filha) se desprende da célula-mãe e no local é formada uma cicatriz constituída de quitina, chamada cicatriz do broto (Noble *et al.* 2016). Em contrapartida, as hifas são estruturas tubulares, pluricelulares, ramificadas ou não, podendo conter um ou mais núcleos por compartimento. Elas podem ser septadas, com septos separando os compartimentos, ou asseptadas (cenocíticas). O alongamento das hifas é apical, com remodelamento da parede celular e extensão em direção à fonte de nutrientes. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio (Carlisle *et al.* 2009; Noble *et al.* 2016).

Quando a divisão celular por brotamento não resulta na separação da célula mãe da filha, forma-se uma estrutura chamada de pseudo-hifa, de forma elipsóide. Além dessa estrutura, são formados ainda os clamidósporos. Esses são estruturas arredondadas, intercalares ou terminais, situados nas hifas. São estruturas formadas durante a propagação vegetativa das hifas e acredita-se que sejam importantes para sobrevivência em condições hostis. Podem ser observadas *in vitro* em certas condições adversas, como escassez de nutrientes e hipóxia (Noble *et al.*, 2016). Embora facilmente indutíveis *in vitro*, os clamidósporos foram raramente observados *in vivo* (Palige *et al.*, 2013; Böttcher *et al.*,

2016), por isso um possível envolvimento de clamidósporos no processo de infecção não é claro (Böttcher *et al.*, 2016).

Essas variações morfológicas de *C. albicans* podem ser consideradas um fator de virulência, pois, geralmente, as hifas e pseudo-hifas são encontradas nos tecidos do hospedeiro quando patogênicas. Elas são intrinsecamente invasivas em meios sólidos, enquanto as leveduras são vistas principalmente como comensais e envolvidas com a disseminação para outros sítios anatômicos (Noble *et al.*, 2016). Por isso, estudos sobre os fatores relacionados às variações morfológicas de *C. albicans* tem sido intensamente investigados, principalmente nas interações fungo-hospedeiro.



Figura 1: Morfologia das formas de pseudo-hifas, levedura e hifas. As barras de escala nos painéis principais representam 5 μm e na inserção no painel de hifa representa 1 mm. Fonte: adaptado de Sudbery, 2011.

Recentemente muitos estudos tem relatado um segundo sistema de transição fenotípica de *C. albicans*, caracterizado pela mudança de levedura branca (padrão) à levedura opaca. Essas transições são epigenéticas e auxiliam os microrganismos a se adaptarem a estímulos externos (Ene *et al.*, 2016). As amostras que são homozigóticas no locus para o tipo de acasalamento ($MTL a / a$ ou $MTL \alpha / \alpha$) podem mudar da forma de levedura branca para uma forma de célula alongada denominada “opaca” (Sasse *et al.*, 2013; Deng & Lin, 2018). Destaca-se, no entanto, que mesmo sem alterações na sequência de DNA (epigenéticas), ocorre transmissão hereditária (Deng & Lin, 2018). As células

opacas são a forma competente para acasalamento de *C. albicans* (Deng & Lin, 2018). A alternância entre as fases branca e opaca ocorre espontaneamente em uma frequência relativamente baixa, mas também pode ser induzida por condições ambientais (Craik *et al.*, 201). As leveduras brancas e opacas possuem diferenças que vão além da competência de acasalamento, pois se diferem na expressão de muitos genes, incluindo adesinas e genes metabólicos, sugerindo que os dois tipos de células são adaptados a diferentes ambientes dentro do hospedeiro (Sasse *et al.*, 2013; Deng & Lin, 2018). As células opacas são melhores colonizadoras da pele, mas são muito menos virulentas do que as células brancas, fato observado em modelo murino de candidíase disseminada (Sasse *et al.*, 2013). Além disso, as células opacas não filamentam na maioria das condições que as leveduras brancas, o que pode resultar em uma capacidade reduzida de invadir os tecidos (Sasse *et al.*, 2013; Deng & Lin, 2018). No entanto, muitos estudos ainda precisam ser realizados para informações mais concretas.

A espécie *Candida albicans* é aprimoradamente adaptada ao hospedeiro e pode formar hifas em várias condições ambientais que refletem a diversidade dos microambientes encontrados no hospedeiro. Podemos citar, por exemplo, que as hifas se formam em resposta à presença de soro, em pH neutro, em CO₂ a 5% (pressão parcial de CO₂ na corrente sanguínea), e na presença de N-acetil-d-glucosamina (GlcNAc) (Sudbery, 2011). Em pH baixo (<6), as células de *C. albicans* crescem predominantemente na forma de levedura, enquanto em pH alto (> 7) o crescimento de hifas é induzido (Mayer *et al.* 2013; Sherrington *et al.*, 2017). A morfogênese também mostrou ser regulada por quorum sensing, um mecanismo de comunicação microbiana (Albuquerque & Casadevall, 2012). As principais moléculas de quorum sensing de *C. albicans* incluem farnesol, tirosol e dodecanol (Hall *et al.*, 2011; Mayer *et al.* 2013).

As provas fisiológicas mais comuns e mais simples para identificação de *Candida albicans* e *Candida* spp são avaliação da formação de tubo germinativo e filamentação em cultivo em lâmina. A formação do tubo germinativo é a base para o teste de diagnóstico clássico para a presença de *C. albicans* em microbiologia médica (Sudbery, 2011). A junção de soro e temperatura de 37° C gera um ambiente extremamente propício para a formação de tubo germinativo a partir de levedura. No cultivo em lâmina, avalia-se a capacidade de produção de hifas hialinas ramificadas. Caso a levedura forme hifas hialinas

ramificadas sem fragmentação, provavelmente pertence ao gênero *Candida* e se houver formação de clamidósporos característicos, é *Candida albicans* (Sudbery, 2011).

1.1.1 Fatores de virulência

A virulência de *C. albicans* está atrelada a uma gama de fatores que incluem a transição morfológica já descrita, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, o tigmotropismo, a formação de biofilme, a variação fenotípica e a secreção de enzimas hidrolíticas (Mayer *et al.*, 2013; Hoyer & Cota, 2016). Além disso, apresenta uma rápida adaptação a flutuações no pH ambiental, flexibilidade metabólica, potentes sistemas de aquisição de nutrientes e maquinarias robustas de resposta ao estresse oxidativo e nitrosativo (Nicholls *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013).

A *C. albicans* possui um conjunto específico de adesinas que permitem a aderência a outras células de *C. albicans*, a outros microrganismos, a superfícies abióticas e a interação com células hospedeiras (Mayer *et al.* 2013; Hoyer & Cota, 2016). Dentre as adesinas de *C. albicans*, as mais bem caracterizadas são as proteínas com sequência semelhante à aglutinina (Als), uma família de proteínas composta por oito membros, Als1-7 e Als9 (Mayer *et al.* 2013; Hoyer & Cota, 2016). Dessas oito proteínas, a Als3 é especialmente importante para a adesão (Mayer *et al.*, 2013; Hoyer & Cota, 2016). Outra importante adesina de *C. albicans* é a Hwp1, que serve como um substrato para transglutaminases de mamíferos e esta reação pode unir covalentemente as hifas às células hospedeiras (Mayer *et al.*, 2013). Alguns trabalhos mostraram que mutantes para Hwp1 apresentaram redução na aderência às células epiteliais bucais, além de virulência atenuada em modelo murino de candidíase sistêmica (Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Diversas proteínas, independentes da morfologia, também podem contribuir para a adesão, como as proteínas ligadas ao glicosilfosfatidilinositol (Eap1, Iff4 e Ecm33), as proteínas associadas de forma não covalente à parede (Mp65, uma suposta β -glucanase e a Phr1, uma β -1,3 glucanosiltransferase), as proteases associadas à superfície celular (Sap9 e Sap10) e a proteína de superfície semelhante à integrina Int1 (Naglik *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016).

Após a adesão às superfícies das células hospedeiras, as hifas de *C. albicans* podem secretar hidrolases que facilitam a penetração ativa nessas células (Wachtler *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Além disso, estudos salientam que as hidrolases aumentam a eficiência na aquisição extracelular de nutrientes (Naglik *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Existem três classes diferentes de hidrolases secretadas por *C. albicans*: são as proteases, fosfolipases e lipases. A família das aspartil proteases secretadas

(Saps) possui dez membros, Sap1-10, sendo que as Sap1-8 são secretadas e liberadas para espaço extracelular, enquanto Sap9 e Sap10 permanecem ligadas à superfície celular (Naglik *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2013). A contribuição de Saps para a patogenicidade de *C. albicans* é controversa, visto que alguns estudos indicam que Saps não são necessárias para invasão do epitélio humano e que as Sap1-6 são dispensáveis para virulência, fato observado em modelo murino de candidíase disseminada (Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). No entanto, a expressão de genes codificadores de Sap em *C. albicans* em amostras mais patogênicas comparadas com amostras menos patogênicas sugere um papel importante para essas proteases na virulência (Moran *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). A família de fosfolipases consiste em quatro classes diferentes (A, B, C e D) (Mayer *et al.*, 2013), contudo apenas os cinco membros da classe B (PLB1-5) são extracelulares e podem contribuir para a patogenicidade através da ruptura das membranas do hospedeiro (Mavor *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 2013). A hidrólise dos fosfolípidos do hospedeiro pelas fosfolipases produz ácidos graxos e um número de moléculas lipofílicas, como o diacilglicerol (DAG), ácidos graxos livres (FFAs), ácido fosfatídico (PA), e liso-fosfolípidos (LPLs) que estão envolvidos em vias de sinalização (Barman *et al.* 2018). A terceira família de hidrolases, as lipases, consiste em 10 membros (LIP1-10) (Mayer *et al.*, 2013;) e têm a função de catalisar a conversão de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol, sendo responsáveis pela desestabilização da membrana do hospedeiro, pela lise de lipídeos e pelo fornecimento de moléculas envolvidas nas sinalizações, assim como as fosfolipases (Mayer *et al.* 2013; Höfs *et al.*, 2016).

Para invadir as células do hospedeiro *C. albicans* pode utilizar dois mecanismos diferentes: endocitose induzida e penetração ativa (Naglik *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Para induzir a endocitose, o fungo expressa proteínas especializadas na superfície celular, as invasinas, que medeiam a ligação a ligantes do hospedeiro, como a E-caderina nas células epiteliais e a N-caderina nas células endoteliais (Dadar *et al.*, 2018) e essa interação leva ao englobamento da célula fúngica pelas célula hospedeira. Mesmo hifas mortas são endocitadas, indicando que tal processo é passivo, pois não requer a ação de células fúngicas viáveis (Höfs *et al.*, 2016; Dadar *et al.*, 2018). Vale ressaltar duas invasinas que as são mais bem descritas na literatura: a Als3 (já mencionada por também ter papel de adesina) e a Ssa1 (Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). A Ssa1 é uma molécula expressa na superfície celular e membro da família da proteína de choque térmico 70 (Hsp70) (Mayer *et*

al., 2013; Höfs *et al.*, 2016). Estudos anteriores demonstraram que o fungo com deleção em Als3 e Ssa1 exibiram reduzida aderência e invasão epitelial, com a consequente redução da virulência em modelo murino de candidíase orofaríngea (Naglik *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Já a penetração ativa é um processo fúngico e necessita de hifas de *C. albicans* viáveis (Wächtler *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013).

Descobriu-se que as hifas de *C. albicans* induzem dano epitelial e ativam a resposta imune inata, principalmente, por meio da secreção de uma toxina citolítica denominada candidalisina, um peptídeo anfipático com estrutura helicoidal codificada pelo gene ECE1 (Moyes *et al.*, 2016). Primeira toxina peptídica a ser identificada em um patógeno fúngico humano e em células epiteliais orais, a candidalisina induz o influxo de íons de cálcio e a liberação de lactato desidrogenase (LDH), que são características de dano celular e desestabilização de membrana (Moyes *et al.*, 2016). Os experimentos realizados com mutantes de *C. albicans*, em que o gene ECE1 inteiro ou a região codificadora de candidalisina foi deletado, mostraram que o fungo tem potencial invasivo eficiente *in vitro*, mas são incapazes de induzir dano tecidual ou liberação de citocinas em modelo murino de candidíase orofaríngea (OPC) (Moyes *et al.*, 2016).

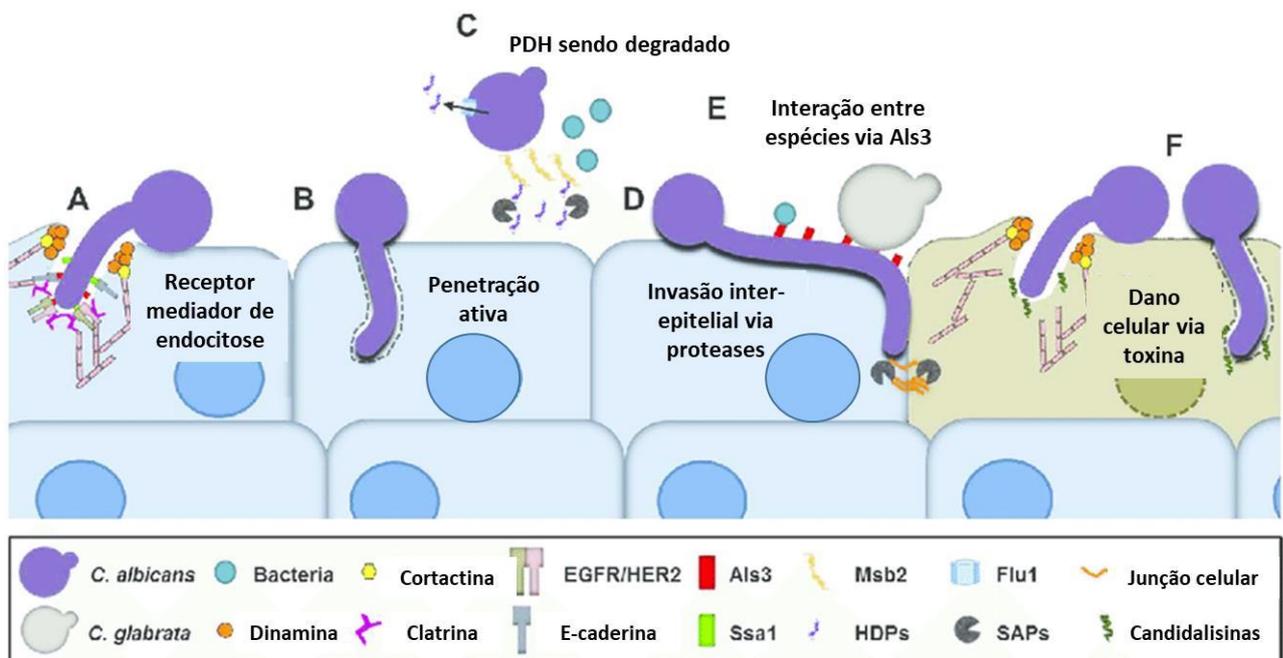


Figura 2: Diagrama das interações de *Candida albicans* com células epiteliais orais, peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) e microbiota oral. (A) invasão de células epiteliais por *C. albicans* por endocitose mediada por receptor. As invasinas Als3 e Ssa1 de *C. albicans* interagem com a E-caderina

e um heterodímero composto pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e HER2, que ativam a via da endocitose da clatrina, resultando na endocitose do fungo. (B) Invasão de *C. albicans* por penetração ativa, em que a hifa progressivamente se alonga e entra na célula epitelial. (C) Os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) liberados pela célula epitelial infectada podem levar à morte de *C. albicans*. No entanto, *C. albicans* pode resistir aos PDHs regulando positivamente a bomba de efluxo Flu1, que reduz os PDHs intracelulares, secretando as SAPs, capazes de degradar as HDPs pela liberação da mucina Msb2, que se liga e inativa os PDHs. (D) *C. albicans* pode invadir células epiteliais orais por degradação proteolítica de proteínas juncionais intercelulares. (E) As hifas de *C. albicans* se ligam à *Candida glabrata* e bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp, o que pode aumentar a capacidade de alguns desses organismos em invadir células epiteliais, enquanto alguns desses organismos podem aumentar a virulência de *C. albicans*. (F) *C. albicans* secreta candidalisina, uma toxina que causa dano epitelial. Fonte: adaptado de Swidergal & Filler, 2017.

A capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas e bióticas também é outro fator de virulência importante para *C. albicans*. Os biofilmes são estruturas constituídas por espessa matriz extracelular amorfa que envolve desde células leveduriformes a hifas e pseudo-hifas de *C. albicans* (Höfs *et al.*, 2016). Quando maduro, células leveduriformes destacam-se do biofilme, sendo essas as responsáveis pela dispersão para outros sítios (Finkel & Mitchell, 2011; Höfs *et al.*, 2016). Os biofilmes possuem resistência aumentada aos antifúngicos devido à complexa arquitetura que o engloba, presença de β -glucanas na matriz extracelular, ao aumento da expressão de bombas de efluxo de drogas e a plasticidade metabólica (Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Em estudos anteriores, identificaram que a principal proteína de choque térmico, Hsp90, é um importante regulador da dispersão de *C. albicans*. (Robbins *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013) e da resistência aos antifúngicos em biofilmes (Robbins *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016).

Várias condições ambientais desencadeiam a morfogênese e a formação de biofilme em *C. albicans*. A detecção por contato está envolvida nesse processo, pois quando as hifas se aproximam de superfícies, como as mucosas, elas realizam o tigmotropismo, que consiste na capacidade de reconhecer junções intercelulares através de sensoriamento promovendo a extensão da porção apical das hifas e penetração no substrato (Mayer *et al.*, 2013). Brand e colaboradores demonstraram que o tigmotropismo das hifas de *C. albicans* é regulado pela captação extracelular de cálcio e esse sensoriamento direcionado é necessário para o dano total das células epiteliais (Brand *et al.*, 2008; Höfs *et al.*, 2016).

C. albicans é extremamente adaptável a diversos nichos ambientais e um dos motivos que permite tal proeza é a capacidade de “sentir” o pH e regulá-lo conforme sua necessidade. No hospedeiro humano, *C. albicans* é exposta a um pH circundante variando de ligeiramente alcalino a ácido (Davis *et al.*, 2009; Höfs *et al.*, 2016). Dependendo do nicho do hospedeiro, as alterações no pH ambiental podem ser dinâmicas, como ocorre no trato gastrointestinal. Para *C. albicans*, pH neutro a alcalino pode causar estresse grave, podendo levar ao mau funcionamento de proteínas e comprometimento na aquisição de nutrientes (devido a interrupção do gradiente de prótons) (Sherrington *et al.*, 2017). Sendo assim, a forma de adaptação da *C. albicans* a mudanças de pH envolve além de indução da filamentação, a expressão de proteínas reguladoras, principalmente a PHR1 e PHR2, que são β -glicosidases de parede celular 1 e 2, respectivamente (Mayer *et al.* 2013). Enquanto a PHR1 é expressa em meio neutro-alcalino, a PHR2 é principalmente expressa em meio ácido (Mayer *et al.*, 2013).

A existência de vias reguladoras de estresse também contribui para a sobrevivência e virulência de *C. albicans*. As respostas celulares aos estresses incluem respostas de choque térmico, osmótico, oxidativo e nitrosativo (Brown *et al.*, 2012). A resposta ao estresse osmótico resulta em acúmulo intracelular de glicerol, soluto que impede a perda de água (Mayer *et al.*, 2013). Espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio, ânions superóxido e radicais hidroxilas, produzidas por células do sistema imune inato, como macrófagos e neutrófilos, induzem um dano oxidativo (Brown *et al.*, 2012) e como resposta *C. albicans* produz enzimas antioxidantes como a catalase Cta1 e as superóxidos dismutase, Sod1 e Sod5, que são cruciais para a eficiente desintoxicação de EROs (Martchenko *et al.*, 2004; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Além desses radicais, macrófagos e neutrófilos produzem espécies reativas de nitrogênio que induzem uma resposta ao estresse nitrosativo em células de *C. albicans* fagocitadas e a principal proteína implicada na proteção e desintoxicação da célula fúngica são as Yhb1 (proteína relacionada com a flavohemoglobina) (Mayer *et al.*, 2013).

A resposta ao choque térmico é uma reação conservada de organismos vivos a condições estressantes, como alta temperatura, privação nutricional e estresse oxidativo (Mayer *et al.*, 2013). Tais tensões podem levar tanto a perda da estrutura das proteínas como a agregação de proteínas não específicas, resultando na morte celular. Sendo assim, como forma de proteção *C. albicans* produz proteínas especializadas ao choque térmico (Hsps) que atuam como chaperonas e previnem o desdobramento e a agregação de proteínas (Richter *et al.*,

2010). Seis Hsps principais foram identificadas em *C. albicans*: Hsp104, Hsp90, Hsp78, duas proteínas Hsp70 (Ssa1 e Ssa2) e Hsp60 (Mayer *et al.*, 2013). A Hsp90 é uma das principais Hsp em *C. albicans* e regula a resistência a drogas, a morfogênese, a formação de biofilme e a virulência (Robbins *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013). Os dois membros da família Hsp70 de *C. albicans*, Ssa1 e Ssa2 são expressos na superfície celular e funcionam como receptores para peptídeos antimicrobianos como, por exemplo, Ssa2 que se liga à histatina 5 (Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao metabolismo, os elementos traços são essenciais para o crescimento e sobrevivência de todos os organismos vivos. Entre os mais importantes para o bom funcionamento de várias proteínas e enzimas estão o ferro, o zinco, o manganês e o cobre (Mayer *et al.*, 2013). Tanto os hospedeiros como os microrganismos patogênicos desenvolveram mecanismos para adquirir ou restringir o acesso a esses elementos (Hood & Skaar, 2012). O mais investigado em processos de patogênese é o ferro e *C. albicans* é capaz de adquiri-lo por diferentes maneiras, incluindo um sistema redutor, um sistema de captação de sideróforos e um sistema de captação de ferro- heme (Almeida *et al.* 2009; Höfs *et al.*, 2016). O sistema redutor modula a aquisição de ferro da ferritina e transferrina hospedeiras ou do ambiente (Mayer *et al.*, 2013). *C. albicans* não sintetiza seus próprios sideróforos, porém o fungo utiliza um sistema de captação para roubar ferro de sideróforos produzidos por outros microrganismos, também conhecidos como xeno-sideróforos. O único transportador de sideróforo descrito em *C. albicans* é Sit1 (Mayer *et al.*, 2013) . E por último, o sistema de captação de ferro-heme que promove aquisição de ferro da hemoglobina e heme proteínas e são mediados pelos membros da família dos receptores heme RBT5, RBT51, CSA1, CSA2 e PGA7 (RBT6) (Almeida *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2013). Foi demonstrado que a adesina e invasina Als3 podem atuar como receptor para a ferritina (Almeida *et al.*, 2008). O zinco é o segundo elemento mais abundante na maioria dos organismos vivos (Hood & Skaar, 2012). Mayer e colaboradores elucidaram um mecanismo de aquisição de zinco por *C. albicans*, em que o fungo secreta a proteína de ligação ao zinco Pra1 (antígeno 1 regulado por pH), que semelhante à aquisição de ferro mediada por sideróforo, age como um zincóforo ligando o zinco extracelular e reassociando-o a célula fúngica. Outros elementos como cobre e o manganês também são essenciais para o crescimento de fungos, no entanto os mecanismos utilizados por *C. albicans* para obtê-los são atualmente pouco compreendidos (Mayer *et al.*, 2013; Hoyer & Cota, 2016).

Como um comensal, *C. albicans* está bem adaptado aos ambientes em rápida transição e, por muitas vezes, com escassez de nutrientes (Miramón *et al.* 2017). De fato, *C. albicans* faz uso de ambas as fontes de carbono, açúcar e não açúcar, durante a infecção (Brown *et al.* 2014; Miramón *et al.* 2017). Como por exemplo, o lactato é abundante em muitos nichos do hospedeiro e *C. albicans* utiliza esse nutriente como um sinal para promover mudanças profundas na arquitetura de sua parede celular (Ene *et al.* 2012; Netea *et al.*, 2015). Essas alterações camuflam os β -glucanos e permite a evasão do sistema imune (Ene *et al.*, 2012; Netea *et al.*, 2015). Além disso, as células cultivadas em meio com disponibilidade de lactato são menos fagocitadas por macrófagos e mais hábeis em escapar do englobamento (Ene *et al.*, 2013; Netea *et al.*, 2015). Já no interior de macrófagos, *C. albicans* é capaz de interferir na acidificação normal do fagolissoma, inibindo a maturação do fagossoma e auto induzindo a morfogênese da hifa, o que contribui para a fuga (e morte) do macrófago tanto pela ruptura física quanto pela indução de piroptose (Vylkova *et al.* 2014).

1.1.2 Colonização X Invasão

A capacidade do sistema imune em realizar a discriminação entre colonização e invasão é crucial para manutenção da homeostase. Os fungos dimórficos como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffei* e *Blastomyces dermatitidis*, geralmente apresentam formas filamentosas quando saprofíticos, mas se transformam em levedura dentro do hospedeiro (May & Casadevall, 2018). Portanto, a morfologia em que o fungo se encontra, pode determinar sua capacidade de colonização ou invasão.

Em relação a *C. albicans* não há conhecimento sobre sua forma saprofítica e esse microrganismo pode crescer tanto como levedura quanto como hifa no hospedeiro (Romani *et al.* 2003). Embora não sendo um dimórfico clássico, as alterações morfológicas de *C. albicans* estão diretamente ligadas à sua virulência (Gow *et al.* 2012; May & Casadevall, 2018) como já descrito.

Existem diferenças estruturais no envoltório externo entre leveduras e hifas. Os β -glucanos das leveduras de *C. albicans* são protegidos contra o reconhecimento do sistema imune pelas manoproteínas, mas se tornam expostos na levedura em desenvolvimento e nas hifas, o que conduz a diferenças nos perfis de ativação do sistema imune por essas células (Davis *et al.* 2014). Em um modelo de tecido epitelial oral humano, as hifas invasoras desencadearam múltiplas vias de sinalização pró-inflamatórias do hospedeiro, enquanto as

leveduras apenas colonizam a superfície do tecido sem causar danos (Moyes *et al.* 2010; Pappas *et al.*, 2018).

Em indivíduos saudáveis, as superfícies mucosas são frequentemente colonizadas por *C. albicans*, no entanto essa colonização não induz dano epitelial, já que o número de células de levedura é pequeno e, além disso, há uma microbiota natural que atua como um antagonista/competidor ao crescimento exacerbado de qualquer espécie. Como consequência disso, há comprometimento da resposta de citocinas induzida a partir das células epiteliais, de macrófagos da mucosa e/ou DCs. Nas leveduras de *C. albicans*, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) responsáveis pela ativação do inflamassoma são ocultados, e a resposta do tipo IL-1 β ou Th17 é prejudicada (Gow *et al.*, 2012; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018).

Como demonstrado na figura 3, as leveduras podem desencadear uma via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), envolvendo MAPKs p38, e levar à ativação dos fatores de transcrição JUN e FOS, mas isso não é suficiente para desencadear uma resposta de citocinas em células epiteliais. A invasão de superfícies mucosas se inicia com a transição da forma leveduriforme para a filamentosa. Nesse caso, as hifas induzem não apenas a via MAPK, normalmente ativada pelas leveduras, mas também uma segunda via de MAPK que leva à ativação da MAPK fosfatase 1 (MKP1), desencadeando a produção de IL-1 α e IL-6. Além disso, as hifas são capazes de ativar o inflamassoma e induzir a produção de IL-1 β por células imunes, como os macrófagos. Tal citocina pode estimular as células Th17 a produzir outros mediadores como a IL-17, que ativa os neutrófilos, e a IL-22 que induz a liberação de defensas pelas células epiteliais (Figura 3) (Gow *et al.*, 2012; Netea *et al.*, 2015). Portanto, o estado colonizador ou invasor de *C. albicans* depende de dois fatores principais: um é o sistema imune do hospedeiro e outro está relacionado aos fatores de virulência desse patógeno (Kabir *et al.* 2012; Campos *et al.*, 2018).

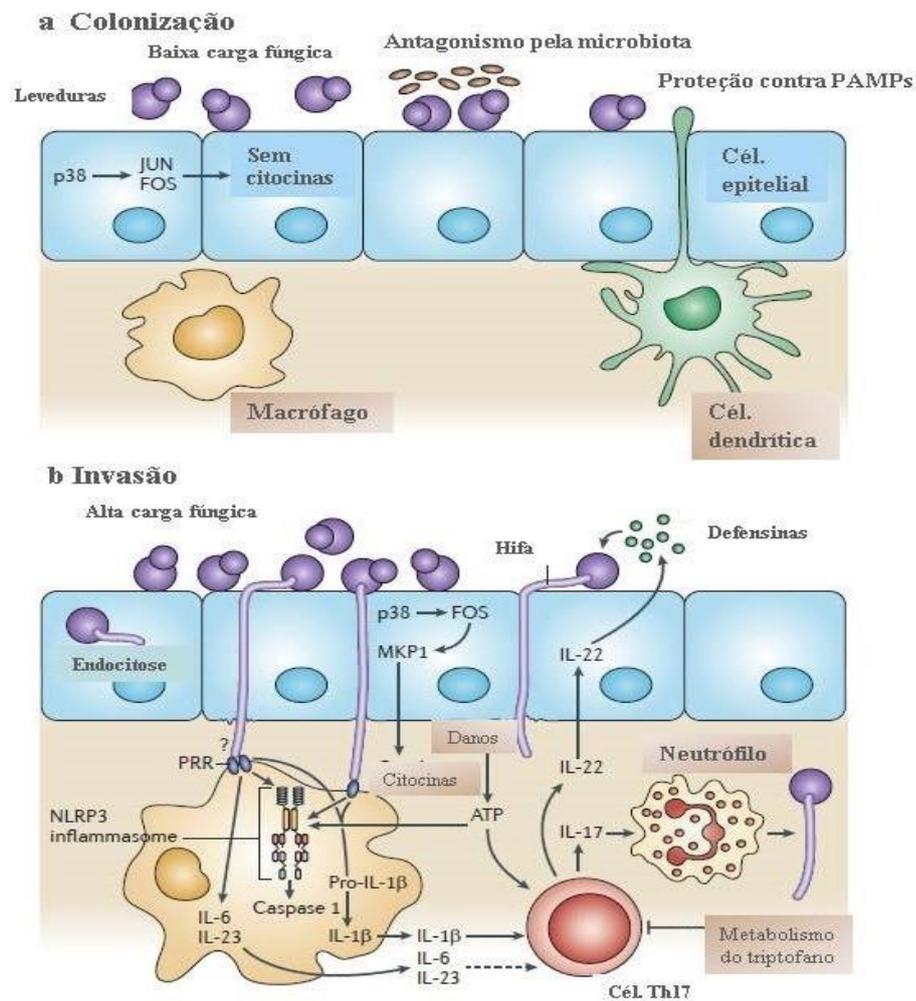


FIGURA 3: Colonização versus invasão. a) Colonização da pele e superfícies mucosas por *C. albicans*. b) Invasão de superfícies mucosas por *C. albicans*. Fonte: adaptado de Gow *et al.*, 2011

1.2 CANDIDÍASE

As espécies de *Candida*, patógenos oportunistas, são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Pfaller *et al.*, 2014; de Oliveira Santos *et al.*, 2018) e podem causar vaginite, candidíase oral, candidíase cutânea e infecções sistêmicas (Wächtler *et al.*, 2012; de Oliveira Santos *et al.*, 2018). A *Candida albicans* é a espécie patogênica mais isolada, no entanto outras espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* estão sendo cada vez mais isoladas, principalmente em indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Mayer *et al.*; de Oliveira Santos *et al.*, 2018).

As células dos fungos, assim como as células humanas, são eucarióticas, e isso gera uma grande dificuldade na elaboração de antifúngicos com toxicidade seletiva, resultando em efeitos colaterais consideráveis aos pacientes, além de menor número de alvos disponíveis para ação de drogas (de Oliveira Santos *et al.*, 2018). Na década de 90 houve um aumento na descoberta de agentes antifúngicos, sendo as equinocandinas a classe de antifúngicos mais recentemente descobertos, no início dos anos 2000 (Paramythiotou *et al.*, 2014). Apesar dos avanços terapêuticos as candidíases continuam sendo infecções altamente prevalentes na população.

1.2.1 Candidíase oral (CO)

A candidíase oral é uma infecção mucosa oportunista causada, na maioria dos casos, pelo fungo *Candida albicans*, e pode prejudicar a fala, a ingestão nutricional e a qualidade de vida (Pankhurst, 2009; HELLSTEIN & MAREK, 2019). A candidíase oral ocorre em 35% dos pacientes com síndrome de Sjogren, em idosos, bebês, usuários de próteses e indivíduos com o vírus do HIV (Conti *et al.*, 2009; HELLSTEIN & MAREK, 2019). Os achados clínicos na candidíase oral são bastante variáveis, podendo ser observados desde quadros localizados, como as estomatites, até formas graves e generalizadas, como a candidíase hiperplásica crônica. Sendo assim, pode-se subdividir clinicamente a candidíase oral em cinco apresentações distintas, pseudomembranosa, atrófica aguda, hiperplásica crônica, queilites angulares e língua negra pilosa (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

A forma pseudomembranosa é a manifestação clínica mais comum da candidíase oral e as lesões são popularmente conhecidas como “sapinho”. Essas lesões ocorrem, principalmente, em recém-nascidos, pois ainda não possuem uma microbiota totalmente formada e, além disso, apresentam um pH ácido, fatores esses que facilitam a colonização da cavidade oral por microorganismos patogênicos (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019). Clinicamente, inicia-se por pequenos pontos esbranquiçados na mucosa e esses vão se tornando confluentes, para formar pseudomembranas de coloração esbranquiçada, aderidas à mucosa e suportadas por um fundo eritematoso, que pode ser vista quando removidas (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019). Esta forma pode ser facilmente diagnosticada pela visualização, em microscópio, de leveduras e de pseudo-hifas no material coletado por swab e também pode ser confirmada

pelo isolamento das espécies em cultura. Nas formas eritematosas, a escassa presença de leveduras na superfície da mucosa, muitas vezes, exige a realização de biópsia para estabelecimento do diagnóstico (Repentigny *et al.*, 2004; Lewis; Williams, 2017).

A candidíase atrófica aguda é uma condição secundária a um quadro pseudomembranoso e pode ser identificada pela presença de eritema visível no dorso da língua. Esse tipo de lesão, bastante dolorosa, pode ser observado também como uma lesão primária em outras regiões da boca e está geralmente associada à antibioticoterapia prévia (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

A candidíase hiperplásica crônica é também conhecida como candidíase leucoplásica e é caracterizada por placas brancas, fortemente aderidas à cavidade oral, em que pode se observar um contorno eritematoso ao redor das placas. Essas lesões diferenciam-se da candidíase pseudomembranosa em razão da forte aderência das placas às mucosas (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

A queilite angular, popularmente conhecida como “boqueira”, apresenta lesões com início por maceração no ângulo de junção do lábio superior com o inferior e apresentam ainda uma fissura exatamente na junção dos lábios e são recobertas por uma camada cremosa que tende à dessecação, formando crostas. As lesões podem sangrar facilmente, principalmente se a crosta que as recobre é deslocada. O paciente queixa-se de sensações de picadas no local, dor e queimadura (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

A lesão da língua negra pilosa pode iniciar-se por sintomas generalistas, como boca seca, prurido e sensação de queimaduras, com o aparecimento de hipertrofia nas papilas. As lesões ficam com uma coloração escurecida por impregnação de substâncias escuras encontradas nos alimentos e bebidas. O papel das leveduras como único agente etiológico é muito discutido, entretanto o fato de isolar leveduras em algumas infecções e o desaparecimento destas após tratamento específico demonstra seu papel importante como agente causador dessa patologia. Em alguns casos, a presença da levedura é somente uma colonização de lesões prévias, como nos carcinomas verrucosos da mucosa oral, e isso pode ser confundido com a língua negra pilosa (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019). De fato a candidíase oral/orofaríngea é uma patologia associada ao rompimento da homeostase imune, sendo, portanto a infecção fúngica oportunista que mais

acomete pacientes com a resposta imunológica comprometida. (Conti *et al.*, 2009; Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

1.3 INTERAÇÃO *Candida albicans*/hospedeiro

O padrão de resposta imune desencadeado pela interação microrganismo-hospedeiro determina o prognóstico. A resposta imune às espécies de *Candida* é moldada pelo caráter comensal que esse fungo possui (Netea *et al.*, 2015). O primeiro estágio de uma resposta imune é o reconhecimento desses fungos por receptores reconhecedores de padrão (PRRs), incluindo os receptores do tipo Toll (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs), receptores do tipo NOD (NLRs) e receptores do tipo RIG-I (RLRs) (Netea *et al.*, 2015). A parede celular de *C. albicans* possui duas camadas que podem ser diferenciadas em camada externa, composta principalmente por glicoproteínas ligadas a O e N que consistem em 80-90% de manose, e em camada interna, que contém os polissacarídeos quitina, β -1,3-glucana e β -1,6-glucana, que conferem resistência e forma às células (Netea *et al.*, 2015). Essas estruturas fúngicas são os PAMPs mais imunoestimuladores sendo, portanto, os responsáveis pela ativação inicial da resposta (Netea *et al.*, 2015). Entretanto, *C. albicans* e outros fungos são capazes de evitar o reconhecimento pela redução da disponibilidade de β -glucanas na superfície celular (Hopke A. *et al.*, 2016).

O receptor de β -glucana mais descrito é o dectina-1 (também conhecido como CLEC7A), um CLR expresso principalmente em monócitos e macrófagos que induz a produção de citocinas, bem como a internalização do fungo (Goodridge *et al.*, 2011; Pappas *et al.*, 2018). Além de induzir a ativação celular direta, o envolvimento da dectina-1 potencializa as respostas à ligação em TLR2 e TLR4 e estes TLRs reconhecem estruturas contendo manana da parede celular de *C. albicans* (Ferwerda *et al.*, 2008; Pappas *et al.*, 2018) A sinalização via dectina-1 também foi descrita por evitar a liberação desordenada de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) durante a infecção fúngica, o que evita a ocorrência de dano tecidual extenso pela resposta imune (Branzk *et al.* 2014). Todavia, nem todas as *C. albicans* são reconhecidas pela dectina-1, provavelmente devido a diferenças tênues na estrutura dos componentes β -glucanas da parede celular, o que pode justificar a diferença na suscetibilidade dos hospedeiros deficientes em dectina-1 aos diferentes tipos de *C. albicans* (Marakalala *et al.*, 2013). Trabalhos mostraram que polimorfismos no receptor

dectina-1 estão mais associados à colonização do trato geniturinário, à candidíase vulvovaginal recorrente por espécies de *Candida* (Smeekens *et al.* 2013; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018).

As β -glucanas também são reconhecidas por receptores do complemento 3 (CR3), principalmente em neutrófilos. O CR3, e não a dectina-1, é o principal receptor de neutrófilos humanos para partículas que possuem β -glucana (van Bruggen *et al.* 2009; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018). As mananas e manoproteínas também são componentes importantes e imunogênicos da parede celular de *C. albicans* e são reconhecidos por vários CLRs, incluindo o receptor de manose e dectina-2 (também conhecida como CLEC6A) (Netea *et al.* 2015). O receptor de manose é expresso em macrófagos e reconhece N-mananas de *C. albicans* (Netea *et al.* 2008; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018) e essa via de sinalização desempenha um papel crucial na expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-17 (van de Veerdonk *et al.* 2009; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018). Já a dectina-2, expressa principalmente em DCs, macrófagos e neutrófilos, reconhece α -mananas de *C. albicans* (Saijo *et al.* 2010; Netea *et al.*, 2015; Campos *et al.*, 2018).. A dectina-2 tem seu papel bem descrito na modulação de respostas celulares Th17 (Ifrim *et al.* 2014; Netea *et al.*, 2015).

Os TLRs são capazes de reconhecer os patógenos fúngicos de duas maneiras: por meio dos TLRs ligados à membrana, como TLR2, TLR4 e TLR6, que reconhecem principalmente os constituintes manoproteicos da parede celular fúngica (Netea *et al.* 2008; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018) e pelos receptores intracelulares que reconhecem os ácidos nucléicos citoplasmáticos (TLR3 e TLR9) (Netea *et al.* 2015). O TLR9 é capaz de reconhecer a quitina e tal interação culmina na produção de citocinas anti-inflamatórias necessárias para manter uma resposta imunológica equânime (Wagener *et al.* 2014; Taghavi *et al.*, 2017). Interessantemente, a ativação epitelial por candidalisina, não é mediada por CLRs ou TLRs (Moyes *et al.*, 2015). Tal fato propõe que as células epiteliais utilizem mecanismos sensoriais diferentes das células mieloides, visto que as células mieloides respondem aos componentes da parede celular de *C. albicans*, como β -glucana e manana, enquanto as células epiteliais respondem por meio da via de sinalização p38 / c-Fos / MKP1 detectando a atividade de candidalisina (Naglik *et al.*, 2014; Wilson *et al.*, 2016).

Ainda inserido no contexto de reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, vale ressaltar os receptores do tipo NOD (NLRs). São receptores citoplasmáticos que executam várias funções biológicas essenciais, incluindo o processamento, apresentação de antígeno e ativação dos inflamassomas (Netea *et al.* 2015). Na infecção por *Candida* spp esses receptores tem como principal função o reconhecimento e a modulação de respostas mediadas por quitina, especialmente a produção de IL-10 pela ativação de NOD2 (Wagener *et al.* 2014). Outro efeito biológico importante dos NLRs é a sua participação como componente do inflamassoma. A ativação do inflamassoma NLRP3 por hifas de *Candida*, mas não por leveduras, foi mencionado em vários estudos (Joly *et al.* 2009; Netea *et al.*, 2015) e isso tem sido proposto como um dos mecanismos que torna o hospedeiro capaz de diferenciar a colonização da invasão de *Candida* (Gow *et al.* 2012). Existem estudos que relatam que Sap2 e Sap6, principalmente, secretadas por *C. albicans* são capazes de ativar inflamassoma NLRP3, o que resulta em uma produção potente de IL-1 β e IL-18 (Pietrella *et al.* 2013; Netea *et al.*, 2015).

Após todo esse processo inicial de reconhecimento dos PAMPs fúngicos pelas várias famílias de PRRs, inicia-se uma cadeia de mecanismos efetores que, em último caso, leva à depuração dos fungos (Netea *et al.* 2015). Tanto células imunes quanto não imunes contribuem para a resposta inata antifúngica, como por exemplo, os macrófagos, neutrófilos, células natural killer (NK) e as células epiteliais. Além disso, um epitélio e endotélio íntegros são importantes barreiras mecânicas contra a invasão tecidual por fungos (Netea *et al.* 2015).

As células epiteliais auxiliam no controle do estado comensal de *Candida* pela produção de β -defensinas, que têm uma poderosa atividade antifúngica, em resposta a IL-22 liberada pelas células Th17 ou células linfoides inatas (ILCs) (Tomalka *et al.*, 2015). O epitélio responde à colonização de espécies de *Candida* por meio de um mecanismo dependente de TLR4 e essa interação leva a ativação de NF- κ B e AP-1 (Netea *et al.*, 2015). No entanto, quando há formação de hifas, há ativação de proteína quinase 1 (PKA 1) por mitógenos (MAPK1) e a sinalização de FOS nas células epiteliais (Moyes *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2018).

Os macrófagos possuem grande relevância na defesa antifúngica. Os macrófagos residentes teciduais são células efetoras, produtoras de citocinas e quimiocinas inflamatórias que atuam no recrutamento e ativação de outras células imunes no local da infecção (Netea, *et*

al., 2015). A considerável influência de macrófagos na defesa anti-*Candida* foi evidenciada por estudos *in vivo* que utilizaram camundongos com depleção de macrófagos e demonstraram que esses animais apresentaram elevada carga fúngica nos tecidos, se tornaram mais susceptíveis à candidíase invasiva, com uma maior taxa de mortalidade (Netea *et al.*, 2015). Estudos avaliaram camundongos deficientes para o receptor de quimiocina CX3CL1 (CX3CR1) e mostraram que o acúmulo diminuído de macrófagos derivados de monócitos no rim leva à insuficiência renal e à morte (Lionakis *et al.*, 2013) em modelo murino de candidíase sistêmica. Outros trabalhos mostraram que a deficiência do receptor CCR2, essencial para o recrutamento de monócitos para tecidos infectados, promove um aumento da suscetibilidade à candidíase sistêmica (Ngo *et al.*, 2014).

Os neutrófilos também desempenham um papel importante na resposta do hospedeiro contra infecções por *Candida* (Netea *et al.*, 2015; Pappas *et al.*, 2018). Células epiteliais ativadas e macrófagos residentes teciduais liberam quimiocinas que recrutam neutrófilos para o local da infecção fúngica (Netea *et al.*, 2008; Pappas *et al.*, 2018). A ativação de neutrófilos é importante para o controle da infecção por *Candida*, sendo a neutropenia um importante fator de risco para infecções fúngicas invasivas (Pappas *et al.*, 2018). Além disso, os neutrófilos são hábeis em inibir com sucesso o processo de morfogênese de *C. albicans* (Brown, 2011; Pappas *et al.*, 2018). Utilizam mecanismos efetores oxidativos e não oxidativos para combater *Candida* (Netea *et al.*, 2015; Pappas *et al.*, 2018) como a liberação de EROs, a produção de fatores antimicrobianos, como lisozima, lactoferrina, elastase, β -defensinas, gelatinases e catepsina G (Amulic *et al.*, 2012; Pappas *et al.*, 2018). A elastase neutrofílica e a catepsina B foram caracterizadas como tendo atividade antifúngica e a elastase contribuiu para a liberação de NETs (Netea *et al.*, 2015). As fibras de NETs se ligam e neutralizam os patógenos, fornecendo um mecanismo para combater as hifas que são grandes demais para serem fagocitadas (Menegazzi *et al.*, 2012; Netea *et al.*, 2015). Além disso, a formação de NETs induz a liberação de substâncias antimicrobianas como, por exemplo, a mieloperoxidase (MPO), lactoferrina, azurocidina e catelicidina, dos grânulos dos neutrófilos (Netea *et al.*, 2015). Há também uma proteinase, a proteinase-3 derivada de neutrófilos, que é capaz de quebrar a catelicidina no peptídeo antimicrobiano LL-37, também conhecido como CAMP, (Sorensen, *et al.*, 2011; Netea *et al.*, 2015) e este pode promover a ruptura da membrana celular fúngica (Zhang *et al.*, 2010; Kahlenberg *et al.*, 2013; Netea *et al.*, 2015), inibir a formação de biofilme e adesão fúngica, aumentar a quimiotaxia, produzir

EROs e inibir a apoptose de neutrófilos (Netea *et al.*, 2015; Pappas *et al.*, 2018) As vias receptoras que levam à morte de *Candida* por neutrófilos foram recentemente descobertas (Netea *et al.* 2015). Os mecanismos dependentes de EROs necessários para a depuração de *Candida* opsonizada dependem dos Fc γ Rs e da proteína quinase C, enquanto a via independente de EROs, importante para a morte de *Candida* não opsonizada, depende da ligação de CR3 e do recrutamento de CARD9 (Gazendam *et al.* 2014) e para ambos mecanismos a dectina 1 é dispensável (Netea *et al.* 2015).

Assim como monócitos, macrófagos e neutrófilos, as células NK contribuem para a rápida resposta imune inata contra patógenos (Netea *et al.*, 2015). Sabe-se que as células NK não inibem a transformação de levedura em hifa em *Candida*, entretanto foi descrito atividade antifúngica dependente de perforina das NK (Voigt *et al.* 2014). A ativação de uma resposta imune inata robusta pelas células epiteliais e fagocitárias, provavelmente com a ajuda de células NK, é na maioria dos casos suficiente para evitar o deslocamento de espécies de *Candida* da colonização de superfícies para invasão de tecidos (Netea *et al.* 2015).

Estudos demonstraram que as DCs são essenciais para a resposta do hospedeiro contra espécies de *Candida* por meio da produção de IFN- β (del Fresno *et al.*, 2013; Pappas *et al.*, 2018). As DCs podem fagocitar e eliminar espécies de *Candida*, porém são menos efetivas que os macrófagos na morte de fungos (Pappas *et al.*, 2018). Uma vez em contato com os fungos, as DCs os fagocitam, e estes são degradados no compartimento fagocítico, dando origem a peptídeos antigênicos, que são montados associados ao MHC de classe II, e posteriormente são direcionados para a superfície das DCs ativadas para apresentação a células T CD4⁺ (Moyes *et al.*, 2015). Estudos mostram que tanto as células T CD4⁺ como as células T CD8⁺ desempenham um papel importante na imunidade anti-fúngica e a ativação dessas células é controlada pelas populações de células dendríticas (Moyes *et al.*, 2015). Embora os linfócitos T CD8⁺ tenham demonstrado inibir o crescimento de hifas de *C. albicans in vitro*, o principal mecanismo que dá início a resposta imune adaptativa efetiva é a apresentação de antígeno pelas DCs a células T CD4⁺ naive (Moyes *et al.*, 2015). O reconhecimento do antígeno é realizado por um receptor de célula T (TCR) na presença de co-estimulação de CD28 e CD80/86 e isso é seguido por polarização dirigida por citocina para um dos 4 subconjuntos Th conhecidos (Moyes *et al.*, 2015).

As respostas com perfil Th1 foram historicamente consideradas como a resposta celular predominante contra *C. albicans*, entretanto esse protagonismo do fenótipo de proteção de Th1 em superfícies mucosas tem sido substituída pela resposta Th17 (Moyes *et al.*, 2015). Ao contrário dos fenótipos Th17 / Th1 que são protetores, a indução de um fenótipo Th2 está ligada ao aumento do crescimento e disseminação do fungo (Moyes *et al.*, 2015). As DCs que fagocitam leveduras de *C. albicans* são induzidas a produzir IL-12, que impulsiona a polarização para o subconjunto Th1 (Smeltz *et al.*, 2002; Moyes *et al.*, 2015). Após a estimulação com IL-12, as células Th1 iniciam a sinalização autócrina, via secreção de IFN- γ , que tem o papel de regular positivamente a expressão do receptor IL-12R β 2. Isso torna as células cada vez mais sensíveis à estimulação de IL-12 e mantém a diferenciação do fenótipo Th1 (Smeltz *et al.*, 2002; Moyes *et al.*, 2015). Em contraste, a polarização para o fenótipo Th2 é conduzida por IL-4 e é sustentada por mais secreção de IL-4 (Moyes *et al.*, 2015).

A diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo Th17 é induzido, inicialmente, pela citocina IL-1 β (Chung *et al.*, 2009; Zielinski *et al.*, 2012; Tasaki, *et al.* 2018) enquanto a maturação e a diferenciação terminal dependem da sinalização da IL-23. A IL-6 também tem tido papel na diferenciação para Th17, citocina que pode ser produzida por células epiteliais em resposta a infecção por *C. albicans* (Moyes *et al.*, 2015; Tasaki, *et al.* 2018)). A diferenciação de TCD4⁺ em células Th17, bem como a síntese de IL-17A, IL-17F e IL-22 são importantes para a defesa do hospedeiro contra espécies de *Candida* (Tasaki, *et al.* 2018). Tanto a IL-17 como a IL-22 induzem o recrutamento e ativação de neutrófilos, são incumbidas da ativação de células epiteliais e liberação de defensas antifúngicas. As células Th17 expressam os receptores de quimiocinas CCR4 e CCR6 na sua superfície (Moyes *et al.*, 2015; Tasaki, *et al.* 2018).

A literatura científica têm demonstrado que camundongos com deficiência de sinalização por IL-17 são mais suscetíveis a candidíase sistêmica (Netea *et al.*, 2015; Tasaki, *et al.* 2018) e a infecções da mucosa (Conti *et al.* 2016; Tasaki, *et al.* 2018). Esses dados propõe que, em humanos, as respostas de células Th17 são especialmente importantes para respostas antifúngicas da mucosa (Netea *et al.*, 2015; Conti *et al.*, 2016; Tasaki, *et al.* 2018). Alguns trabalhos mais recentes caracterizaram uma classe adicional de células Th17 (nTh17) naturais que são fenotipicamente distintas das células Th17 convencionais (Conti *et al.*, 2016; Tasaki, *et al.* 2018) As células nTh17 funcionam como vigilantes inatas na mucosa oral e,

juntamente com células T $\gamma\delta$, secretam IL-17 em resposta a *C. albicans* (Conti *et al.*, 2016; Tasaki, *et al.* 2018)

Em relação à defesa humoral às espécies de *Candida*, ainda há muito a ser elucidado. Já foi proposto que mecanismos imunes humorais estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra infecções por *Candida*, embora sua contribuição seja mais modesta do que os mecanismos celulares (Netea *et al.*, 2015) ressaltados acima. Por mais que o complemento ativado não possa eliminar as hifas de *Candida*, ele pode induzir uma resposta de citocinas (Cheng *et al.*, 2012). As pesquisas utilizando camundongos com deficiência dos fatores C3 ou C5 do complemento demonstraram que os animais apresentam aumento da mortalidade como consequência da resistência diminuída à *Candida* ou uma imunopatologia robusta (Netea, *et al.*, 2015). As moléculas de manoproteínas com polissacarídeos de manose complexos ligados em O e N são exibidas na superfície celular de *C. albicans* e são alvos para a proteção imune mediada por anticorpos devido a sua acessibilidade (Moyes *et al.* 2015). Ao administrarem uma imunoglobulina humana recombinante anti-manana de *C. albicans* em camundongos observaram uma sobrevivência prolongada em animais inoculados com dose letal do fungo (Richardson & Moyes, 2015). As adesinas Als de *C. albicans* por se localizarem na superfície celular são alvos de anticorpos monoclonais, visto que podem se ligar a Als3 e interferir na adesão a superfícies epiteliais, impedir a filamentação e aquisição de ferro, além de possuir atividade fungicida (Brena *et al.* 2011; Richardson & Moyes, 2015). Ao estudar camundongos com deficiência de células B, pesquisadores descobriram que não havia aumento da suscetibilidade à infecção por *C. albicans* nesses animais (Richardson & Moyes, 2015), o que salienta a modesta resposta mediada por anticorpos e justifica a predominância de respostas celulares adaptativas (Th1/ Th 17)(Richardson & Moyes, 2015).

Os eosinófilos, células multifuncionais que contribuem para a imunidade inata e adaptativa, estão envolvidos na iniciação, propagação e resolução de respostas imunes, incluindo reparo tecidual. Eles alcançam essa multifuncionalidade pela expressão de um conjunto diversificado de receptores de ativação, incluindo aqueles que reconhecem diretamente patógenos e alvos opsonizados, e por sua capacidade de armazenar e liberar mediadores citotóxicos pré-formados que participam da defesa do hospedeiro (Travers & Rothenberg, 2015). No contexto da infecção, os eosinófilos estão associados a infecções por helmintos onde eles possuem efeitos tóxicos ao patógeno através da degranulação e liberação de diferentes proteínas catiônicas, como a principal proteína básica (MBP), eosinófilo

peroxidase (EPO), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) (Hogan *et al.*, 2008 ; Ravin & Loy, 2015). Embora a associação entre inflamação eosinofílica e sensibilização ou colonização fúngica tenha sido reconhecida há muito tempo, os mecanismos imunológicos subjacentes às interações efetoras moleculares diretas entre fungos e eosinófilos permanecem pouco compreendidos (Figueiredo & Neves, 2018). Utilizando métodos de microscopia eletrônica de transmissão, foi sugerido que os eosinófilos humanos são capazes de fagocitar esporos de *C. albicans*. (Figueiredo & Neves, 2018). No entanto, muitos estudos ainda são necessários, pois pouco se sabe sobre os papéis funcionais dos eosinófilos na candidíase. Um estudo recente utilizando camundongos deficientes em eosinófilos (Δ BLGATA1), mostrou pela primeira vez que os eosinófilos contribuem para o dano e disfunção do tecido pulmonar dependente de IL-17 durante a infecção por *Aspergillus fumigatus* (Malacco *et al.*, 2019).

A defesa do hospedeiro contra infecções por *Candida*, portanto, é complexa e abrange uma cascata de mecanismos. O reconhecimento inicial dos fungos pelas células epiteliais, macrófagos teciduais, neutrófilos, entre outras células imunes resulta em inflamação e montagem da resposta imune. A resposta inata é crucial para a defesa do hospedeiro contra a candidíase mucosa e sistêmica, enquanto as defesas adaptativas do hospedeiro estão principalmente envolvidas nas respostas da mucosa (Netea *et al.*, 2015). De fato, um dos maiores problemas associados ao comprometimento da resposta imune são os quadros de imunossupressão que resultam na maior susceptibilidade dos hospedeiros à patógenos oportunistas.

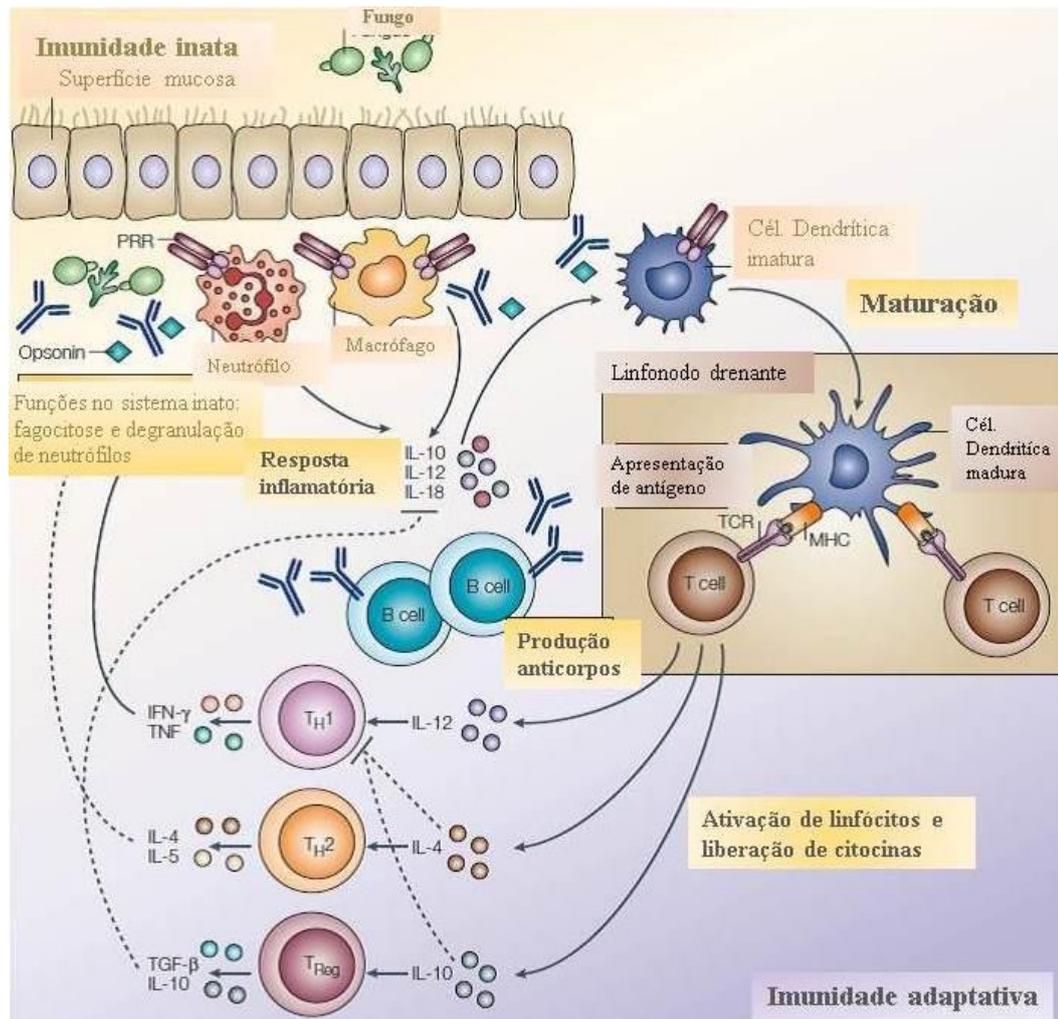


Figura 4: Cooperação dos sistemas imune inato e adaptativo em infecções fúngicas. . A maioria dos fungos é reconhecida por mecanismos de defesa inatos mediados por fagócitos e opsoninas através do envolvimento de PRRs distintos. Esses mecanismos agem imediatamente e são seguidas algumas horas depois por uma resposta inflamatória induzida precoce, que deve ser ativada pela infecção, mas não gera imunidade protetora duradoura. Essas fases iniciais ajudam a manter a infecção sob controle. Nos vertebrados, no entanto, se o organismo infeccioso consegue romper essas linhas iniciais de defesa, uma resposta imune adaptativa ocorrerá, com a geração de células efetoras T auxiliares (Th) antígeno-específicas, células T reguladoras (TReg) e células B que direcionam especificamente o patógeno e induzem as células de memória que impedem a infecção subsequente com o mesmo microrganismo. As DCs conduzem os fungos do local da colonização / infecção para os nódulos linfáticos de drenagem e ativam células Th e TReg de um modo dependente do morfotipo e do tecido. Fonte: adaptado de Romani, 2004. *Nature Reviews Immunology*.

1.4 IMUNOSSUPRESSÃO

Os fármacos utilizados nesse trabalho foram escolhidos baseando-se na clínica, visto que são os mais administrados. É um dos grandes problemas desencadeadores de imunossupressão está o uso desses fármacos, dentre eles destacamos, primeiramente, os glicocorticoides. Os glicocorticoides possuem fortes propriedades imunossupressoras e são amplamente utilizados em medicina humana e veterinária devido a seus efeitos amplos, embora inespecíficos, anti-inflamatórios e antialérgicos (Diehl *et al.*, 2016). As aplicações comuns incluem o tratamento da artrite reumatóide e da asma e a administração concomitante em transplante de órgãos sólidos (Lee *et al.*, 2013; Diehl, *et al.*, 2016). Apesar dos efeitos terapêuticos significativos da DEX, seu uso sustentado deve ser limitado por apresentar efeitos adversos ao longo do tempo, tais como, imunossupressão exacerbada, miopatia, retardo de crescimento, distúrbios metabólicos e osteoporose (Saag *et al.*, 1994).

Como glicocorticoide sintético, DEX atua primariamente por meio da ligação ao receptor de glicocorticoide citosólico e causa inibição de fatores transcricionais como NF-κB e AP-1, suprimindo assim a ativação de genes que codificam vários mediadores pró-inflamatórios que agravam a inflamação e causam dano tecidual (Coutinho e Chapman, 2011). As ações rápidas de DEX são parcialmente atribuídas a efeitos não-genômicos, regulando diretamente as vias de transdução de sinal através de receptores de glicocorticóides associados à membrana e segundos mensageiros (Cato *et al.*, 2002). Eles inibem linfócitos T e APCs e induzem uma regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias (Lee *et al.*, 2013; Diehl, *et al.*, 2016).

Além dos glicocorticoides, o uso de fármacos com atividade antitumoral também está associado à imunossupressão, entre eles o 5-Fluorouracil (5-FU). O 5-FU é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de uma variedade de neoplasias, incluindo câncer colorretal, de mama, de cabeça e pescoço. É um fármaco antimetabólito, da classe das fluoropirimidinas, que atua inibindo processos biossintéticos essenciais, ou sendo incorporados em macromoléculas, tais como DNA e RNA (Longley, *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2016). Segundo Longley *et al.*, 2003, o 5-FU é uma droga de fase específica, que atua na fase G1 e na fase S do ciclo celular, inibindo a síntese do RNA ou do DNA, respectivamente. Foi introduzido na década de 1950 e produzido baseado em experimentos que mostravam que células neoplásicas utilizavam uracila para síntese de ácido nucléico de forma mais rápida que

as células normais (Diasio & Harris, 1989). Ao sintetizar um análogo de base pirimídica com propriedades físico-químicas semelhantes à uracila, esperava-se a obtenção de um potente antimetabólito que interferisse na síntese de ácido nucléico e, conseqüentemente, no crescimento tumoral (Diasio & Harris, 1989).

A atividade do 5-FU ocorre somente após sua metabolização intracelular para nucleotídeos citotóxicos, como o 5-fluoro-uridina-5'-trifosfato (FUTP), o 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-difosfato (FdUDP) e o 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) (Diasio & Harris, 1989; Longley *et al.*, 2003). Estes três nucleotídeos atuam em três mecanismos diferentes de citotoxicidade: o FUTP substitui a UTP, incorpora-se e causa dano ao RNA; o FdUDP, após a ação de DNA polimerase, substitui a timidina-5'-trifosfato (dTTP) e incorpora-se ao DNA e o FdUMP inibe a atividade da timidilato sintase (TS) (Longley *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2016). Embora o 5-FU seja muito eficaz no tratamento de neoplasias ele pode causar vários efeitos colaterais como mielossupressão, dermatite, toxicidade cardíaca, diarreia e mucosite (Chang *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2016). Entre esses efeitos adversos, a mucosite gastrointestinal é uma complicação muito importante que ocorre em aproximadamente 80% dos pacientes e causa inchaço abdominal, vômitos e diarreia (Sonis *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2016).

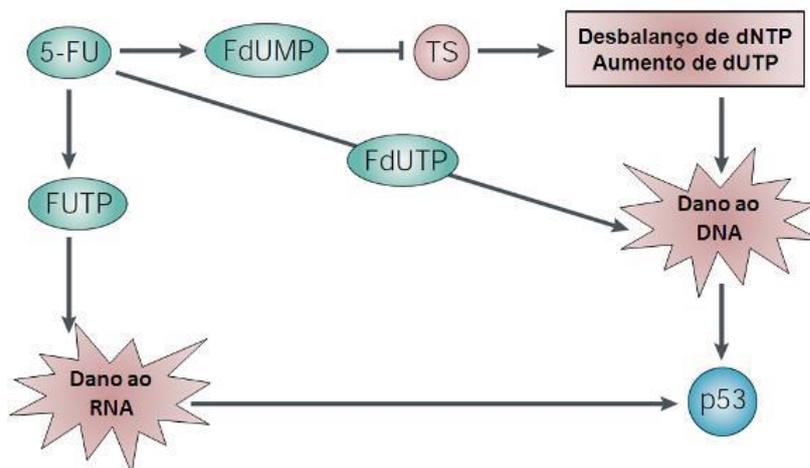


Figura 5: Esquema representativo dos mecanismos antineoplásicos do 5-fluorouracil (5-FU). O 5-FU pode induzir a morte celular via a ativação da p53 por mais de um mecanismo: incorporação de fluorouridina trifosfato (FUTP) ao RNA, incorporação de fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) ao DNA e inibição da timidilato sintase (TS) devido a ligação estável com a fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP). Essa inibição resulta no desbalanço de desoxinucleotídeos (dNTP) e aumento de desoxiuridina (dUTP). Modificado de Longley *et al.*, 2003.

A mucosite, também chamada de lesão da barreira mucosa, é um dos efeitos colaterais mais debilitantes do tratamento de radioterapia e quimioterapia (Ribeiro *et al.*, 2016). Patologicamente, a mucosite é caracterizada tanto pela inflamação quanto pela perda de células da barreira epitelial do trato gastrointestinal, se estendendo da região da boca até o ânus (van Vliet *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2016). Isso resulta em dor, disfagia, diarreia e disfunção, dependendo do tecido afetado (Ribeiro *et al.*, 2016). Como a maioria das doenças, a mucosite possui um espectro variável de manifestações clínicas. Na sua forma mais branda, apresenta uma lesão atrófica, eritematosa, na qual a mucosa permanece intacta e os pacientes têm uma sensibilidade semelhante a queimaduras causadas por alimentos muito quentes (Sonis, *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2016). Em contrapartida, pacientes com mucosite mais grave desenvolvem ulcerações que transpõe inteiramente a submucosa e causam dor forte que frequentemente necessita de analgesia narcótica (Sonis *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2016). Segundo o modelo introduzido por Sonis, cinco fases são importantes na fisiopatologia da mucosite: (1) a formação de espécies reativas de oxigênio que conduz à ativação de NF- κ B durante a fase inicial; (2) a indução de moléculas mensageiras, como o TNF resultando em inflamação tecidual e apoptose devido ao tratamento durante a fase de regulação; (3) amplificação de moléculas mensageiras na fase de amplificação / sinalização, levando a uma exacerbação da inflamação e da apoptose (4) descontinuidade da barreira epitelial resultante da apoptose durante a fase ulcerativa, promovendo a translocação bacteriana e (5) uma fase de cura (Sonis, 2004; Ribeiro *et al.*, 2016). A permeabilidade intestinal aumenta após o tratamento quimioterápico e tem demonstrado ser uma característica da terceira e quarta fases da mucosite (Sonis *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2016). Um dos mecanismos que resulta em um aumento da permeabilidade induzido pela quimioterapia é provavelmente a atrofia das vilosidades (Van Vliet, *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2016).

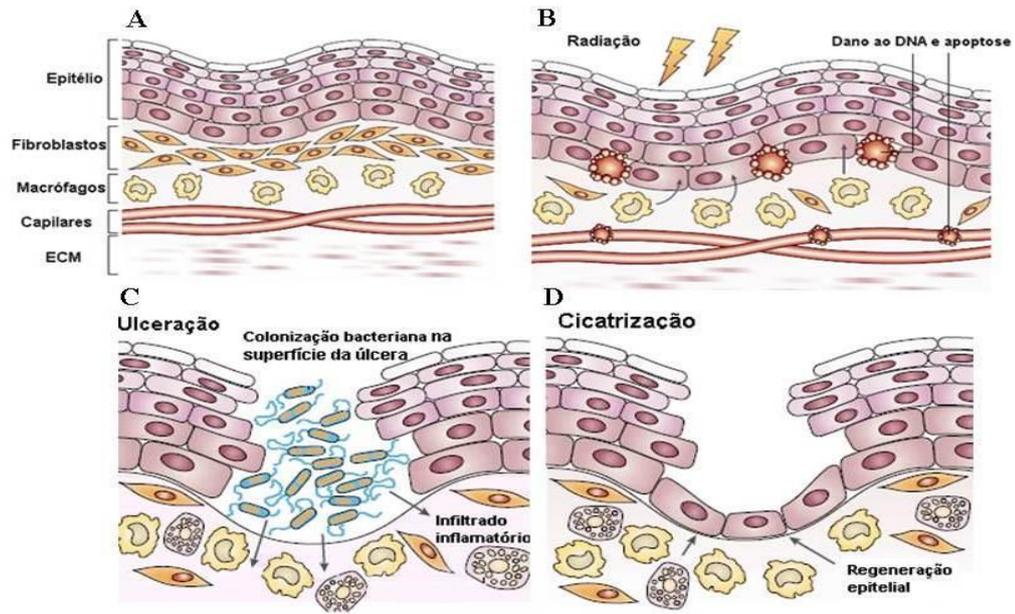


FIGURA 6: Fases da mucosite. A- Fase de início da mucosite induzida por quimioterapia ou radioterapia. B- Fase de amplificação de sinais. C- Fase de ulceração. D- Fase de cicatrização. Adaptado de Sonis (2004).

A mucosite é um fenômeno agudo que desaparece espontaneamente após cessar o tratamento. A última fase é a cicatrização, caracterizada por intensa proliferação celular, que resulta na restauração estrutural e funcional das vilosidades, retorno da barreira intestinal e da superfície de absorção. A resposta inflamatória diminui e a mucosa é completamente regenerada, retomando a sua função normal (Sonis, 2004; Van Vliet *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2016). Durante o período em que a mucosite está ativa, existe um alto risco de infecções, causadas principalmente pelo fungo *Candida albicans*, sendo mais frequente em pacientes com neutropenia prolongada (Scully *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2016). A mielossupressão por sua vez é um evento tardio que surge por volta do sétimo dia após a administração do 5-FU e se caracteriza pela diminuição da produção de células pela medula óssea. Além dos sintomas e seu impacto na qualidade de vida, a mucosite tem complicações que levam a internações mais longas, aumentam os custos com o tratamento e é uma razão frequente para redução das dosagens de quimioterápicos ou para interrupção do tratamento, conduzindo a uma maior mortalidade em pacientes com câncer devido à ameaça à eficácia dos planos de tratamento (Sonis *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2016). Alguns trabalhos atuais têm abordado que neutrófilos e eosinófilos têm papel importante na patogênese da mucosite (Guabiraba *et al.*, 2014; Arifa *et al.*, em preparação). Em relação ao eosinófilo, a ausência do acúmulo dessas

células no tecido, seja em animais com depleção genética $\Delta db/GATA$ ou tratados com Evasina-4 (proteína que se liga as quimiocinas CCL11 e CCL5, quimiotática para eosinófilos) resultou em menor lesão intestinal (Arifa *et al.*, em preparação). O papel essencial do eosinófilo foi constatado, uma vez que a ausência dessas células em camundongos $\Delta db/GATA$ levou a melhora dos sinais clínicos após o tratamento com Irinotecano, bem como uma mucosite menos grave (Arifa *et al.*, em preparação).

2. JUSTIFICATIVA

Com a evolução da medicina e a consequente disponibilidade de medicamentos para o tratamento de transplantados de órgãos sólidos, doenças autoimunes, inflamatórias e de neoplasias percebe-se o aumento do número de casos de infecções por patógenos oportunistas, como *Candida albicans*. Essa levedura é um componente da microbiota gastrointestinal que em situações de lesão tecidual, imunossupressão e disbiose, comporta-se como um agente agressor. A candidíase oral, causada por *C. albicans*, é a infecção oportunista mais prevalente em hospitais, podendo evoluir para candidíase invasiva, sepse e morte dos pacientes. Dados oficiais históricos de doenças fúngicas foram coletados no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) e mostraram que em um ano foram estimados 2.981 416 casos de infecções graves por *Candida*, incluindo doenças invasivas e não invasivas (Giacomazzi *et al.*, 2016).

Mesmo sendo um patógeno oportunista com elevada taxa de ocorrência entre pacientes submetidos a tratamentos contra tumores sólidos e malignidades hematológicas, ainda pouco se sabe sobre os fatores relacionados à transição de comensal para patogênico nesses hospedeiros. Portanto, percebe-se a urgente relevância no desenvolvimento de modelos murinos que permitam avaliar mecanismos fisiopatológicos dessa infecção em quadros de imunossupressão. Embora a associação entre inflamação eosinofílica e sensibilização ou colonização fúngica tenha sido reconhecida há muito tempo, os mecanismos imunológicos envolvidos entre eosinófilos e *C. albicans* ainda não foram reportados. Portanto a presente proposta propõe a padronização de modelos murinos de imunossupressão associados à infecção por *C. albicans* e ao papel dos eosinófilos nesse contexto, para que forneçam subsídios para mais estudos e identificação de possíveis alvos terapêuticos.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar modelos experimentais de candidíase oral para avaliação do papel do eosinófilo na patogênese da infecção por *Candida albicans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Implementação do modelo de candidíase oral em camundongos C57BL/6 e BALB/c utilizando o glicocorticoide dexametasona como indutor de imunossupressão, avaliando os seguintes parâmetros:

Em animais C57BL/6:

- Definição do inóculo de *C.albicans* a ser utilizado;
- Definição do tempo de infecção.

Em animais C57BL/6 e BALB/c:

- Análise de parâmetros clínicos (perda de peso e morbidade), inflamatórios (MPO e NAG) e carga fúngica;
- Análise histopatológica da língua dos animais.

2) Implementação do modelo de imunossupressão em camundongos C57BL/6, utilizando o quimioterápico 5-FU, avaliando os seguintes parâmetros:

- Análise da letalidade nas doses de 75 mg/Kg e 150 mg/Kg de 5-FU para estabelecimento da dose a ser utilizada;
- Avaliação da ação imunossupressora de 5-FU por meio da contagem total de leucócitos no sangue.

3) Padronização da candidíase oral em camundongos C57BL/6, utilizando o quimioterápico 5-FU para avaliar as seguintes respostas:

- Análise de parâmetros clínicos (perda de peso, morbidade, textura das fezes) inflamatórios (MPO, NAG e ELISA) e carga fúngica;
- Avaliação do efeito do antagonista do receptor CXCR2, DF2156A, na candidíase oral induzida por 5-FU;
- Análise histopatológica da língua dos animais.

4) Avaliar o papel dos eosinófilos, com a utilização de animais BALB/c deficientes para o fator de transcrição GATA1 ($\Delta db/Gata1^{-/-}$), na candidíase oral induzida por 5-FU. Avaliando os seguintes parâmetros:

- Padronização da candidíase oral induzida por 5-FU em animais BALB/c WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$;
- Análise de parâmetros clínicos, inflamatórios (MPO e ELISA) e carga fúngica;
- Análise histopatológica da língua dos animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$.

4. METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas WT da linhagem C57BL/6 e da linhagem BALB/c de 6 a 8 semanas de idade adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte, Minas Gerais. Além disso, foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c deficientes para o fator de transcrição GATA1 ($\Delta db/Gata1^{-/-}$) deficientes em eosinófilos, os quais foram adquiridos do Biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG sob condições controladas de temperatura (28°C a 30°C), umidade (50%), ventilação, ciclos de iluminação claro e escuro de 12 horas, ração e água sem restrições. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFMG, sob o protocolo 157 / 2018 (ANEXO 1).

4.2 *Candida albicans*

Neste trabalho foi utilizada uma amostra clínica (L3881) de *C. albicans* (LEMI # L3881, Padovan *et al.*, 2009). Consiste em uma amostra gentilmente cedida pelo Prof. Frederico Marianetti Soriani, do Departamento de Genética, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A L3881 é proveniente do LEMI (Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo, Brasil), isolada do sangue de um paciente que teve candidemia e foi curado clinicamente. A amostra foi devidamente armazenada em freezer a -80°C e, paralelamente, foi feito um estoque de trabalho, mantido a 4°C em meio Mycosel.

4.3 DROGAS UTILIZADAS

Para realização do primeiro protocolo de imunossupressão foi utilizado o corticoide sintético dexametasona (Decadron/Àche) na dose de 10 mg/kg, administrado uma dose/dia, via i.p, durante todo o experimento. Para a indução de imunossupressão no outro modelo utilizou-se o quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) (Fauldfluor), nas doses de 75 mg/Kg e 150 mg/Kg, sendo administrado uma dose/dia, via i.p, durante três dias consecutivos. Para avaliar o papel dos neutrófilos na candidíase oral utilizou-se um antagonista seletivo dos receptores CXCR1/CXCR2, DF 2156A (Guabiraba *et al.*, 2014), na dose de 10 mg/Kg diluído em salina e administrado, por via subcutânea, de 12h em 12h, começando 12h antes da infecção até 12h antes da eutanásia.

4.4 INDUÇÃO DE CANDIDÍASE ORAL EXPERIMENTAL

A candidíase oral foi induzida em camundongos tratados com DEX e 5-FU. Para esse procedimento os camundongos foram anestesiados com uma solução contendo xilazina (15mg/Kg) e cetamina (100 mg/kg). Como estratégia para facilitar a infecção, foi realizada uma raspagem/escoriação sublingual nos animais com bisturi para retirar camadas do epitélio sem, no entanto, provocar lesões profundas na língua. Posteriormente a essa escoriação, os animais foram infectados por meio de uma bola de algodão estéril de aproximadamente 0,0025 g, saturada com 30 µL do inóculo estabelecido, 2×10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Candida albicans*. Esse algodão foi colocado na região sublingual dos animais anestesiados por 75 minutos (adaptado de Conti *et al.*, 2009). A anestesia foi readministrada de 20 em 20 minutos, em um volume de aproximadamente 20 microlitros. A escoriação foi realizada somente em animais da linhagem BALB/c.

4.4.1 Preparo do inóculo

O cultivo de *Candida albicans* foi realizado em meio Myosel, a 37°C, por 24h (Adaptado de Conti *et al.*, 2009). Os inóculos foram preparados em PBS 1X e ajustados para uma solução com $6,66 \times 10^8$ UFC/mL de *C. albicans* por contagem em câmara de Neubauer. Dessa suspensão foram retirados 30 µL por animal para realização da infecção com 2×10^7 e 2×10^9 UFC de *C.albicans*.

4.4.2 Carga fúngica

A língua e o baço foram coletados, homogeneizados/triturados, diluídos em PBS 1X até 1: 1000. 50 µL do homogenato de cada órgão foram plaqueados em meio Mycosel e em seguida incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as colônias foram contadas visualmente e a quantidade de UFC/mg de órgão foi estabelecida. O sangue também foi coletado e 50 µL distribuído em meio Mycosel e a contagem de colônias de *C.albicans* expressas em UFC/mL.

4.5 INDUÇÃO DE IMUNOSSUPRESSÃO NOS ANIMAIS

O modelo de imunossupressão induzido por dexametasona foi baseado em LIMA *et al.*, 2015, com a utilização de Decadron/Àche na dose de 10 mg/Kg, uma dose/ dia, via i.p, todos os dias, durante todo procedimento experimental (figura 7) Os animais foram infectados no quinto dia de administração de dexametasona. Um trabalho do nosso grupo já havia realizado um experimento de dose-resposta para determinar a dose de 5-FU necessária para induzir mucosite intestinal, testando as doses de 50, 150 e 450 mg/kg. Os resultados mostraram que a dose de 50 mg/kg induzia uma mucosite e uma imunossupressão bem discretas e a dose 450 mg/kg era extremamente letal (Menezes-Garcia, 2014). Por isso, optamos por testar as doses de 75 mg/kg e a de 150 mg/kg e foram administradas aos camundongos, via i.p, durante três dias consecutivos. No quinto dia após a primeira dose de 5-FU, os animais foram infectados por *C. albicans*, conforme descrito o protocolo de infecção oral. Os animais controles receberam PBS. As doses de 75 e 150 foram utilizadas e comparadas para a avaliação da letalidade e da condição clínica dos animais, para posterior infecção com *C. albicans*. A dose de escolha, portanto, foi a de 75 mg/Kg e foi usada para todos os demais experimentos (figura7).

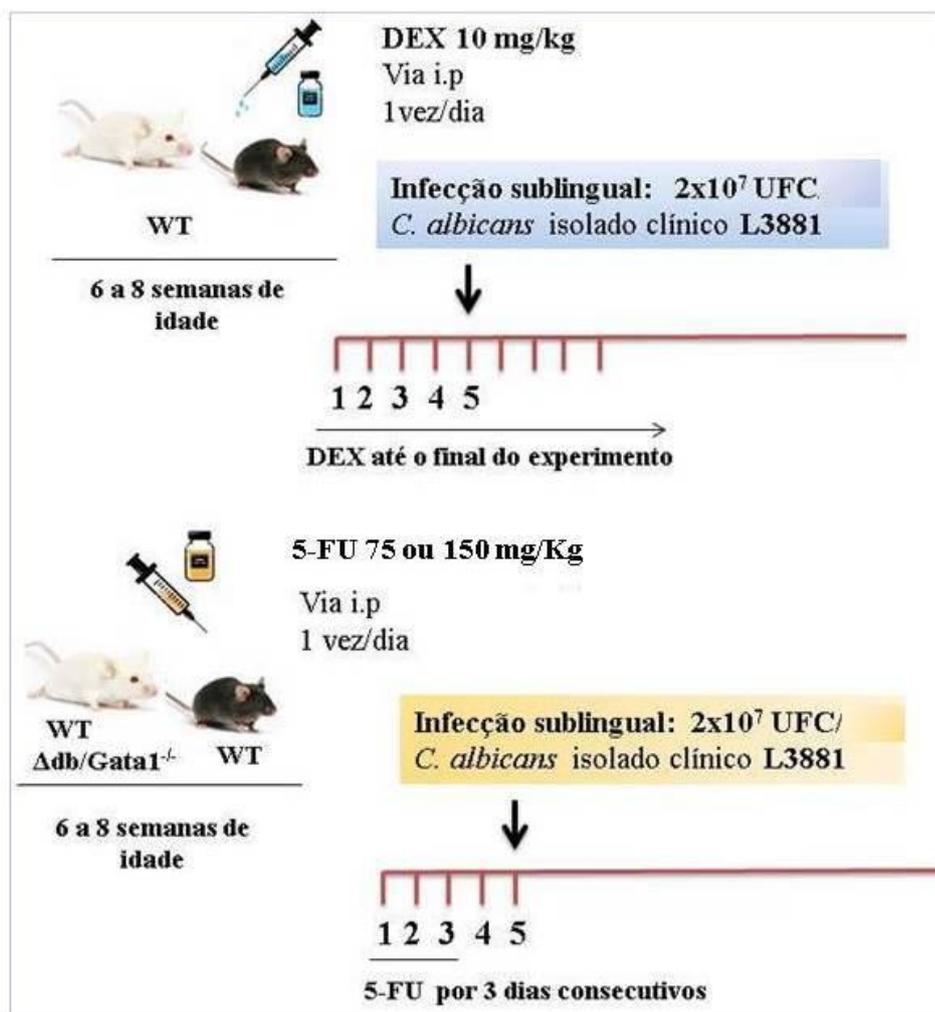


Figura 7: Protocolo experimental para indução de imunossupressão pelo corticoide dexametasona e pelo antitumoral 5-FU em camundongos C57BL/6 e BALB/c.

4.6 DETECÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILOS (MPO)

O acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi avaliado pelo ensaio indireto através da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para tanto, fragmentos da língua e do baço dos animais infectados ou controles foram retirados e congelados a -20°C . Após o descongelamento, 100mg do tecido foi homogeneizado em 2mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO_4 ; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 – Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 3000g, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelada (para 100mg de

tecido, 1,5mL de solução) seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão Na_3PO_4 0,05M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% p/v e re-homogeneizado. Alíquotas de 1mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 3000g e os sobrenadantes coletados. As amostras dos tecidos de camundongos foram diluídas previamente à análise em tampão Na_3PO_4 0,05 M. A atividade da mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450nm) usando *tetramethylbenzidine* (1.6mM) e H_2O_2 (0.5mM) para a medição das alterações da densidade óptica (OD). Os resultados foram expressos como unidade relativa comparados com neutrófilos de camundongos não infectados. Uma curva padrão do número de neutrófilos *versus* OD foi previamente obtida pelo processamento de neutrófilos purificados do peritônio de camundongos como padronizado anteriormente por Souza e colaboradores, 2004.

4.7 DETECÇÃO INDIRETA DE MACRÓFAGOS (NAG)

O acúmulo de macrófagos foi avaliado pelo ensaio da quantificação da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG). Fragmentos da língua e baço dos animais infectados ou controles foram retirados e congelados a -20°C . Após o descongelamento, 100mg do tecido foi homogeneizado em 2 mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO_4 ; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 – Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 3000g, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelada (para 100mg de tecido, 1,5mL de solução) seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em solução salina 0,9%/Triton x-100 0,1% v/v e re-homogeneizado. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000g e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Alíquotas de 100 μL da suspensão foram transferidas para placas de 96 poços, em duplicata e 100 μL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosiminida) e manter a 37°C . Após 10 minutos, adicionou-se a solução 100 μL de tampão

glicina 0,2 M e a atividade da NAG foi determinada através de leitor de ELISA (400nm). Os resultados foram expressos como densidade óptica (OD).

4.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

Amostras de soro e língua foram utilizadas para dosagem das citocinas (TNF, IL-1 β , IFN- γ e IL-17) e quimiocinas (CCL-11 e CXCL-1). Fragmentos de língua foram homogeneizados em solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1mM *phenylmethanesulfonyl fluoride*; 0,1mM *benzethonium chloride*; 10mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% *Tween 20*, na proporção de 0,1g de tecido para cada mL de solução; utilizou-se um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e os sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) a -20°C, para posterior análise. As amostras de soro e tecidos foram analisadas na diluição 1:2 para citocinas e 1:3 para quimiocinas em PBS contendo 0,1% de albumina bovina, como previamente padronizada em nosso laboratório. Foram utilizados kits de anticorpos (R&D Systems, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Para a realização do ensaio, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4), sendo que a sensibilização ocorreu durante 18h a 4°C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, 25 EUA). As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços e incubados por 18h. Os poços foram então lavados e o anticorpo de detecção adicionado pelo período de 2h. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingem – 1:4000) e revelada com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride – Sigma-Aldrich, EUA). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 492nm. Os ensaios apresentaram uma sensibilidade de 8-16pg/ml.

4.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Amostras de língua foram coletadas dos camundongos após dois dias de infecção. Posteriormente a retiradas dos tecidos eles foram imediatamente fixados em 10% de formalina tamponada durante 24 horas, processadas, incluídas em parafina, cortadas, montadas em lâminas, coradas com H&E e PAS. Foram avaliadas sob um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha) adaptado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Japão). Na língua o score histopatológico foi adaptado a partir de alterações morfológicas no epitélio e tecido conjuntivo da mucosa da língua descritas nos trabalhos de Takakura *et al* 2003 e Conti *et al* 2009. Nessa avaliação, pontuamos a presença (1) ou ausência (0) de exocitose, erosão epitelial, ulceração e/ou necrose no tecido epitelial, além de hiperemia vascular e hemorragia no tecido conjuntivo. Além disso, avaliamos a intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo (e entre as fibras musculares da língua) em uma pontuação que variou de 0-5, sendo 0 indicativo de ausência e 5 indicativo de infiltrado muito intenso.

4.10 AVALIAÇÃO DA GRADUAÇÃO CLÍNICA DA MUCOSITE ASSOCIADA À CANDIDÍASE ORAL

A graduação clínica da doença foi adaptada e modificada para o nosso modelo (Maslowski *et al.*, 2009). Foi avaliada a consistência das fezes, perda de peso, ingestão de comida, bem como sinais de morbidade, como pelo arrepiado, postura arqueada e diminuição da mobilidade dentro da caixa.

4.11 ANÁLISE DO LEUCOGRAMA

Para a avaliação da imunossupressão, antes da infecção foram coletados sangue dos animais pela veia caudal e para isso eles foram colocados em um contensor, um tubo de Acrílico Cristal, frente e traseira removíveis, com sistema de travamento. Além disso, esse tubo possui cinco furos laterais de 6,3 mm para entrada e saída de ar. Na eutanásia, as amostras de sangue foram obtidas diretamente da veia cava inferior dos animais, coletadas em tubos heparinizados e posteriormente separadas para contagem total de leucócitos e coleta do

soro. Para contagem total, amostras de sangue foram diluídas em solução de Turk e contadas em câmara de Neubauer e o resultado foi expresso em número total de leucócitos/mL de sangue.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Os resultados serão apresentados como média±erro padrão médio. O nível de significância adotado será de $P < 0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Padronização de candidíase oral em modelo de imunossupressão utilizando dexametasona

5.1.1 Animais C57BL/6

- Definição do melhor inóculo fúngico a ser utilizado no modelo experimental

Inicialmente testamos se animais WT não infectados possuíam *C. albicans* como parte da microbiota e com o método de plaqueamento não foi encontrado esse fungo nas amostras. Posteriormente, padronizamos o inóculo de *C. albicans* em animais pré-tratados com Dexametasona (DEX) (10mg/Kg; via i.p) ou com veículo (PBS). Os animais foram submetidos à infecção com os dois inóculos, 2×10^7 e 2×10^9 UFC de *C. albicans*, após cinco dias de tratamento com DEX ou PBS. Os animais foram eutanasiados sete dias após infecção e os dados demonstram que houve recuperação de carga fúngica na língua em todos os grupos avaliados, sendo que o maior aumento foi verificado com o inóculo de 2×10^7 UFC de *C. albicans* com o pré-tratamento com DEX (figura 8A). Ao avaliarmos baço (figura 8B) e sangue (figura 8C) apenas nos grupos pré-tratados com DEX houve recuperação de carga fúngica, entretanto, há grande variações entre os animais e esses dados não foram conclusivos.

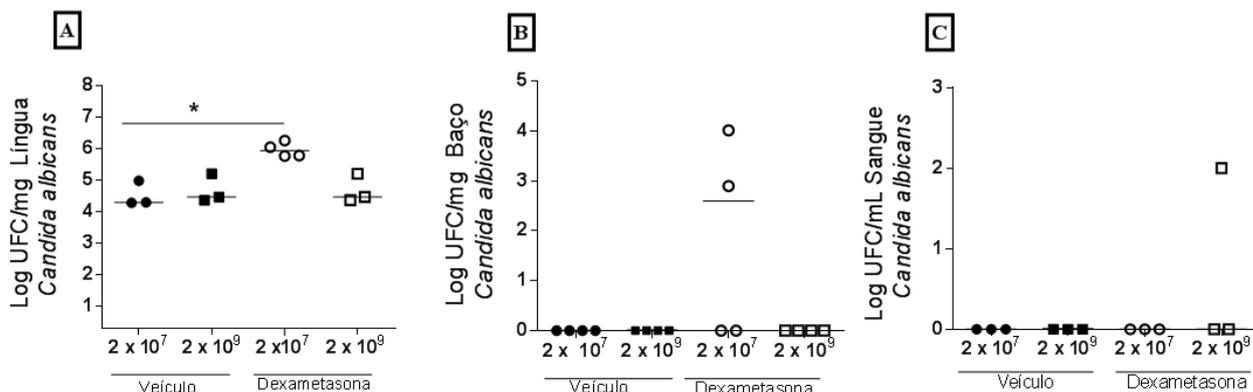


Figura 8: Carga fúngica de animais infectados com *C. albicans* por via sublingual. Um grupo de camundongos da linhagem C57/BL6 foram imunossuprimidos com DEX via i.p e infectados, por via sublingual, com 2×10^7 e 2×10^9 UFC de amostra clínica de *C. albicans*. Os camundongos controle

(veículo) receberam injeção i.p.de PBS e foram infectados. Os animais foram avaliados por sete dias. N= 3-4 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle infectados, não tratados com DEX. # $p < 0,05$ quando comparados os animais infectados e tratados com DEX.

- A candidíase oral associada ao tratamento com DEX induz maior perda de peso corporal

Após padronizar o inóculo a ser utilizado avaliamos perda de peso corporal como parâmetro clínico. As alterações no peso dos camundongos infectados foram avaliadas durante sete dias, conforme demonstrado na figura 9. Nossos resultados demonstraram que durante o curso da infecção, os animais tratados com DEX/infectados perdem peso quando comparados ao grupo controle (veículo) e aos animais que receberam PBS/infectados.

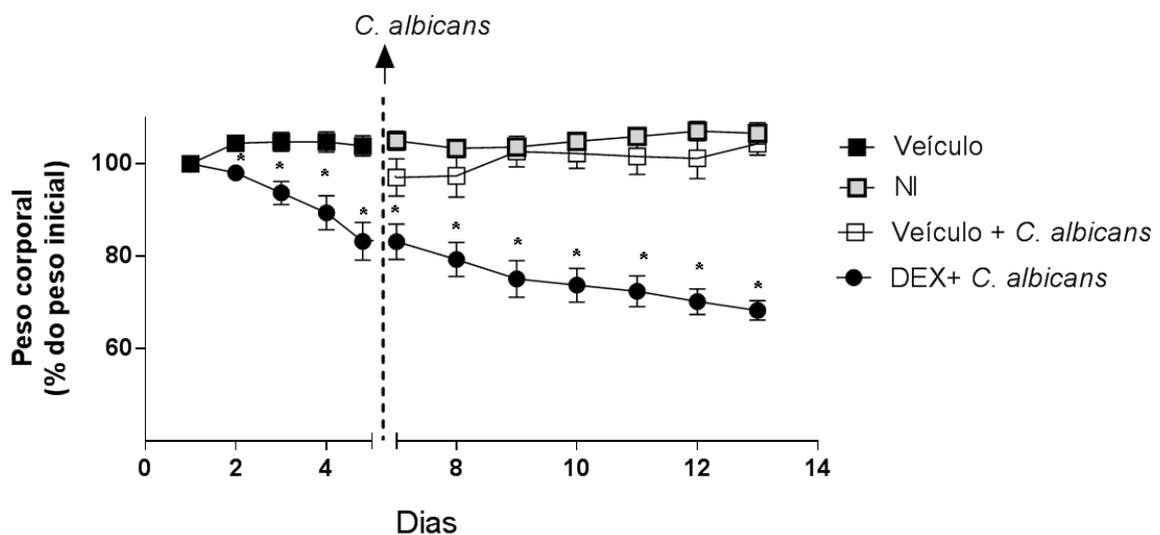


Figura 9: Animais tratados com DEX e infectados com *C. albicans* apresentam maior perda de peso. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados via sublingual por 2×10^7 UFC de *C. albicans*. A seta no gráfico indica o dia em que os animais foram infectados. N= 12 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais veículo. # para $p < 0,05$ quando comparados com os grupos infectados.

- Determinação do tempo de infecção

Após estabelecimento o inóculo de 2×10^7 UFC de *C. albicans*, realizamos uma cinética de infecção. Os animais pré-tratados com dexametasona foram eutanasiados com 5, 7 e 10 dias após infecção e os animais veículo foram eutanasiados juntamente com o grupo de q0 dias, ou seja, no último dia da cinética.

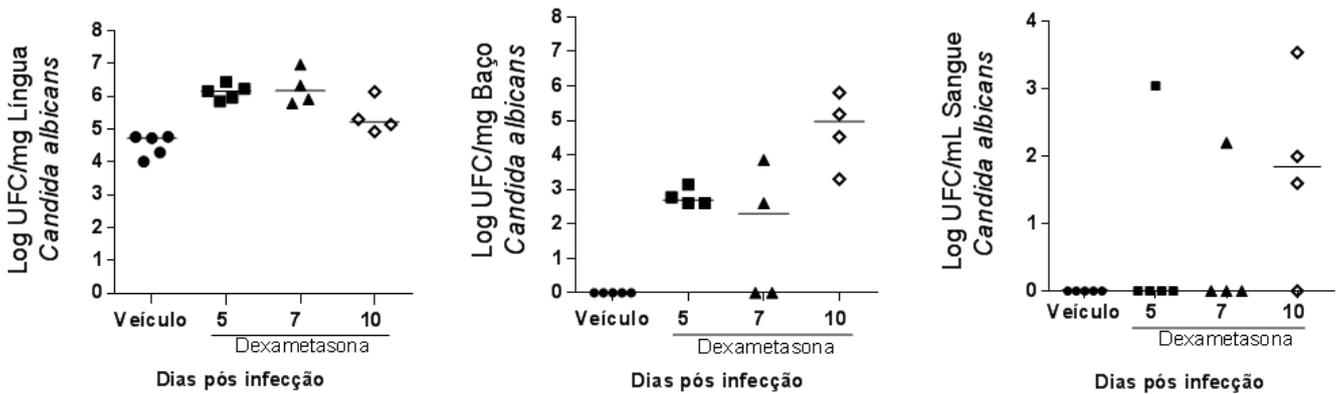


Figura 10: Carga fúngica de animais infectados com *C. albicans* após 5, 7 e 10 dias de infecção. Os camundongos da linhagem C57/BL6 foram infectados com o inóculo estabelecido de 2×10^7 UFC. Os grupos 5, 7 e 10 dias de infecção receberam DEX e o grupo controle (veículo) receberam PBS e foram igualmente infectados. N=4-5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais veículo. # $p < 0,05$ quando comparados com animais tratados com DEX.

Os resultados de carga fúngica referente aos dias 5, 7 e 10 dias após infecção não apresentaram diferença estatística. Logo, os parâmetros inflamatórios foram utilizados para designar o tempo de infecção para esse modelo. Na Fig 11A podemos notar que não houve diferença na quantidade de MPO na língua, entretanto houve uma diferença estatística no influxo de neutrófilos no baço, mostrando que no sétimo dia de infecção há uma inflamação neutrofílica mais exacerbada quando comparado aos outros grupos. Na Fig 10B, a média das quantidades relativas de N-acetilglicosaminidase (NAG) foi maior também no sétimo dia de infecção, em ambos os órgãos. Os dados de MPO e NAG se corroboram e demonstram que o sétimo dia representa uma inflamação bem estabelecida e por isso optamos por realizar a eutanásia sete dias após a infecção nesse modelo.

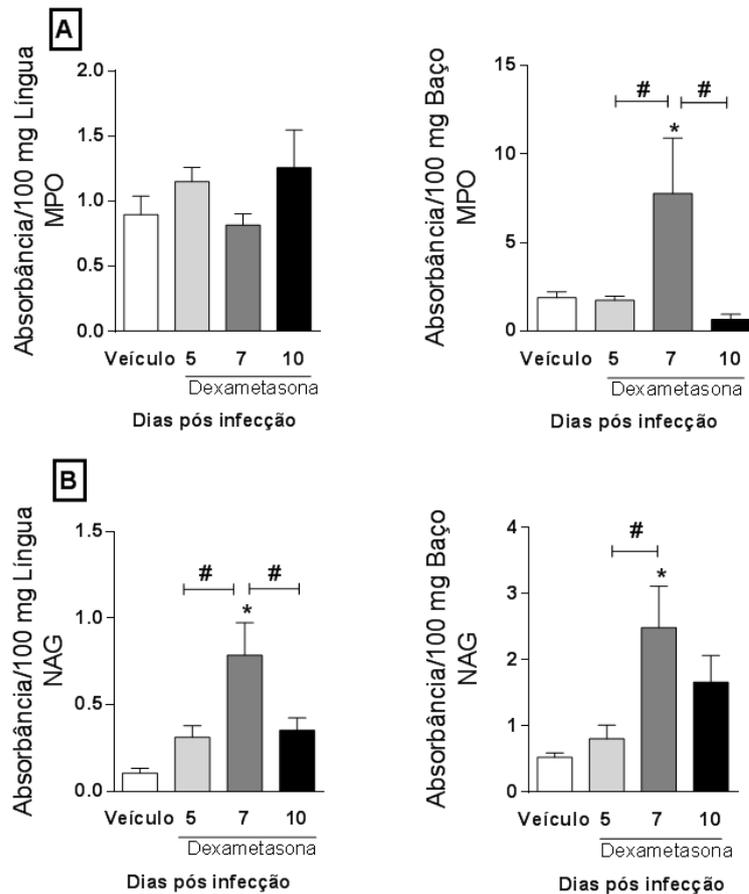


Figura 11: A infecção por *Candida albicans* após sete dias induz aumento do recrutamento de neutrófilos no baço e maior recrutamento de macrófagos em ambos os tecidos. O acúmulo de neutrófilos (A) e macrófagos (B) na língua e no baço dos animais foi avaliado por meio dos métodos indiretos baseados nas atividades de MPO e NAG, respectivamente. Os grupos 5, 7 e 10 dias de infecção receberam DEX e o grupo controle (veículo) receberam PBS e foram igualmente infectados. N=4-5 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais veículo. # $p < 0,05$ quando comparados os animais tratados com DEX.

5.1.2 Animais BALB/c

Seguindo o protocolo de imunossupressão por DEX (10 mg/Kg) já descrito, os animais da linhagem Balb/c foram imunossuprimidos e infectados por *C. albicans* no inóculo de 2×10^7 UFC. Sob anestesia, foram utilizadas três estratégias para facilitar a infecção por *C. albicans*, em três grupos diferentes: um grupo com Clorexidina 0,12 % + 2% de carboximetilcelulose, um antisséptico oral com a finalidade de causar disbiose; o segundo grupo com ácido acético a 50% (Katagiri *et al.*, 2018) e o terceiro grupo com

escoriação/raspagem sublingual. Ao comparar as três estratégias (dados não mostrados) a que mais facilitou o estabelecimento da *C. albicans* foi a escoriação sublingual, visto que, a clorexidina não provocou alterações significativas e o ácido foi tóxico, provocando a morte por asfixia de alguns animais mesmo antes da infecção. Portanto, nesse modelo, os animais dos grupos DEX + *C. albicans* e Raspado + *C. albicans* foram submetidos a uma escoriação/raspagem sublingual antes da infecção com a finalidade de mimetizar o efeito de lesões orais na infecção. Segundo Itai *et al.*, 2017, o uso de DEX pode desencadear uma leucopenia e isso se deve, principalmente, à neutropenia.

A figura 12 demonstra que após dois dias de infecção os animais tratados com DEX e infectados com *C. albicans* apresentam uma leucopenia estatisticamente significativa quando comparada ao veículo.

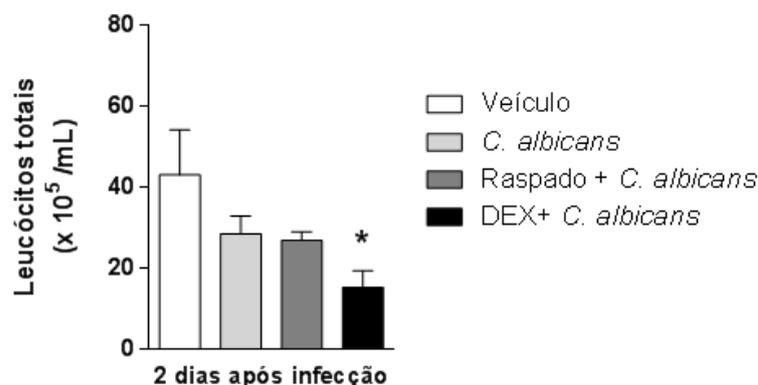


Figura 12: Contagem total de leucócitos do sangue de animais após dois dias de infecção por *C. albicans*. Os animais da linhagem Balb/c foram imunossuprimidos com DEX e infectados com inóculo de 2×10^7 UFC. N= 5-6 * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle.

- Animais BALB/c tratados com DEX apresentam maior carga fúngica na língua

Os animais foram eutanasiados dois dias após infecção e os dados demonstram que houve recuperação de carga fúngica na língua em todos os grupos avaliados, sendo que o maior aumento foi verificado no grupo infectado com *C. albicans* com o pré-tratamento com DEX (figura 13). Ao avaliarmos o baço apenas no grupo pré-tratado com DEX houve recuperação de carga fúngica, entretanto, há grande variações entre os animais.

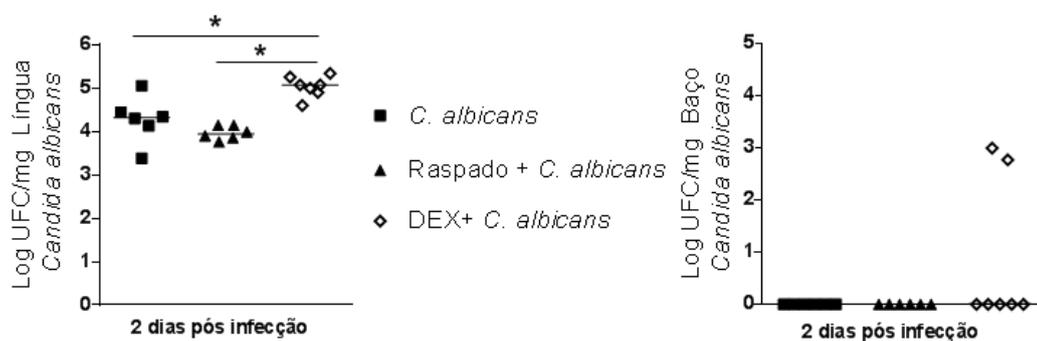


Figura 13: Carga fúngica de animais infectados com *C. albicans* por via sublingual, tratados com DEX ou veículo. Os animais da linhagem Balb/c foram infectados após tratamento com DEX ou PBS e eutanasiados dois dias após a infecção. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais do grupo *C. albicans*.

- A infecção oral por *C. albicans* induz aumento do recrutamento de neutrófilos e macrófagos no baço dos camundongos BALB/c

A figura 14 demonstra a quantificação da atividade das enzimas MPO e NAG na língua e no baço dos animais infectados com *C. albicans*. Pode ser observado que ocorre um aumento no número de neutrófilos no baço no grupo Raspado + *C. albicans* quando comparado ao grupo controle NI (veículo) e aos outros grupos infectados. Por outro lado, não foi detectado MPO na língua dos animais. A enzima NAG teve um discreto aumento no baço dos animais dos grupos Raspado + *C. albicans* e DEX + *C. albicans* quando comparamos ao veículo e ao grupo *C. albicans*.

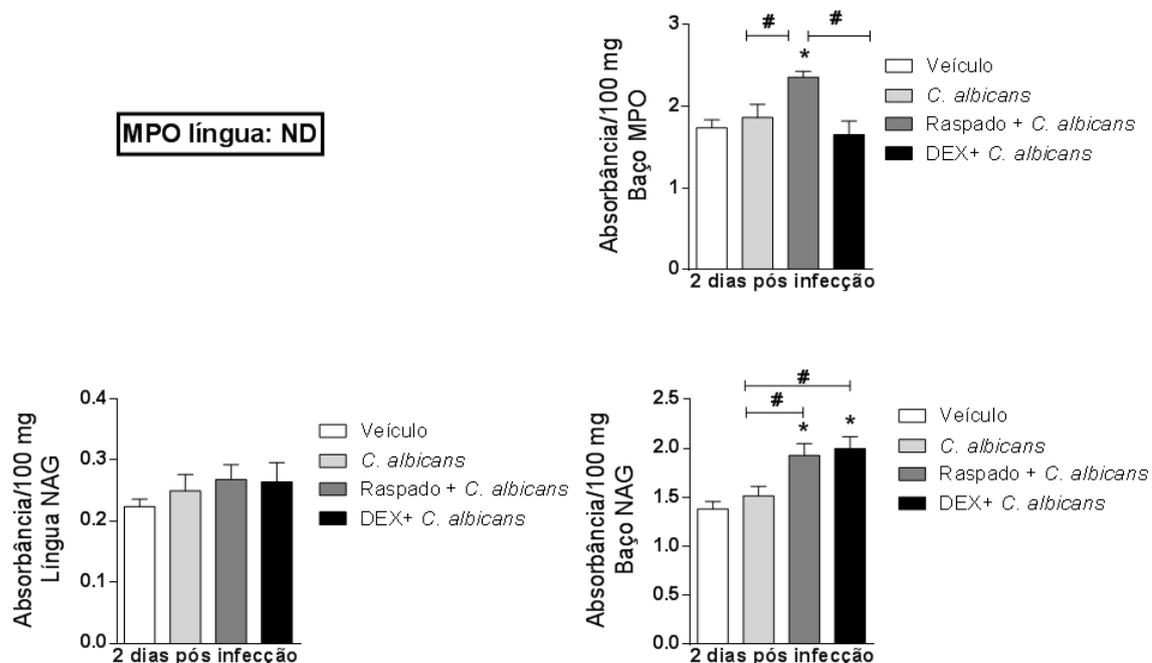


Figura 14: A infecção oral por *C. albicans* e tratamento com DEX induz aumento do recrutamento de neutrófilos e macrófagos no baço dos camundongos. Os camundongos da linhagem Balb/c foram infectados com *C. albicans* e eutanasiados após 48h de infecção. A migração de neutrófilos foi avaliada pela quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) e a de macrófagos foi avaliada pela quantificação dos níveis da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) na língua e no baço. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos e macrófagos por 100mg de tecido. Os grupos foram de 5-6 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos infectados.

- A infecção oral por *C. albicans* associada à imunossupressão por DEX induz maior perda de peso corporal em camundongos BALB/c

A figura 15 mostra que a perda de peso mais exarcebada e estatisticamente significativa foi dos animais tratados com DEX e infectados com *C. albicans*. Entretanto, após a infecção os animais do grupo raspado+ *C. albicans* apresentou um declínio no peso de forma estatisticamente significativa quando comparado ao veículo e ao grupo *C. albicans*. De fato, os animais tratados com DEX perdem mais peso, porém a infecção associada ao raspado também induz uma redução considerável do peso corporal dos animais.

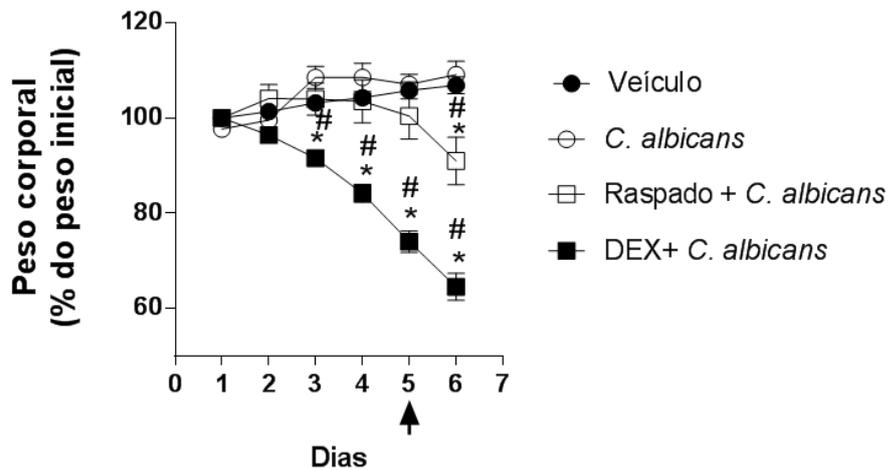


Figura 15: A infecção oral por *C. albicans* induz maior perda de peso corporal em camundongos tratados com DEX. Os camundongos da linhagem Balb/c foram infectados por *C. albicans* e o peso foi avaliado durante sete dias. A seta no gráfico indica o dia em que os animais foram infectados. N=6 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com o grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos infectados.

- Alterações histopatológicas na língua de animais com candidíase oral

Na figura 16 A podemos está representada a língua de um animal controle caracterizada pela presença de um epitélio estratificado íntegro, com uma fina camada de tecido conjuntivo subjacente. A figura 16 B corresponde a uma língua infectada por *C. albicans* e tal processo deu origem à hiperplasia do epitélio e à exocitose. O processo inflamatório foi caracterizado pela presença de um infiltrado celular, principalmente de leucócitos polimorfonucleares (PMN), que são células características de inflamação aguda. Ainda nessa figura há a hiperplasia do tecido conjuntivo devido ao aparecimento de infiltrado moderado e difuso próximo às áreas de lesão epitelial e um infiltrado leve entre as fibras musculares. A figura 16C apresenta uma língua infectada com *C. albicans* associada ao raspado sublingual. O perfil de lesão histológica é semelhante ao da figura B, diferindo na maior frequência com que as lesões apareceram nos animais. Além disso, o infiltrado celular (PMN) é intenso e também semelhante ao da figura B, porém na figura C as células inflamatórias invadem mais as fibras musculares. O score referente à figura C foi maior devido a maior frequência com que as lesões foram observadas, além de ter alguns animais desse grupo com processos de ulceração, necrose e hemorragia no tecido lingual. A seção

histológica 16 D demonstra a língua de um animal tratado com DEX e infectado com *C. albicans*, podendo ser caracterizada por uma lesão restrita ao epitélio e com presença de exocitose. Há menor lesão tecidual devido uma menor quantidade de células inflamatórias quando comparado aos animais não imunossuprimidos, no entanto há uma maior quantidade de células fúngicas no tecido. As seções histológicas da figura 17 representam as mesmas fotos da figura 18, porém com coloração de PAS que permite a visualização do fungo. De fato, os scores histopatológico e infiltrado inflamatório (Figura 18) traduzem o que está sendo demonstrado pelas figuras histológicas.

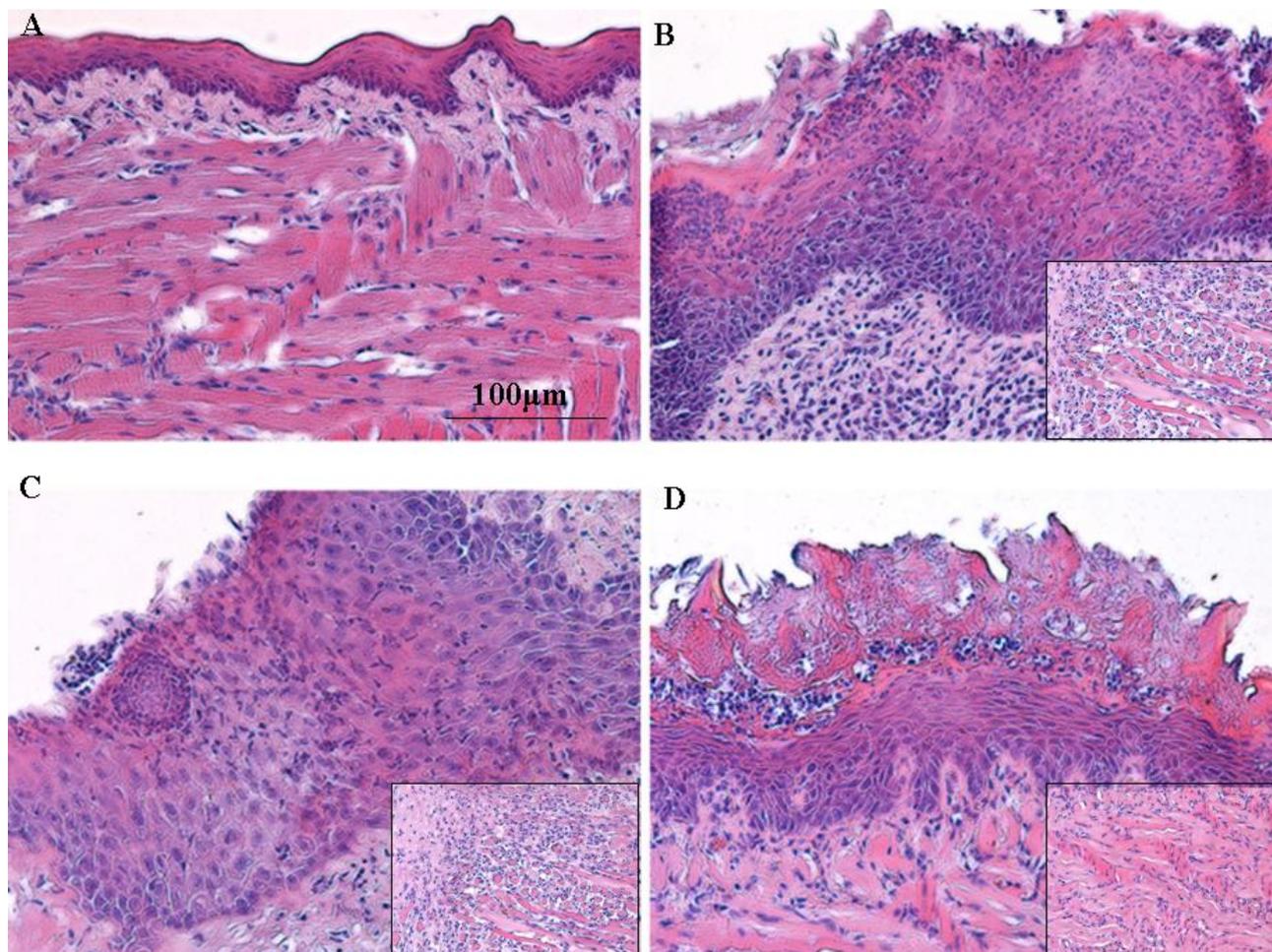


Figura 16: Seções histológicas do dorso da língua de camundongos com candidíase oral. Em (A) língua veículo; em (B) língua infectada com *C. albicans*; (C) língua com raspado e infectada com *C. albicans*; (D) língua de animal tratado com DEX e infectado com *C. albicans*. [Coloração de hematoxilina-eosina (HE), aumento original de 20x]. O insert de cada figura representa o tecido conjuntivo Os grupos foram de 3- 4 animais.

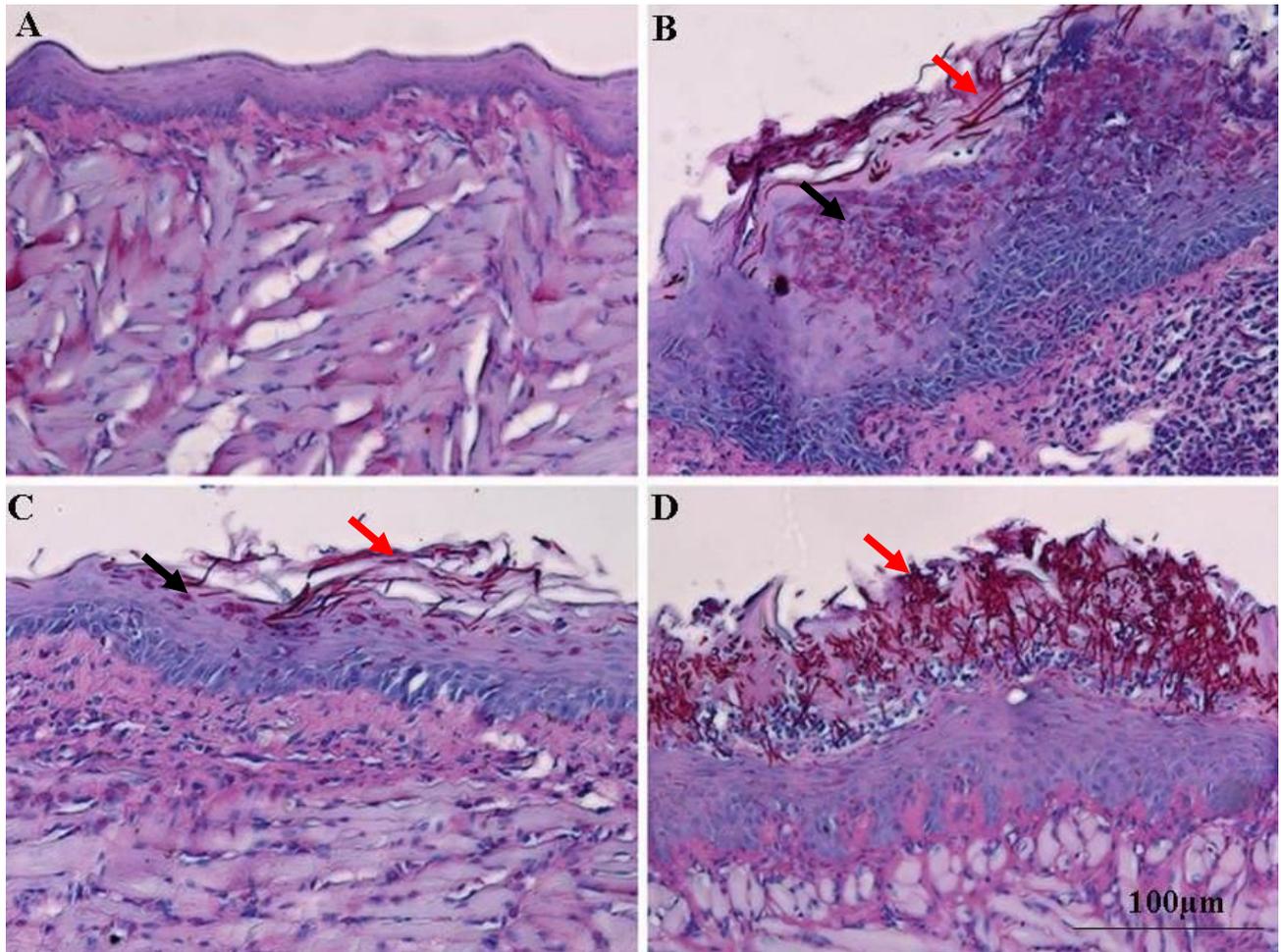


Figura 17: Seções histológicas do dorso da língua de camundongos com candidíase oral. Em (A) língua veículo; em (B) língua infectada com *C. albicans*; (C) língua com raspado e infectada com *C. albicans*; (D) língua de animal tratado com DEX e infectado com *C. albicans*. [Coloração Ácido periódico de Schiff (PAS), aumento original de 20x]. Podemos observar nas figuras B, C, D a presença de hifas (setas vermelhas) e leveduras (setas pretas) de *C. albicans*. Os animais do grupo tratado com DEX apresentou uma filimentação mais exacerbada comparada aos outros grupos. Os grupos foram de 3- 4 animais.

O grupo Raspado + *C. albicans* apresentou o maior score histopatológico quando comparado ao grupo controle NI (veículo). Todos os grupos apresentaram diferença estatística no parâmetro infiltrado inflamatório quando comparado a controle. Os grupos *C. albicans* e Raspado + *C. albicans* apresentaram um infiltrado celular semelhante e maior que o do grupo DEX+ *C. albicans*.

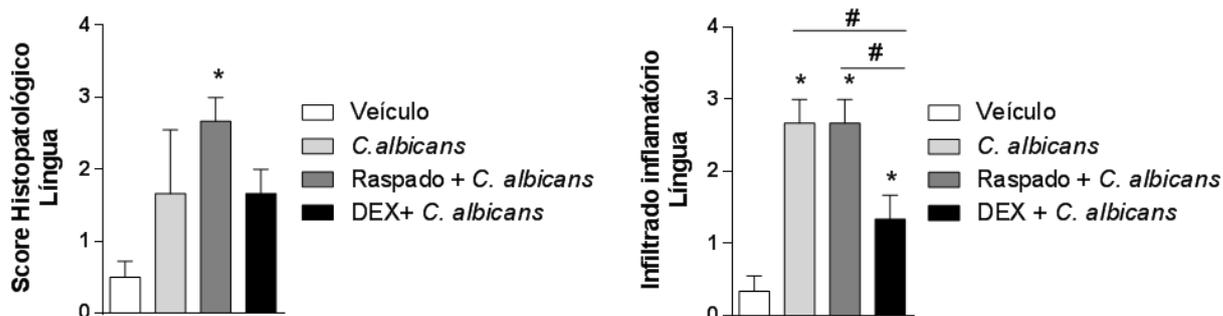


Figura 18: Escore histopatológico e infiltrado inflamatório na língua de camundongos com candidíase oral. Os animais da linhagem Balb/c foram infectados com *C. albicans* e após dois dias de infecção foram eutanasiados para realização das histologias e dos escores correspondentes. Os grupos foram de 3-4 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos infectados.

5.2 Padronização da candidíase oral em modelo de imunossupressão utilizando o quimioterápico 5-FU

5.2.1 Testes de doses de 5-FU em camundongos C57/BL6

As doses de 75 mg/Kg e 150 mg/kg foram utilizadas conforme um trabalho anterior do nosso grupo (Menezes-Garcia, 2014) e comparadas para a avaliação da letalidade e da condição clínica dos animais. A dose de escolha, portanto, foi a de 75 mg/Kg e foi usada para todos os experimentos posteriores. Os animais foram monitorados quanto à morbidade e letalidade por duas semanas. Diante disso, podemos inferir pela figura 19 que a dose de 150 mg/kg sozinha provoca a morte de todos os animais em oito dias e associada a *C. albicans* leva ao óbito com uma semana. Já a dose de 75 mg/kg sozinha ou associada à *C. albicans* apresentou uma letalidade de aproximadamente 80%. A figura 20 ilustra a variação de peso corporal, um dos parâmetros clínicos que utilizamos para avaliar a morbidade das doses utilizadas nesse modelo. A dose de 150 mg/kg induziu uma perda de peso muito maior do que a dose de 75 mg/kg.

O score clínico (figura 21) também foi utilizado para auxiliar na avaliação da dose de 5-FU. O score foi realizado baseado nos parâmetros de perda de peso, consistência das fezes, postura arqueada, piloereção e atividade/inatividade dos animais dentro da caixa. De fato, a letalidade, a perda de peso corporal e o score clínico se corroboraram para que a dose de escolha para a realização dos próximos experimentos fosse a de 75 mg/Kg.

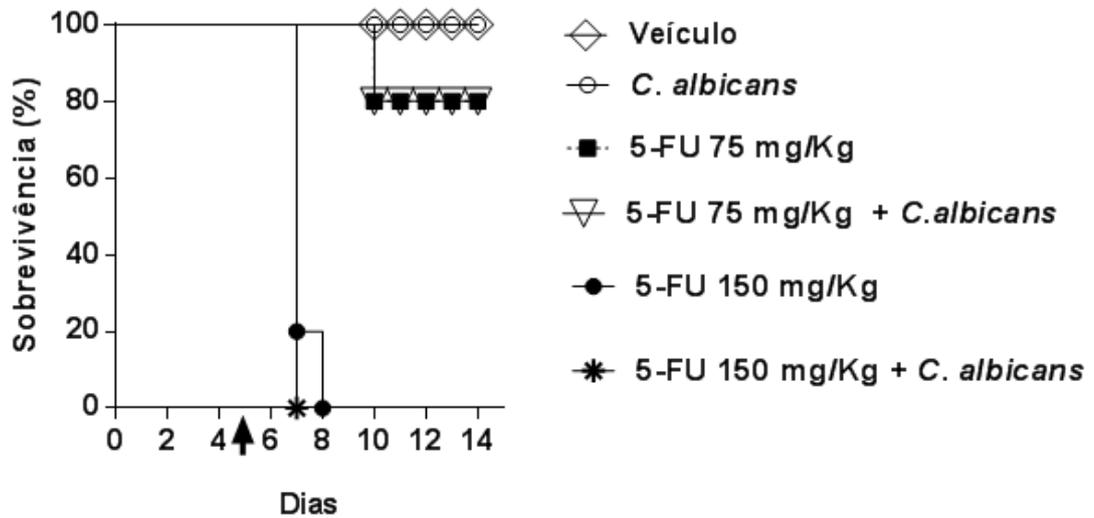


Figura 19: Letalidades induzidas pelas doses de 75 e 150 mg/kg de 5-FU. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU nas doses de 75 de 150 mg/kg por três dias consecutivos. No quinto dia após a primeira dose de 5-FU esses animais foram infectados com 2×10^7 UFC de *C. albicans* e monitorados por duas semanas. A seta do gráfico indica o dia da infecção dos animais. O grupo foi de 4- 5 animais.

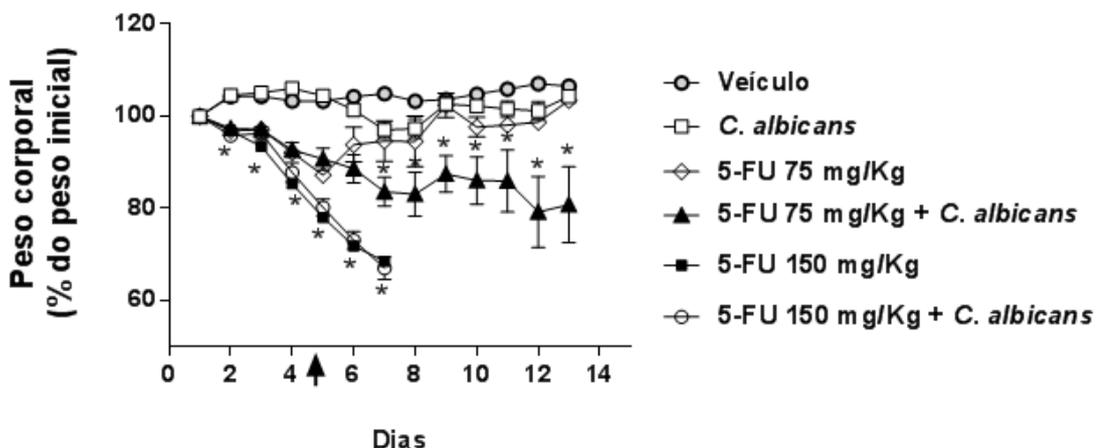


Figura 20: Perda de peso corporal induzida pelas doses de 75 e 150 mg/Kg de 5-FU. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU nas doses de 75 de 150 mg/kg por três dias consecutivos. No quinto dia após a primeira dose de 5-FU esses animais foram infectados com 2×10^7 UFC de *C.*

albicans e monitorados por duas semanas. A seta do gráfico indica o dia da infecção dos animais. N= 8-13 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais veículo NI.

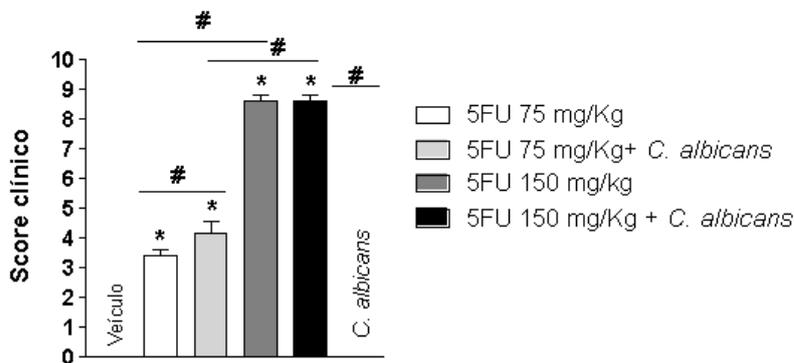


Figura 21: Score clínico referente ao uso de 5-FU nas doses de 75 e 150 mg/Kg. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU nas doses de 75 de 150 mg/kg por três dias consecutivos. No quinto dia após a primeira dose de 5-FU esses animais foram infectados com 2×10^7 UFC de *C. albicans* e foram monitorados por duas semanas. Os parâmetros inclusos no score clínico foram perda de peso, consistência das fezes, postura arqueada, piloereção e atividade/inatividade dentro da caixa. N= 8-13 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando a comparados os outros grupos.

5.2.2 Tempo de infecção por *C. albicans* em animais tratados com 5-FU (75 mg/Kg)

O tempo de infecção nesse modelo de imunossupressão induzido por 5-FU foi definido com base nos resultados anteriores desse trabalho que nos mostram que os animais imunossuprimidos com DEX perdem em torno de 20% do peso corporal durante o curso da infecção de sete dias. Por isso, optamos por realizar a eutanásia com dois dias de infecção. Foi analisado o potencial de 5-FU (75 mg/Kg) em causar leucopenia, a recuperação da carga fúngica, a atividade de MPO, scores e quantificação de citocinas e quimionas por ELISA.

A figura 22, com baixa contagem de leucócitos em animais tratados com 5-FU, e a figura 23 com elevada carga fúngica na língua de animais tratados com 5-FU, mostram os efeitos imunossupressores causados pelo antitumoral.

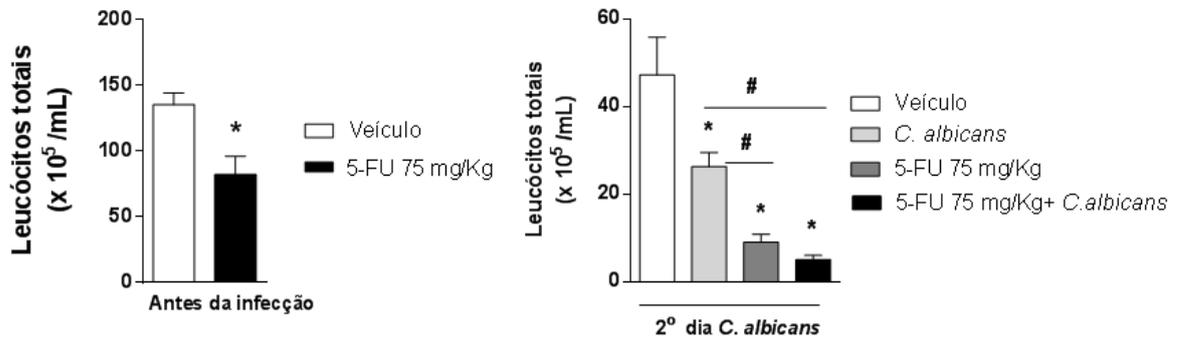


Figura 22: Contagem total de leucócitos do sangue de animais tratados com 5-FU (75 mg/Kg) e infectados com *C.albicans* após 2 dias de infecção. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. N= 4-7 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos.

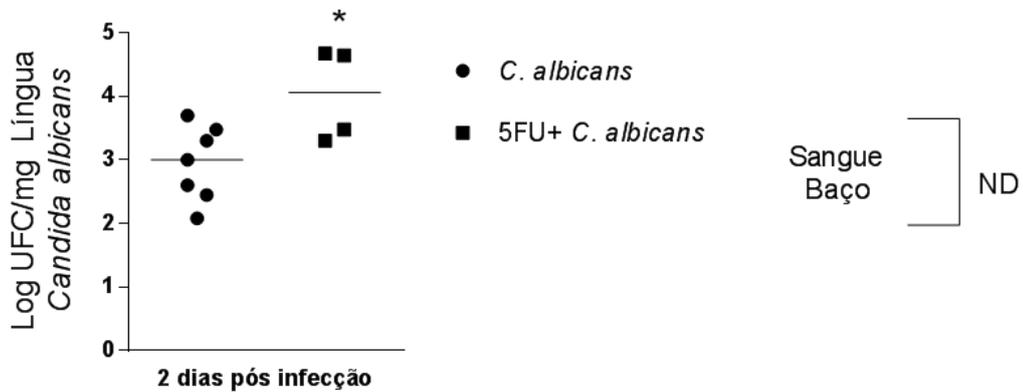


Figura 23: Carga fúngica em animais tratados com 5-FU após dois dias de infecção por *C. albicans*. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU e infectados *C. albicans* no quinto dia posterior a primeira dose do quimioterápico. O grupo 5-FU 75 mg/Kg + *C. albicans* receberam 5-FU e o *C. albicans* receberam injeção de PBS. N= 4-7 animais.* para $p < 0,05$.

Corroborando com os dados de contagem total de leucócitos e carga fúngica, na figura 24, podemos constatar que o MPO na língua não foi detectável e no baço houve um baixo recrutamento de neutrófilos dos animais tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans* quando comparado com os outros grupos.

MPO Língua: ND

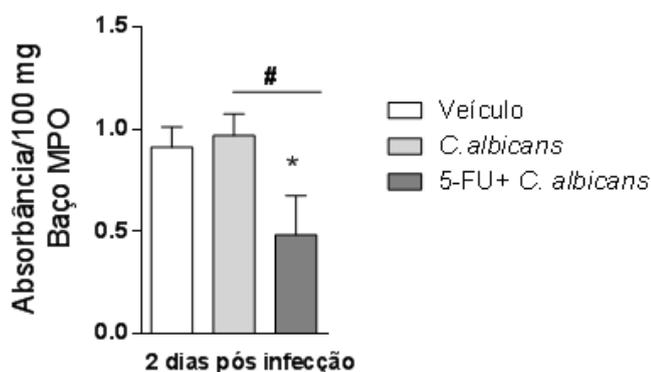


Figura 24: Animais tratados com 5-FU 75 mg/Kg infectados com *C. albicans* têm redução do recrutamento de neutrófilos na língua e no baço no segundo dia de infecção. A migração de neutrófilos foi avaliada pela quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO). Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por 100mg de tecido. N= 4-7 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI (veículo). # $p < 0,05$ quando comparados com os outros grupos.

Para avaliar o perfil de algumas citocinas e quimiocina com dois dias de infecção por *C. albicans*, quantificou-se, no soro e na língua dos animais, TNF, CXCL-1 e CCL-11. Os resultados mostraram uma discreta elevação da quimiocina CCL-11 na língua dos animais tratados e infectados e um aumento de CXCL-1 tanto na língua como no soro desses animais. Enquanto TNF, por ser uma citocina de resposta inicial, não foi encontrada em níveis elevados com dois dias de infecção (figura 25).

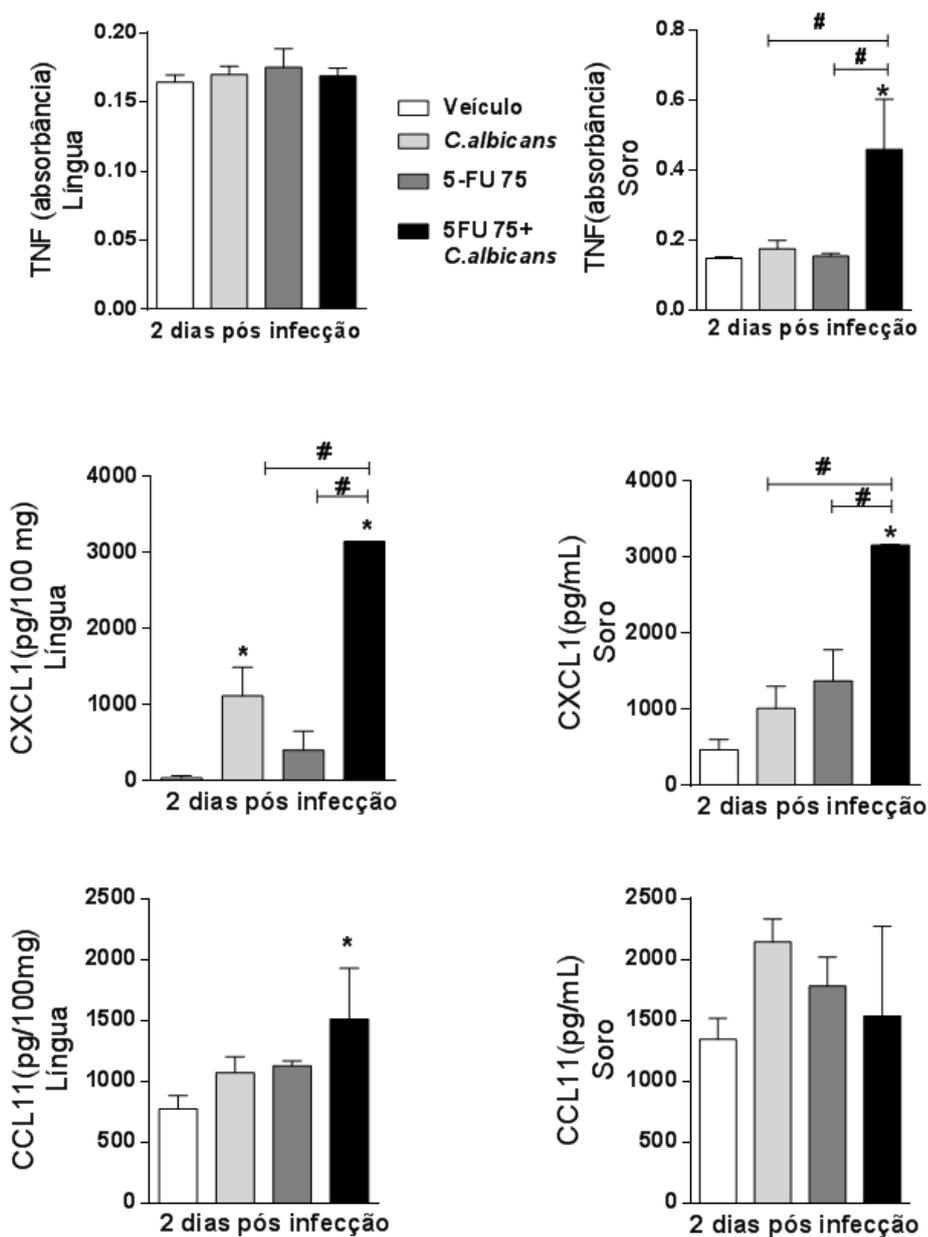


Figura 25: Níveis de citocina e quimiocinas em animais tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans* após dois dias de infecção. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Os mediadores inflamatórios TNF, CXCL-1 e CCL-11 foram quantificados por ELISA na língua e soro dos animais. Os resultados são apresentados como pg/100mg de tecido e por mL de soro. N= 4-7 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos.

5.2.3 Efeito do antagonista do receptor CXCR2 na candidíase oral em animais tratados com 5-FU

Como observamos um aumento significativo da quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos, CXCL-1, tratamos os animais com um antagonista do receptor dessa quimioquina, CXCR2, denominado DF 2156. Esse antagonista foi utilizado na dose de 10 mg/Kg, por via subcutânea. O DF 2156A é um inibidor não competitivo potente e seletivo dos receptores CXCR1 e CXCR2 (Bertini *et al.*, 2012). A contagem total de leucócitos no sangue demonstra uma menor quantidade dessas células no grupo tratado com DF 2156A, no entanto não observamos aumento da carga fúngica (figura 26).

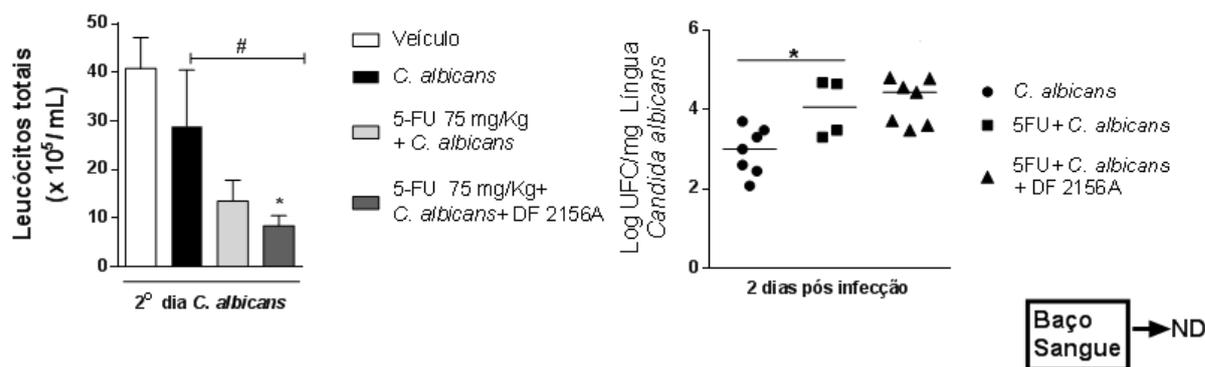


Figura 26: O tratamento com DF 2156A não altera a depuração fúngica. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans* no quinto dia posterior a primeira dose do quimioterápico. Um grupo de animais recebeu DF 2156A por via subcutânea, de 12h em 12h, começando 12h antes da infecção até 12h antes da eutanásia. N= 4-7 animais.* para $p < 0,05$.

Após a quantificação dos níveis da enzima MPO, demonstramos que em animais tratados com DF 2156A teve uma brusca redução no recrutamento de neutrófilos no baço e quantidades de MPO não detectáveis na língua quando comparamos com o veículo e com os outros grupos (figura 27). No entanto, a redução do recrutamento de neutrófilos não refletiu em aumento da carga fúngica nos tecidos dos animais tratados com o antagonista de CXCR2.

MPO Língua: ND

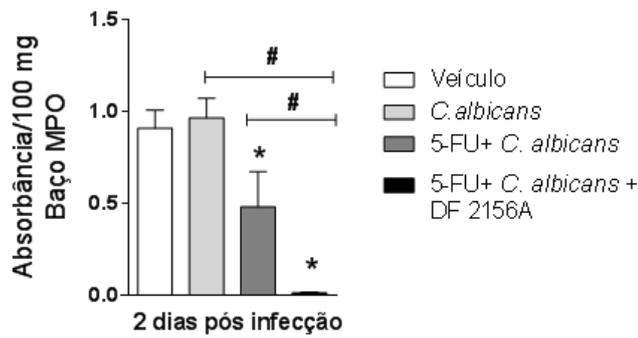


Figura 27: O recrutamento de neutrófilos, em animais tratados com DF 2156A, foi significativamente reduzido no baço e não detectável na língua. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Um grupo de animais recebeu DF 2156A por via subcutânea, de 12h em 12h, começando 12h antes da infecção até 12h antes da eutanásia. A migração de neutrófilos foi avaliada pela quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) na língua e no baço. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por 100mg de tecido. N= 4-7 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI (veículo). # $p < 0,05$ quando comparados com os outros grupos.

Como parâmetro clínico, os animais foram pesados todos os dias durante todo experimento. Como resultado podemos identificar que o tratamento com DF 2156A não altera a perda de peso corporal induzida por 5-FU e *C. albicans*

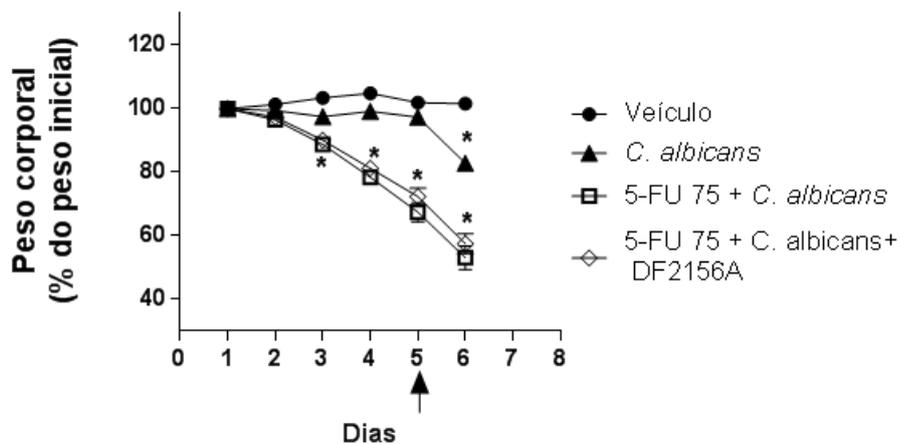


Figura 28: O tratamento com DF 2156A não altera, significativamente, a perda de peso corporal induzida por 5-FU e pela infecção por *C. albicans*. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Um grupo de animais recebeu DF 2156A N= 6 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle.

6. Modelo de candidíase oral associada ao quimioterápico 5-FU 75 mg/Kg em animais BALB/c WT e BALB/c deficientes em eosinófilos ($\Delta db/Gata1^{-/-}$)

6.1 Alterações da resposta imune induzidas pela infecção oral por *C. albicans* em animais Balb/c, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU 75 mg/Kg.

Após dois dias de infecção por *C. albicans* os animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ foram eutanasiados e o sangue foi coletado para realização da contagem total de leucócitos. De acordo com a figura 29, os animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ apresentaram perfis semelhantes de leucopenia.

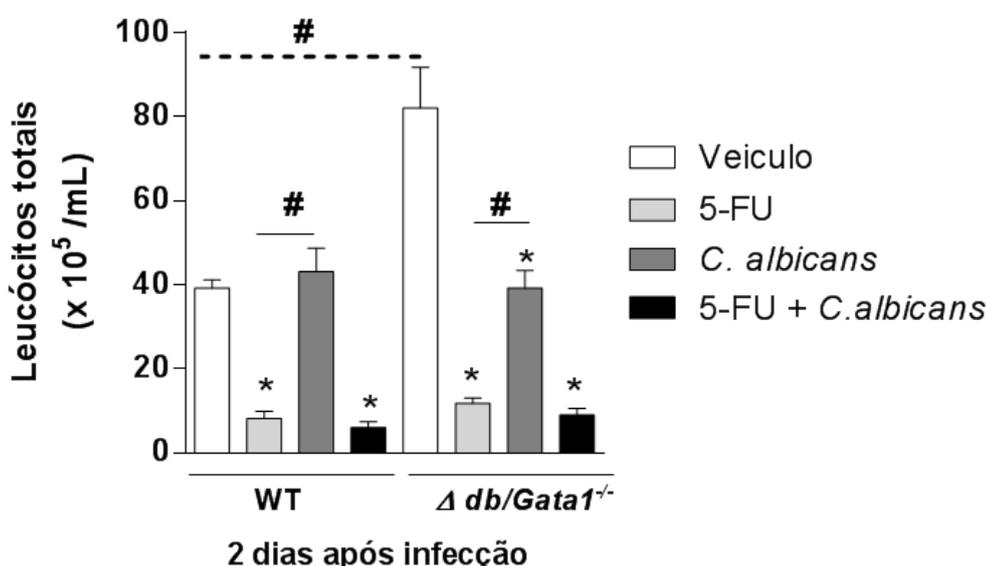


Figura 29: Contagem total de leucócitos em animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Animais da linhagem Balb/c, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, foram tratados com 5-FU, via i.p, por três dias consecutivos, uma vez/dia e infectados com 2×10^7 UFC de *C. albicans* no quinto dia posterior a primeira dose do quimioterápico. N= 6-9 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados com os outros grupos.

O score clínico relaciona as características clínicas da doença à gravidade e ao prognóstico. O tratamento com 5-FU associado à candidíase oral foi avaliado com base na perda de peso, na consistência das fezes, postura arqueada, piloereção e comportamento de

atividade ou inatividade dos animais dentro da caixa. Nossos resultados mostraram que os animais deficientes em eosinófilos ($\Delta db/Gata1^{-/-}$), apesar de apresentarem uma leucopenia semelhante aos animais WT, apresentaram melhor condição clínica. De acordo com a figura 30, os animais do grupo 5-FU WT apresentaram um score clínico significativamente maior do que os animais 5-FU $\Delta db/Gata1^{-/-}$. Os animais tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans* WT também exibiram sinais clínicos estatisticamente mais intensos quando comparados aos animais do grupo 5-FU + *C. albicans* $\Delta db/Gata1^{-/-}$.

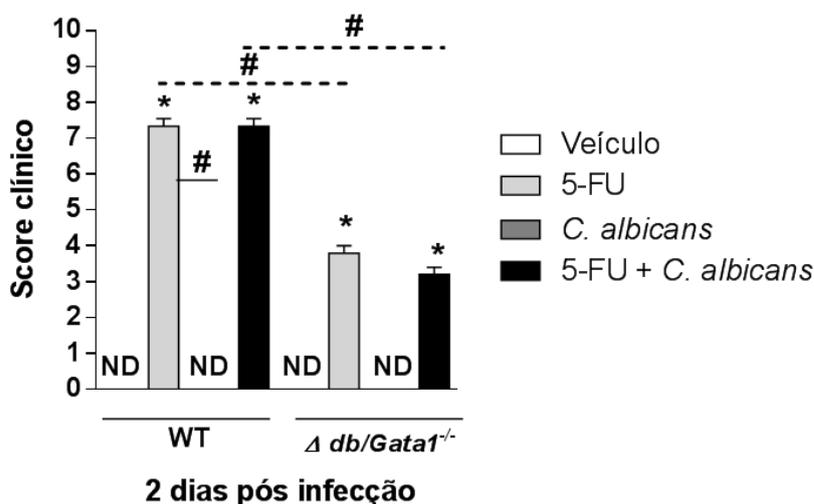


Figura 30: Score clínico de animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Animais da linhagem Balb/c foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Os parâmetros incluídos no score clínico foram perda de peso, consistência das fezes, postura arqueada, piloereção e atividade dentro da caixa. N= 6-9 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais veículo NI. # $p < 0,05$ quando a comparados os outros grupos.

Os animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ foram avaliados e comparados quanto à carga fúngica e o que detectamos foi uma discreta redução da quantidade de *C. albicans* na língua dos animais do grupo *C. albicans* $\Delta db/Gata1^{-/-}$ quando comparado ao grupo *C. albicans* WT. Ao compararmos os animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ dos grupos 5-FU + *C. albicans* não apresentaram diferença na carga fúngica.

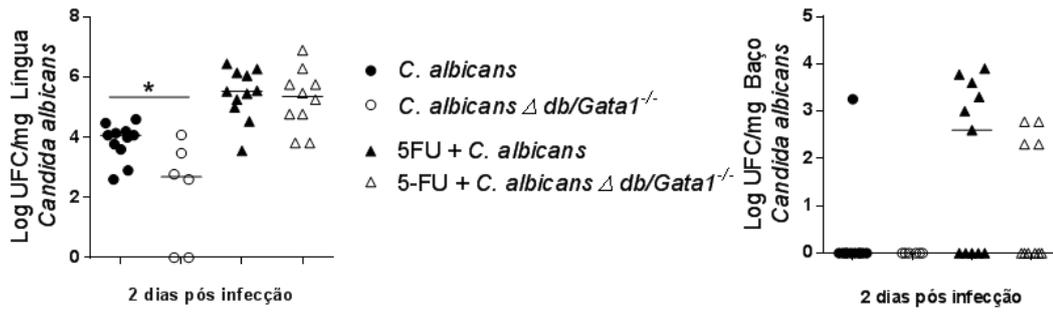


Figura 31: A carga fúngica dos animais $\Delta db/Gata1^{-/-}$ infectados com *C. albicans* é menor que a dos WT *C. albicans*. Animais da linhagem Balb/c, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. A eutanásia foi realizada no segundo dia de infecção para avaliação da carga fúngica da língua e do baço. N= 6-11 animais. * para $p < 0,05$

O recrutamento de neutrófilos nos animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ foi avaliado por meio da quantidade de MPO presente nos tecidos da língua e do baço. Na língua e no baço não houve diferença estatística no recrutamento de neutrófilos entre os grupos WT e os $\Delta db/Gata1^{-/-}$. O recrutamento de macrófagos nos animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ foi avaliado por meio da quantidade de NAG presente nos tecidos da língua e do baço. Nossos resultados mostram que houve maior quantidade de NAG na língua de animais *C. albicans* $\Delta db/Gata1^{-/-}$ em relação ao grupo WT e no baço não houve diferença.

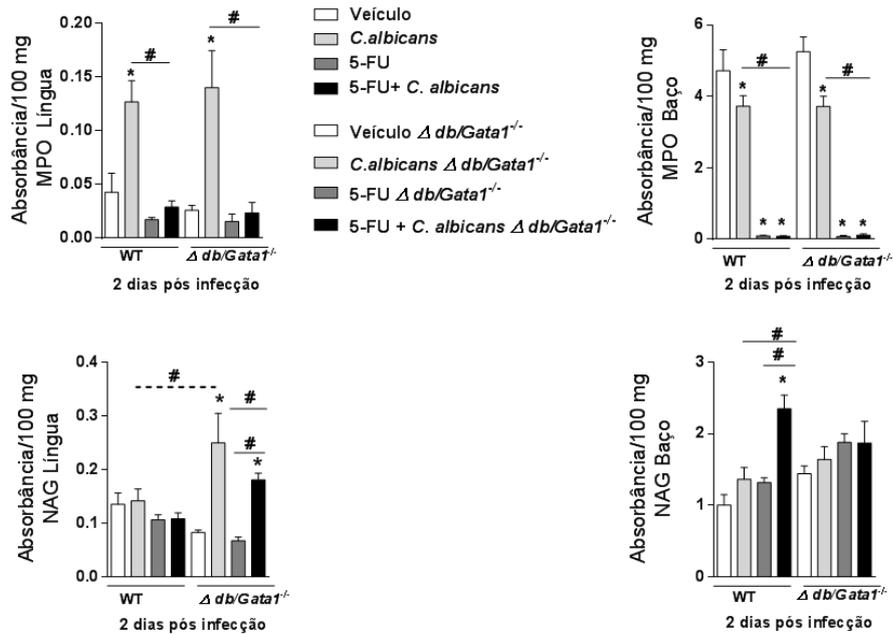
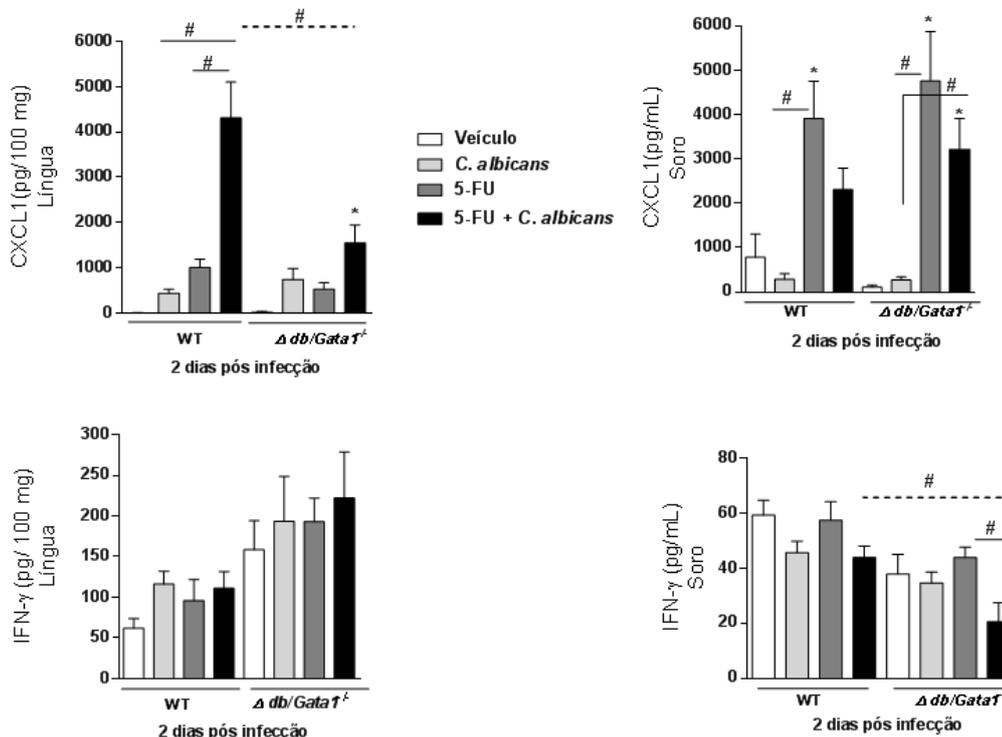


Figura 32: Recrutamento de neutrófilos e macrófagos em animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com

5-FU e infectados com *C. albicans*. A migração de neutrófilos foi avaliada pela quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) e a de macrófagos foi avaliada pela quantificação dos níveis da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) na língua e no baço. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos e macrófagos por 100mg de tecido. N= 6-9 animais * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI (veículo). # $p < 0,05$ quando comparados com os outros grupos.

Para a determinação do perfil de algumas citocinas e quimiocinas na candidíase oral, a língua e o soro de animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, foram utilizados para o ensaio de ELISA. A figura 33 demonstra que ocorreu um aumento significativo de CXCL-1 na língua dos animais WT do grupo 5-FU+*C. albicans* em relação ao grupo 5FU+ *C. albicans* $\Delta db/Gata1^{-/-}$. Além disso, a quantidade de IFN- γ também foi maior no soro de animais do grupo 5FU + *C. albicans* WT. Já a IL-1 β se elevou na língua dos animais do grupo *C. albicans* WT quando comparado ao grupo *C. albicans* $\Delta db/Gata1^{-/-}$. A citocina IL-17 foi encontrada em maior quantidade na língua dos animais do grupo tratado com 5-FU WT quando comparado ao grupo 5-FU $\Delta db/Gata1^{-/-}$. No entanto, TNF não apresentou diferença entre os grupos. De maneira geral, tais resultados nos mostram que a resposta de mediadores é mais exacerbada em animais WT em relação aos $\Delta db/Gata1^{-/-}$.



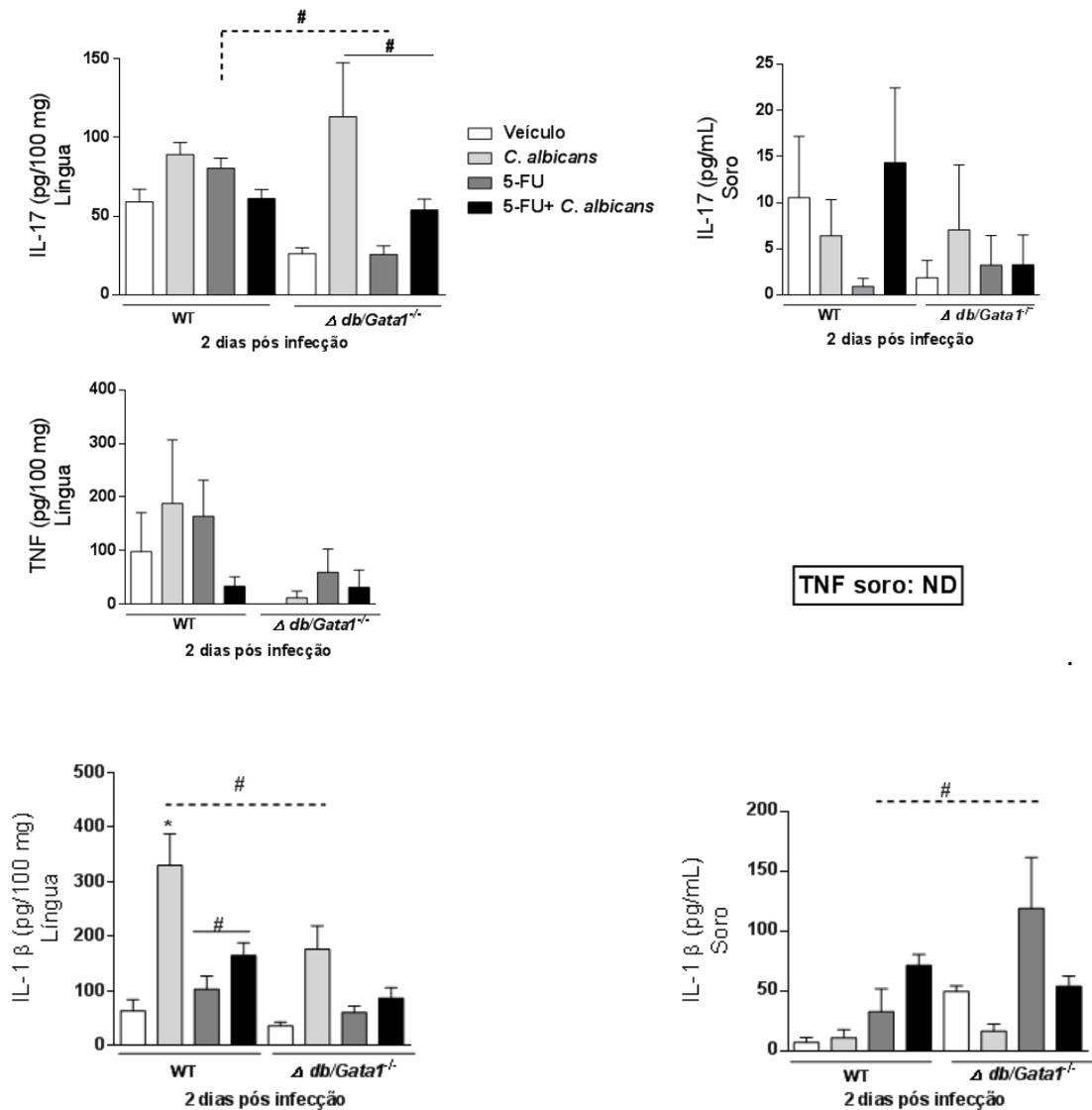


Figura 33: Níveis de citocinas e quimiocinas em animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Os mediadores inflamatórios TNF, CXCL-1, IFN- γ , IL-1 β e IL-17 foram quantificados por ELISA na língua e soro dos animais. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido e por mL de soro. N= 5-6 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando a comparados os outros grupos.

6.2 Alterações histopatológicas na candidíase oral em animais Balb/c, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU 75 mg/Kg.

Na figura 34 estão representadas línguas de animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Na seção histológica 34 A está sendo mostrada a língua de um animal WT tratado com 5-FU a 75 mg/Kg e infectado com *C. albicans*, em que podemos constatar a perda completa do epitélio, com exposição do conjuntivo (ulceração), necrose epitelial e necrose no conjuntivo, com presença de um infiltrado discreto no tecido conjuntivo (coloração de HE). A figura 34 C está representando a língua de um animal WT tratado com 5-FU e infectado com *C. albicans*, porém com coloração de PAS em que podemos observar uma grande quantidade de hifas de *C. albicans* invadindo o tecido epitelial e o conjuntivo. As amostras de língua de camundongos deficientes em eosinófilos (figura 34 B e D) apresentaram alterações histopatológicas mais discretas que as de camundongos WT, embora tenhamos observado exocitose, em algumas amostras de língua de animais $\Delta db/Gata1^{-/-}$, hiperemia vascular e um leve infiltrado inflamatório difuso no conjuntivo (figura 34 B). A quantidade de fungos nas amostras de língua de camundongos $\Delta db/Gata1^{-/-}$ (figura 34 D) foi visivelmente menor, portanto, ao se comparar animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ podemos inferir que a maioria dos camundongos deficientes em eosinófilos apresentam menor lesão tecidual e menor carga fúngica.

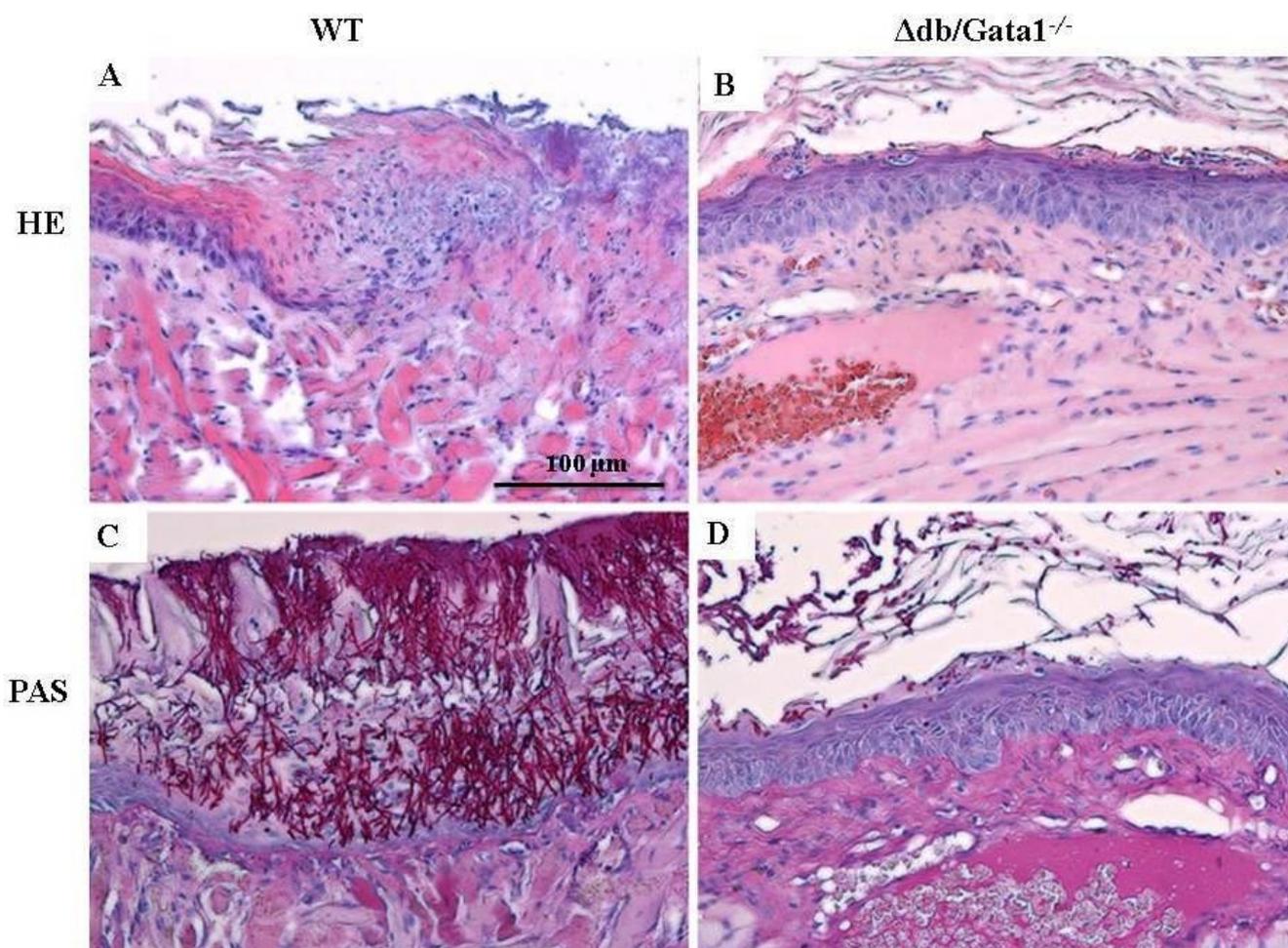


Figura 34: Seções histológicas da língua de animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Em (A) e (C) animal WT tratado com 5-FU e infectado com *C. albicans*; Em (B) e (D) animal $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratado com 5-FU e infectado com *C. albicans* (HE e PAS, aumento original de 20x).

A figura 35 representa o score histopatológico e o infiltrado inflamatório da língua desses animais da figura 34. O maior score ocorreu no grupo 5-FU+ *C. albicans* WT e foi construído com base nos parâmetros de exocitose, erosão epitelial, hiperemia, necrose, ulceração e hemorragia. O maior infiltrado inflamatório foi encontrado na língua de animais WT não tratados com 5-FU, mas infectados com *C. albicans*. Segundo os dados de score não houve diferença estatística entre os animais WT e os $\Delta db/Gata1^{-/-}$.

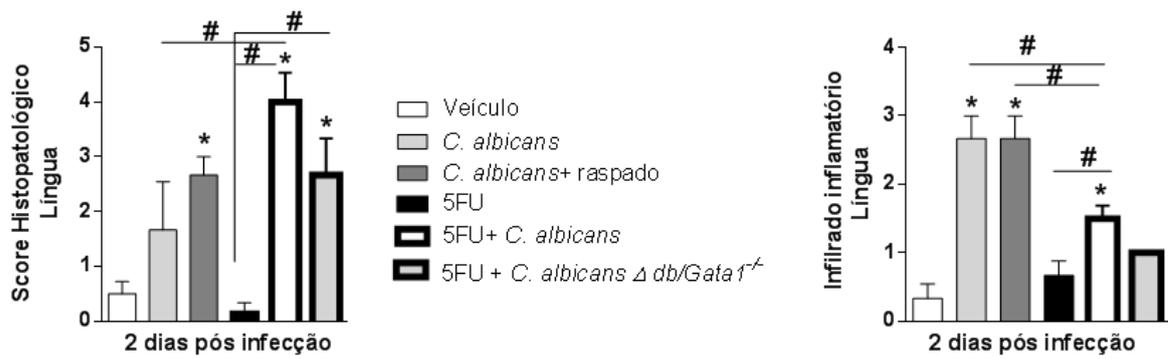


Figura 35: Escore histopatológico e infiltrado inflamatório da língua de animais, WT e Δ db/Gata1^{-/-}, tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Os animais da linhagem Balb/c, WT e Δ db/Gata1^{-/-} foram tratados com 5-FU, infectados e após 2 dias de infecção foram eutanasiados para realização das histologias e dos escores correspondentes. Os grupos foram de 4 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados com grupos infectados.

7. DISCUSSÃO

As infecções fúngicas são um crescente problema de saúde pública e uma causa cada vez mais importante de mortalidade humana, com as espécies de *Candida*, especialmente *C. albicans*, estando entre as infecções oportunistas mais prevalentes. Diversos estudos salientam que o risco de candidíase é aumentado em pacientes com neoplasias subjacentes e em quimioterapia, em pacientes submetidos a transplante de células-troncos hematopoiéticas ou de órgãos sólidos e com doenças imunossupressoras, em uso de antibióticos ou corticosteroides de amplo espectro (Sharma *et al.*, 2019). Modelos animais permitem um estudo mecanístico detalhado de problemas clínicos que podem fornecer informações aplicáveis aos seres humanos. A escolha de um modelo que produz fisiopatologia semelhante é fundamental para garantir a relevância da condição clínica. Diante disso, esse trabalho buscou padronizar modelos de imunossupressão associados à candidíase oral como estratégia para fornecer subsídios para o estudo do papel dos eosinófilos nesse contexto clínico.

Baseado no modelo de imunossupressão de Lima, *et al.*, 2016 que utiliza dexametasona, padronizamos nosso modelo de candidíase oral. Os resultados dessa padronização mostraram que semelhante a humanos imunocompetentes, os camundongos veículos WT, da linhagem C57BL/6, infectados com *C. albicans* são quase completamente resistentes à infecção, com uma carga fúngica menor do que a dos animais WT infectados e tratados com DEX. Além disso, como parâmetro clínico, avaliamos a perda de peso corporal, demonstrando que o tratamento com DEX associado à infecção por *C. albicans* induz uma perda de peso significativamente maior quando comparado ao grupo infectado que recebeu veículo. Esses dados são consistentes com os de Conti *et al.*, 2009 que demonstraram que os animais do grupo DEX tiveram uma perda de peso corporal considerável e uma maior recuperação de *C. albicans* na língua quando comparado com os animais infectados que receberam veículo.

O modelo de imunossupressão por DEX também foi realizado em animais da linhagem Balb/c. Muitos estudos já relataram que até o momento, nenhum modelo murino de candidíase mucosa conseguiu mimetizar uma candidíase bem estabelecida sem causar alguma predisposição do animal, seja por oclusão oral, imunossupressão, alteração cirúrgica ou eliminação da microbiota competidora, e muitas vezes até essas condições associadas (Samaranayake & Samaranayake, 2001). Sendo assim, no modelo de Balb/c, além do tratamento com DEX, incluímos no protocolo uma raspagem/escoriação sublingual anterior à

infecção dos animais para avaliar como as lesões na mucosa podem alterar o perfil de infecção por *C. albicans*. Na literatura existem dados que destacam as diferenças na resposta imunológica entre camundongos BALB/c e C57BL/6 o que pode estar associado a diferente padrão de resposta de linfócito T entre as linhagens: enquanto camundongos BALB/c apresentam um perfil de resposta Th2 os camundongos C57BL/6 apresentam uma resposta com perfil Th1 (Busche *et al.*, 2014).

Nossas análises histopatológicas da língua foram semelhantes com o trabalho de Conti e colaboradores, pois também observamos que na língua de animais infectados e infectados/escoriados houve filamentação de *C. albicans* e invasão da camada epitelial da língua, destruindo a arquitetura geral do epitélio com extensa hiperplasia do tecido epitelial e do conjuntivo que é indicativo de reparo tecidual em andamento. Foi observado um infiltrado inflamatório moderado com predominância de células polimorfonucleares em animais não tratados com DEX. Em contrapartida, o infiltrado no tecido de animais que receberam DEX foi substancialmente reduzido em comparação com os camundongos não imunossuprimidos, o que reflete menor dano tecidual, embora maior carga fúngica. Os animais tratados apresentam menor número de células no tecido devido ao processo de imunossupressão induzido por DEX, caracterizado por leucopenia (Itai *et al.*, 2017). Na língua dos animais estavam presentes tanto leveduras quanto hifas de *C. albicans*, mostrando que este modelo mimetiza as principais características clínicas da candidíase oral humana (Kamai *et al.*, 2001). Portanto, esses dados nos permite inferir que somente a lesão causada pela escoriação não associada ao tratamento por DEX não aumenta a suscetibilidade dos camundongos a uma candidíase oral mais grave, visto que os animais não apresentam leucopenia e conseguem resolver o processo inflamatório.

Um trabalho do nosso grupo já havia realizado um experimento de dose-resposta para determinar a dose de 5-fluorouracil (5-FU) necessária para induzir mucosite intestinal e imunossupressão (Menezes-Garcia, 2014). A mucosite representa um prognóstico negativo para os pacientes em tratamento antineoplásico podendo acarretar interrupção e/ou redução da dose do quimioterápico ou radioterápico (Sonis, 2004). Vários estudos têm demonstrado que a quimioterapia com 5-FU está associada ao desenvolvimento de mucosite, tanto em humanos quanto em camundongos (Menezes-Garcia, 2014). Em nosso modelo experimental, demonstramos que há uma significativa leucopenia nos animais tratados com o 5-FU na dose de 75 mg/kg, confirmando os dados da literatura (Cool *et al.*, 2005). Existem relatos clínicos

de ocorrência de fungemia associada à quimioterapia utilizando cisplatina (CDDP) e 5-FU (Tanabe *et al.*, 1991). No entanto, o fungo não existe no camundongo como parte de sua microbiota, portanto, mesmo se ele aderir será eliminado pela resposta imune do hospedeiro (McMillan *et al.*, 1992). Como tal, não adere por muito tempo e a invasão das hifas só é conhecida por atingir a camada superficial do epitélio (Samaranayake & Samaranayake, 2001). Diante dessas informações, no presente estudo, conseguimos desenvolver um modelo murino de candidíase oral através da administração da droga antineoplásica imunossupressora 5-FU. No entanto, sabemos que o 5-FU pode ter efeitos antifúngicos, visto que a flucitosina, um antifúngico, é um dos seus pró-fármacos. Por esta razão, existe uma preocupação sobre o impacto do efeito antifúngico quando se administra 5-FU como droga anticâncer para desenvolver candidíase oral em modelos murinos. A concentração inibitória mínima (CIM50) de 5-FU em *C. albicans in vitro* é de 100 µg/ mL (Routh *et al.*, 2013). Quando foram administrados 200 mg/kg de 5-FU, por via i.p em camundongos, a concentração no sangue foi de apenas 0,39µg/ml (Chadwick & Rogers *et al.*, 1972). Portanto, previmos que a concentração da droga de 75 mg/Kg que administramos, esperando efeitos imunossupressores/antitumorais não teria efeito antifúngico. Além disso, as análises histopatológicas da língua nos mostraram maior lesão e maior presença de fungo em animais tratados com 5-FU. Portanto, acreditamos que não houve efeito antifúngico de 5-FU e isso não impactou o modelo experimental.

A maioria dos modelos que induzem mucosite oral seguem o método de Sonis *et al.*, sem estimulação física, mas com estimulação química usando ácido acético em uma concentração de 50% para destruir a camada basal do epitélio. No entanto, em nosso trabalho a utilização de ácido acético provocou asfixia e levou os animais a óbito e por isso optamos por utilizar a estimulação física por escoriação sublingual com bisturi. Com a coloração de HE, observamos a destruição causada pela escoriação foi apenas na região ventral e não do dorso da língua e que, de fato, conseguimos reproduzir a mucosite oral clínica por esse método.

Há evidências que sugerem que mediadores pró-inflamatórios, desempenham um papel importante na patogênese da mucosite (Logan *et al.*, 2007) e na infecção por *C. albicans* (Filler *et al.*, 2005). Em trabalhos do nosso grupo foi observado aumento da concentração de CXCL1 e IL-1β, no intestino delgado, mediadores conhecidamente envolvidos na patogênese da mucosite (Arifa *et al.*, 2014 e Menezes-Garcia, 2014). De fato,

foi observado aumento discreto da concentração de TNF no soro dos animais do grupo 5-FU+ *C. albicans* após dois dias de infecção e aumento da concentração de CXCL-1 na língua e no soro dos animais após dois e sete dias de infecção (dados não mostrados). O TNF desempenha um papel importante na resposta do hospedeiro contra infecções por *C. albicans* por estimular a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão de leucócitos, o que leva ao recrutamento de leucócitos polimorfonucleares e aumento da fagocitose e morte de fungos por essas células (Cannom *et al.*, 2012). Além de TNF e CXCL-1, houve elevação da quimiocina CCL11 na língua dos animais do grupo 5-FU+ *C. albicans* após dois dias de infecção. As quimiocinas CXCL-1 e CCL-11 estão relacionadas ao recrutamento de neutrófilos e de eosinófilos, respectivamente (Johnston *et al.*, 2004).

Mesmo que a neutropenia sangüínea possa comprometer a resposta imune do hospedeiro em momentos posteriores, o acúmulo precoce de neutrófilos na mucosa é um evento chave na condução de danos e doenças teciduais durante a quimioterapia do câncer (Guabiraba *et al.*, 2014). Um estudo utilizando o antineoplásico Irinotecano (CPT-11) como indutor de mucosite demonstrou que os neutrófilos desempenham um papel fundamental na patogênese da mucosite através da liberação de IL-33 (Guabiraba *et al.*, 2014). Como estratégia depletaram os neutrófilos e bloquearam o receptor CXCR2 com DF2156A, que resultou na redução significativa da mucosite intestinal induzida por CPT-11. Esses resultados indicam o papel crítico da migração de neutrófilos na mucosite induzida por CPT-11. (Guabiraba *et al.*, 2014). Portanto, com o objetivo de investigar o papel dos neutrófilos na candidíase oral associada ao tratamento com 5-FU, administramos nos camundongos C57BL/6 um antagonista seletivo dos receptores CXCR1/2, DF2156A (Bertini *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com DF2156A, por via subcutânea, não refletiu em alteração na carga fúngica tecidual dos animais quando comparamos com os animais que não receberam DF2156A. No entanto, a medida de MPO no baço de animais que receberam DF2156A apresentou uma redução drasticamente significativa em relação aos outros grupos. Além disso, avaliamos como parâmetro clínico a perda de peso corporal e não observamos uma melhora clínica significativa nesse aspecto. Em um estudo que avaliou o papel dos neutrófilos na artrite experimental aguda, também utilizou o antagonista DF2156A e concluíram que não houve melhora nas alterações metabólicas sistêmicas observadas em camundongos com artrite induzida por antígeno (AIA) (Oliveira *et al.*, 2016).

Um outro trabalho realizado em nosso grupo utilizou animais $\Delta db/Gata1^{-/-}$ para avaliar o papel de eosinófilos na mucosite induzida por Irinotecano. Os resultados mostraram que na ausência de eosinófilos os animais apresentaram atenuação na perda de peso e melhora no escore clínico. Além disso, os camundongos $\Delta db/Gata1^{-/-}$ apresentaram menor lesão intestinal, melhor preservação da arquitetura intestinal, menores áreas de erosão/ulceração e menor infiltrado inflamatório. E a menor gravidade da mucosite foi associada à diminuição da produção de CCL-11 e CCL-24, quimiocinas envolvidas no recrutamento de eosinófilos (Arifa *et al.*, em preparação). Acredita-se que os eosinófilos possuam grânulos eosinofílicos que podem liberar seu conteúdo, incluindo EPO e citocinas, por estimulação de sinais pró-inflamatórios (Fulkerson & Rothenberg, 2013). Esses eventos podem causar dano tecidual e ativação de outras células, como neutrófilos (Vieira *et al.*, 2009).

Até então não existem dados na literatura que correlacionam candidíase e ação dos eosinófilos. Sendo assim, para estudarmos o papel dos eosinófilos nesse contexto utilizamos camundongos $\Delta db/GATA1^{-/-}$ com retirada completa de eosinófilos na circulação, medula óssea e tecidos. Os animais $\Delta db/GATA1^{-/-}$ possuem deleção de um sítio de ligação ao GATA de alta afinidade no promotor GATA-1, um elemento que supostamente medeia a autorregulação positiva da expressão do GATA-1 e leva à perda seletiva da linhagem dos eosinófilos (Yu *et al.*, 2002). Nossos resultados demonstram que os eosinófilos não tem papel importante na depuração fúngica, visto que a carga de *C. albicans* nos tecidos dos camundongos $\Delta db/GATA1^{-/-}$ foram semelhantes a dos WT. Nossos dados corroboram com os de Malacco *et al.*, 2019 que mostram que embora o número de eosinófilos tenha aumentado após a infecção por *Aspergillus fumigatus*, essas células parecem desempenhar um papel secundário no processo de eliminação dos fungos, pois o número de UFC nos pulmões dos animais foram semelhantes entre os grupos WT e $\Delta db/GATA1^{-/-}$ (Malacco, *et al.*, 2019). Além disso, avaliamos o nível de algumas citocinas e quimiocinas e corroborando com o trabalho de Malacco, *et al.*, 2019, observamos que os níveis de CXCL-1 na língua, IFN- γ no soro e IL-1 β foram significativamente maiores em animais WT. A concentração desses mediadores também aumentou após a infecção sublingual de camundongos $\Delta db/GATA1^{-/-}$, mas o aumento foi de intensidade menor que a observada em camundongos WT. No entanto, não observamos diferença na produção de IL-17 entre WT e $\Delta db/GATA1^{-/-}$ como mostrado por Malacco *et al.*, 2019 na infecção pulmonar por *A. fumigatus*.

Os eosinófilos desempenham um papel imunorregulador e já foi demonstrado que eles podem secretar fatores ou desencadear a expressão de fatores com atividades ativadoras de macrófagos, como TGF- β , IL-1, IL-6, TN, proteína inflamatória de macrófagos-1 α , bem como ativadoras de neutrófilos (Jacobsen *et al.*, 2007). Portanto, isso sugere que os eosinófilos são capazes de alterar o perfil de resposta de outras células. Diante disso, nossos resultados mostraram que a medida indireta do recrutamento de macrófagos, NAG, foi significativamente maior na língua de animais $\Delta db1GATA1^{-/-}$ infectados com *C. albicans*. Isso sugere que os eosinófilos ao tentarem conter o estímulo fúngico podem causar lesão tecidual, bem como comprometer a atividade dos macrófagos em animais WT. Já na ausência de eosinófilos e de seus mediadores, animais $\Delta db1GATA1^{-/-}$, os macrófagos podem ter seu perfil alterado e conseguir responder ao estímulo da forma correta, como com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e da fagocitose de leveduras. De fato, para elucidar tais mecanismos são necessários estudos mais profundos.

Ao avaliarmos as histologias inferimos que a lesão tecidual na língua de animais $\Delta db1GATA1^{-/-}$ são bem mais discretas, assim como a quantidade de células inflamatórias e fúngicas é menor em relação ao grupo WT. A perda de peso dos animais nos experimentos pode ser justificada, em parte, pela menor ingestão de comida, pois apesar de não termos utilizado gaiola metabólica fizemos uma estimativa da alimentação por meio da pesagem diária da ração e, de fato, os animais infectados ingeriram menos alimento (dados não mostrados). O score clínico dos animais $\Delta db1GATA1^{-/-}$ foi consideravelmente menor, indicando que na ausência de eosinófilos a resposta de defesa parece ser mais resolutiva e menos lesiva. Diante da relevância clínica da candidíase oral, esse resultado de score clínico denota o papel crucial dos eosinófilos na patogênese da candidíase tendo como agente etiológico a *C. albicans*. Portanto, nossos resultados são subsídios para que mais estudos sejam realizados a fim de compreender melhor o papel dos eosinófilos na infecção por *Candida albicans*, assim como seu potencial como alvo terapêutico.

8. CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho, foi possível compreender um pouco da relevância clínica da candidíase oral em contextos de imunossupressão e ainda percebemos a falta de modelos murinos que consigam mimetizar, de fato, a candidíase ocorrida em humanos. Além da construção de dois modelos, um utilizando DEX e o outro 5-FU, realçamos a importância dos eosinófilos na relação *C. albicans*/hospedeiro. O papel modulador dos eosinófilos ficou claro, visto que em animais Δ dblGATA1^{-/-}, na ausência de eosinófilos e de seus mediadores que podem causar lesão, observamos uma resposta inflamatória de macrófagos e de neutrófilos mais pontual e efetiva, e isso pôde ser comprovado pela melhora clínica e histopatológica desses animais. Muitas pesquisas e melhorias ainda são necessárias para elucidação dos diversos mecanismos envolvidos nesse processo, no entanto os resultados desse trabalho nos instiga a continuar buscando respostas.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 157/2018

Título do projeto: 1.2 O PAPEL DAS ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA NA IMUNOSSUPRESSÃO INDUZIDA POR SEPSE POLIMICROBIANA EM CAMUNDONGOS.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Danielle da Gloria de Souza

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 08/10/2018. Validade: 08/10/2018 à 07/10/2023

RECOMENDAÇÃO: Prezado pesquisador, o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.

Belo Horizonte, 08/10/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE P, CASADEVALL A. Quorum sensing in fungi--a review. **Med Mycol**, 2012.

ALMEIDA RS, BRUNKE S, ALBRECHT A, THEWES S, LAUE M, EDWARDS JE, *et al.* The hyphal associated adhesion and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. **PLoS Pathog**, 2008.

ALMEIDA RS, WILSON D, HUBE B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Res**, 2009.

AMULIC, B., CAZALET, C., HAYES, G. L., METZLER, K. D. & ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu. Rev. Immunol**, 2012. 30, 459–489.

BARMAN, ANANYA & GOHAIN, DIBAKAR & BORA, UTPAL & TAMULI, RANJAN. Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. **Microbiological Research**, 2018.

BERTINI, R *et al.* “Receptor binding mode and pharmacological characterization of a potent and selective dual CXCR1/CXCR2 non-competitive allosteric inhibitor”. **British journal of pharmacology**, 2012. vol. 165,2 436-54.

BÖTTCHER B, PÖLLATH C, STAIB P, HUBE B AND BRUNKE S. *Candida* species Rewired Hyphae Developmental Programs for Chlamydospore Formation. **Front. Microbiol.**, 2016; 7:1697.

BRANZK, N. *et al.* Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nat. Immunol.**, 2014. 5, 1017–1025.

BRENA S, CABEZAS-OLCOZ J, MORAGUES MD, FERNANDEZ DE LARRINOA I, DOMINGUEZ A, QUINDOS G, PONT_ON J. Fungicidal monoclonal antibody C7 interferes with iron acquisition in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother.**, 2011.

BROWN AJP, BROWN GD, NETEA MG, GOW NAR. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. **Trends Microbiol.** England; 2014;22: 614–622

BROWN AJP, HAYNES K, GOW NAR, QUINN J. Stress Responses in *Candida*. In: Calderone RA, Clancy CJ, ed. *Candida and Candidiasis: ASM Press*, 2012. Washington, DC, pp. 225-242.,

BROWN GC. Living too long: the current focus of medical research on increasing the quantity, rather than the quality, of life is damaging our health and harming the economy. **EMBO Rep.** 2014;16(2):137-41.

BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annu. Rev. Immunol.**, 2011.

BUSCH, R. A., JONKER, M. A., PIERRE, J. F., HENEGHAN, A. F., & KUDSK, K. A. Innate Mucosal Immune System Response of BALB/c vs C57BL/6 Mice to Injury in the Setting of Enteral and Parenteral Feeding. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2014. 40(2), 256–263.

CAMPOS, C. F. *et al.* Host Genetic Signatures of Susceptibility to Fungal Disease. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, [s.l.], p.1-27, 2018.

CANNOM, R. R. M., FRENCH, S. W., JOHNSTON, D., EDWARDS, JR., J. E., & FILLER, S. G. *Candida albicans* Stimulates Local Expression of Leukocyte Adhesion Molecules and Cytokines In Vivo. **The Journal of Infectious Diseases**, 2002.186(3), 389–396.

CARLISLE PL, *et al.* Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009;106:599–604.

CATO AC, NESTL A, AND MINK S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. **Sci STKE**, 2002.

CHADWICK M, ROGERS WI. The physiological disposition of 5-fluorouracil in mice bearing solid L1210 lymphocytic leukemia. **Cancer Res.** 1972;32:1045–56.

CHANG, C.-T., HO, T.-Y., LIN, H., LIANG, J.-A., HUANG, H.-C., LI, C.-C.,HSIANG, C.-Y. 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis via Nuclear Factor- κ B Activation by Transcriptomic Analysis and In Vivo Bioluminescence Imaging. **PLoS ONE**, 2012.7(3), e31808.

CHENG SC, VAN DE VEERDONK F, SMEEKENS S, JOOSTEN LA, VAN DER MEER JW, KULLBERG BJ, NETEA MG. *Candida albicans* dampens host defense by downregulating IL-17 production. **J Immunol**, 2010.

CHENG, S. C. *et al.* Complement plays a central role in *Candida albicans*-induced cytokine production by human PBMCs. **Eur. J. Immunol.**, 2012. 42, 993–1004.

CHUNG Y, CHANG SH, MARTINEZ GJ, YANG XO, NURIEVA R, KANG HS, MA L, WATOWICH SS, JETTEN AM, TIAN Q, *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. **Immunity**, 2009.

CONTI HR, SHEN F, NAYYAR N, *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **J Exp. Med.**, 2009;206(2):299–311.

CONTI, H. R. *et al.* Oral-resident natural Th17 cells and $\gamma\delta$ T cells control opportunistic *Candida albicans* infections. **J. Exp. Med.**, 2014. 211, 2075–2084.

CONTI, HEATHER R *et al.* “IL-17 Receptor Signaling in Oral Epithelial Cells Is Critical for Protection against Oropharyngeal Candidiasis” **Cell host & microbe**, 2016: vol. 20,5 606–617.

COOL, J. C., J. L. DYER, *et al.* Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Growth Horm IGF Res**, 2005. v.15, n.1, Feb, p.72-82.

COUTINHO AE AND CHAPMAN KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Mol Cell Endocrinol**, 2011. 335:2–13.

CRAIK, V. B *et al.* “Sensitivity of White and Opaque *Candida albicans* Cells to Antifungal Drugs”. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2017 ;vol. 61,8 e00166-17.

DADAR, M., TIWARI, R., KARTHIK, K., CHAKRABORTY, S., SHAHALI, Y., & DHAMA, K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. **Microbial Pathogenesis**, 2018. 117, 128–138.

DAVIS DA. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. **Curr Opin Microbiol**, 2009.

DAVIS, S. E. *et al.* Masking of $\beta(1-3)$ -glucan in the cellwall of *Candida albicans* from detection by innate immune cells depends on phosphatidylserine. **Infect. Immun.**, 2014. 82, 4405–4413.

DE LUCA A, ZELANTE T, D'ANGELO C, ZAGARELLA S, FALLARINO F, SPRECA A, IANNITTI RG, BONIFAZI P, RENAULD JC, BISTONI F, *et al.* IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. **Mucosal Immunol**, 2010.

DE OLIVEIRA SANTOS GC, VASCONCELOS CC, LOPES AJO, DE SOUSA CARTÁGENES MDS, FILHO AKDB, DO NASCIMENTO FRF, RAMOS RM, PIRES ERB, DE ANDRADE MS, ROCHA FMG AND DE ANDRADE MONTEIRO C. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Front. Microbiol.**, 2018.

DEL FRESNO, C. *et al.* Interferon- β production via Dectin-1–Syk– IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. **Immunity**, 2013. 38, 1176–1186.

DENG FS, LIN CH. Identification and characterization of ORF19.1725, a novel gene contributing to the white cell pheromone response and virulence-associated functions in *Candida albicans*. **Virulence.**, 2018;9(1):866-878.

DIASIO RB, HARRIS BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. **Clinical Pharmacokinetics**, 1989; 16: 215-37.

DIEHL, R., FERRARA, F., MÜLLER, C., DREYER, A. Y., MCLEOD, D. D., FRICKE, S., & BOLTZE, J. Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. **Cellular & Molecular Immunology**, 2016. 14(2), 146–179.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, 2011. 117, 3720–3732

DOI AM, PIGNATARI ACC, EDMOND MB, MARRA AR, CAMARGO LFA, *et al.* Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLOS ONE**, 2016; 11(1): e0146909.

ENEIV, MATTHEWB. LOHSE, ADRIANV. VLADU, JOACHIM MORSCHHÄUSER, ALEXANDER D. JOHNSON, RICHARD J. BENNETT. Phenotypic Profiling Reveals that *Candida albicans* Opaque Cells Represent a Metabolically Specialized Cell State Compared to Default White Cells. **mBio** Nov, 2016.

ENE I V., Adya AK, Wehmeier S, Brand AC, Maccallum DM, Gow NAR, *et al.* Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. **Cell Microbiol.**,2012;14: 1319–1335.

ENE I V., CHENG SC, NETEA MG, BROWN AJP. Growth of *Candida albicans* cells on the physiologically relevant carbon source lactate affects their recognition and phagocytosis by immune cells. **Infect Immun.**, 2013;81: 238–248

FERWERDA, B. *et al.* Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. **N. Engl. J. Med.**, 2009. 361, 1760–1767

FERWERDA, G., MEYER-WENTRUP, F., KULLBERG, B. J., NETEA, M. G. & ADEMA, G. J. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. **Cell. Microbiol.**,2008. 10, 2058–2066.

FIGUEIREDO, R. T., & NEVES, J. S. Eosinophils in fungal diseases: An overview. **Journal of Leukocyte Biology**, 2018. 104(1), 49–60.

FINKEL JS, MITCHELL AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nat Rev Microbio**,2011.

FULKERSON PC, ROTHENBERG ME. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. **Nat Rev Drug Discov**; 2013. 12(2):117-129.

GAZENDAM, R. P. *et al.* Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. **Blood**, 2014. 124, 590–597.

GIACOMAZZI, J., BAETHGEN, L., CARNEIRO, L. C., MILLINGTON, M. A., DENNING, D. W., COLOMBO, A. L. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, 2015. 59(3), 145–150.

GOODRIDGE, H. S. *et al.* Activation of the innate immunoreceptor Dectin-1 upon formation of a ‘phagocytosisynapse’. **Nature**, 2011. 472, 471–475.

GOW, N. A., VAN DE VEERDONK, F. L., BROWN, A. J. & NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nat. Rev. Microbiol.**, 2011. 10, 112–122.

GUABIRABA, R., A. G. BESNARD, *et al.* IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunol.**, 2014.v.7, n.5, Sep, p.1079-93.

HALL RA, TURNER KJ, CHALOUPKA J, COTTIER F, DE SORDI L, SANGLARD D, *et al.* The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, 2011.

HELLSTEIN, John W.; MAREK, Cindy L.. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head And Neck Pathology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.25-32, 29 jan. 2019.

HÖFS, Sarah; MOGAVERO, Selene; HUBE, Bernhard. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal Of Microbiology**, 2016; v. 54, n. 3, p.149-169.

HOGAN S. P., ROSENBERG H. F., MOQBEL R., PHIPPS S., FOSTER P. S., LACY P., *et al.* Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin. Exp. Allergy**, 2008; 38, 709–750.

HOGAN S. P., ROSENBERG H. F., MOQBEL R., PHIPPS S., FOSTER P. S., LACY P., *et al.* Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin. Exp. Allergy**, 2008. 38, 709–750.

HOOD MI, SKAAR EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. **Nat Rev Microbiol**, 2012.

HOPKE A, NICKE N, HIDU EE, DEGANI G, POPOLO L, WHEELER RT. Neutrophil Attack Triggers Extracellular Trap-Dependent *Candida* Cell Wall Remodeling and Altered Immune Recognition. **PLoS Pathog.** 2016.

HOYER LL & COTA E. *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. **Front. Microbiol.** 2016; 7:280.

HOYER, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**,2001. 9, 176–180.

ITAI S, SUGA Y, HARA Y, *et al.* Co-administration of dexamethasone increases severity and accelerates onset day of neutropenia in bladder cancer patients on methotrexate, vinblastine, adriamycin and cisplatin chemotherapy: a retrospective cohort study. **J Pharm Health Care Sci.** 2017;3:3.

IFRIM, D. C. *et al.* Role of Dectin-2 for host defense against systemic infection with *Candida glabrata*. **Infect. Immun.** 2014. 82, 1064–1073.]

JACOBSEN, E. A. *et al.* Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation?. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, [s.l.], v. 119, n. 6, p.1313-1320, jun. 2007

JOHNSTON, I. N., E. D. MILLIGAN, *et al.* A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. **J Neurosci**, 2004.v.24, n.33, p.7353-65.

JOLY, S. *et al.* Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. **J. Immunol.**2009. 183, 3578–3581.

JONATHAN P RICHARDSON & DAVID L MOYES. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. **Virulence**, 2015.6:4, 327-337

KAHLENBERG, J. M. & KAPLAN, M. J. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. **J. Immunol.** 191, 4895–4901 (2013).

KAMAI , Y. , M. KUBOTA , Y. KAMAI , T. HOSOKAWA , T. FUKUOKA , AND S. FILLER. New model of oropharyngeal candidiasis in mice. **Antimicrob. Agents Chemo.**2001 45: 3195– 319.

KATAGIRI, H., FUKUI, K., NAKAMURA, K., & TANAKA, A. Systemic hematogenous dissemination of mouse oral candidiasis is induced by oral mucositis. **Odontology**, 2018.

KULLBERG, B. J., VAN 'T WOUT, J. W. & VAN FURTH, R. Role of granulocytes in increased host resistance to *Candida albicans* induced by recombinant interleukin-1. **Infect. Immun.** 1990.58, 3319–3324.

LEE S, KIM H, SONG I, YOUM J, DIZON LA, JEONG S *et al.* Glucocorticoids and their receptors: insights into specific roles in mitochondria. **Prog Biophys Mol Biol** 2013; 112: 44–54.

- LEWIS, M. A. O.; WILLIAMS, D. W.. Diagnosis and management of oral candidosis. **Bdj**, [s.l.], v. 223, n. 9, p.675-681, 10 nov. 2017.
- LI XS, REDDY MS, BAEV D, EDGERTON M. *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. **J Biol Chem**, 2003.
- LI XS, SUN JN, OKAMOTO-SHIBAYAMA K, EDGERTON M. *Candida albicans* cell wall ssa proteins bind and facilitate import of salivary histatin 5 required for toxicity. **J Biol Chem**, 2006.
- LI, F. & PALECEK, S. P. Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell–cell and cell– substrate interactions. **Microbiology**, 2008 154, 1193–1203.
- LI, X., DUBOIS, D. C., SONG, D., ALMON, R. R., JUSKO, W. J., & CHEN, X. Modeling Combined Immunosuppressive and Anti-inflammatory Effects of Dexamethasone and Naproxen in Rats Predicts the Steroid-Sparing Potential of Naproxen. **Drug Metabolism and Disposition**, 2017. 45(7), 834–845
- LIMA, M. T. *et al.* Microbiota is an essential element for mice to initiate a protective immunity against *Vaccinia* virus. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], p.1-7, 25 nov. 2015. Oxford University Press (OUP).
- LOGAN, R. M., R. J. GIBSON, *et al.* Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral Oncol*, v.43, n.4, Apr, p.395-401. 2007.
- LONGLEY, D. B., HARKIN, D. P., & JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, 2003. 3(5), 330–338.
- KABIR A., MOHAMMAD ASIF HUSSAIN, AND ZULFIQAR AHMAD, “*Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens,” **ISRN Microbiology**, 2012.
- MAGILL SS, EDWARDS JR, BAMBERG W, BELDAVS ZG, DUMYATI G, KAINER MA, *et al.* Emerging infections program healthcare-associated infections and antimicrobial use prevalence survey team. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014; 370(13):1198–208.

MALACCO NLSO, RACHID MA, GURGEL ILDS, et al. Eosinophil-Associated Innate IL-17 Response Promotes *Aspergillus fumigatus* Lung Pathology. **Front Cell Infect Microbiol.** 2019;8:453.

MARTCHENKO M, ALARCO AM, HARCUS D, WHITEWAY M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. **Mol Biol Cell**, 2004.

MAVOR AL, THEWES S, HUBE B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. **Curr Drug Targets**, 2005.

MAY RC, CASADEVALL A. In Fungal Intracellular Pathogenesis, Form Determines Fate. **MBio.** 2018;9(5):e02092-18.

MAYER FL, WILSON D, JACOBSEN ID, MIRAMÓN P, GROBE K, HUBE B. The novel *Candida albicans* transporter Dur31 Is a multi-stage pathogenicity factor. **PLoS Pathog**, 2012a

MAYER FL, WILSON D, JACOBSEN ID, MIRAMÓN P, SLESIONA S, BOHOVYCH IM, et al. Small but crucial: the novel small heat shock protein Hsp21 mediates stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. **PLoS One**, 2012b.

MAYER, F. L., WILSON, D., AND HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, 2013.

MENEGAZZI, R., DECLEVA, E. & DRI, P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? **Blood**, 2012.119, 1214–1216.

MENEZES-GARCIA, Z. Papel da microbiota no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico fluorouracil. **Tese (Doutorado em microbiologia)** - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2015.

MIRAMÓN, P., & LORENZ, M. C. A feast for *Candida*: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. **PLoS pathogens**, 2017 13(2), e1006144.

MORAN GP, COLEMAN DC, SULLIVAN DJ. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic? **Int J Microbiol**, 2012.

MOYES DL, RUNGLALL M, MURCIANO C, SHEN C, NAYAR D, THAVARAJ S, KOHLI A, ISLAM A, MORA-MONTES H, CHALLACOMBE SJ et al.: A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. **Cell Host Microbe**, 2010, 8:225-235.

MOYES DL, WILSON D, RICHARDSON JP, MOGAVERO S, TANG SX, WERNECKE J, HOF S, GRATACAP RL, ROBBINS J, RUNGLALL M *et al.*: Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, 2016; 532:64-68.

MOYES, D. L. *et al.* *Candida albicans* yeast and hyphae are discriminated by MAPK signaling in vaginal epithelial cells. **PLoS ONE**, 2011. 6, e26580 .

NAGLIK JR, CHALLACOMBE SJ, HUBE B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 2003;67(3):400–428.

NAGLIK JR, FIDEL PL JR., ODDS FC. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Microbiol Lett**, 2008. 283: 129–139.

NAGLIK JR, MOYES DL, WÄCHTLER B, HUBE B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes Infect**, 2011.

NAGLIK, JULIAN & KÖNIG, ANNIKA & HUBE, BERNHARD & GAFFEN, SARAH. *Candida albicans*-epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. **Current opinion in microbiology**, 2017. 40. 104-112

NETEA MG, JOOSTEN LA, VAN DER MEER JW, KULLBERG BJ, VAN DE VEERDONK FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nat Rev Immunol**. 2015;

NETEA, M. G. *et al.* Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. **Blood**, 2009. 113, 2324–2335.

NETEA, M. G. *et al.* Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. **Eur. J. Immunol.**,2003. 33, 3409–3417.

NETEA, M. G. *et al.* Human dendritic cells are less potent at killing *Candida albicans* than both monocytes and macrophages. **Microb. Infect.**,2004. 6, 985–989.

- NETEA, M. G., BROWN, G. D., KULLBERG, B. J. & GOW, N. A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nat. Rev. Microbiol.**, 2008. 6, 67–78.
- NETEA, M. G., VAN DE VEERDONK, F. L., VAN DER MEER, J. W., DINARELLO, C. A. & JOOSTEN, L. A. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. **Annu. Rev. Immunol.**, 2014. 33, 49–77.
- NICHOLLS S, MACCALLUM DM, KAFFARNIK FA, SELWAY L, PECK SC, BROWN AJ. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Fungal Genet Biol**, 2011.
- NOBLE SM, GIANETTI BA, WITCHLEY JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nat Rev Microbiol**. 2016;15(2):96-108.
- O'DEA E. M., AMARSAIKHAN N., LI H., DOWNEY J., STEELE E., VAN DYKEN S. J., et al. Eosinophils are recruited in response to chitin exposure and enhance th2-mediated immune pathology in *Aspergillus fumigatus* infection. **Infect. Immun.**, 2014.82, 3199–3205.
- OLIVEIRA, M. C., TAVARES, L. P., VAGO, J. P., BATISTA, N. V., QUEIROZ-JUNIOR, C. M., VIEIRA, A. T., FERREIRA, A. V. M.. Tumor Necrosis Factor, but Not Neutrophils, Alters the Metabolic Profile in Acute Experimental Arthritis. **PLOS ONE**, 2016. 11(1), e0146403.
- OSTANIN, D. V., J. BAO, *et al.* T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.296, n.2, Feb, p.G135-46. 2009.
- PADOVAN A. C., CHAVES G. M., COLOMBO A. L., BRIONES M. R. A novel allele of HWP1, isolated from a clinical strain of *Candida albicans* with defective hyphal growth and biofilm formation, has deletions of Gln/Pro and Ser/Thr repeats involved in cellular adhesion. **Med. Mycol.**, 2009. 47, 824–835.
- PALIGE K, LINDE J, MARTIN R, BÖTTCHER B, CITIULO F, *et al.* Global Transcriptome Sequencing Identifies Chlamydospore Specific Markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **PLOS ONE**, 2013; 8(4): e61940.
- PANKHURST CL. Candidiasis (oropharyngeal). **BMJ Clin Evid**. 2009.

PAPPAS, Peter G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 4, p.1-20, 11 maio 2018.

PARAMYTHIOTOU, E., FRANTZESKAKI, F., FLEVARI, A., ARMAGANIDIS, A., AND DIMOPOULOS, G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules** , 2014.

PFALLER, M. A., ANDES, D. R., DIEKEMA, D. J., HORN, D. L., REBOLI, A. C., ROTSTEIN, C., et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004–2008. **PLoS One**, 2014.

PIETRELLA, D. *et al.* Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. **Eur. J. Immunol.**,2013. 43, 679–692.

RAVIN K. A., LOY M. The eosinophil in infection. **Clin. Rev. Allergy Immunol.** 2015. 50, 214–227.

RAZZAGHI-ABYANEH, M., SADEGHI, G., ZEINALI, E., ALIREZAEI, M., GHAFAROKHI, M. S., AMANI, A., *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. **J. Mycol. Med**, 2014.

REPENTIGNY, LOUIS *et al.* Immunopathogenesis of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, 2004, 17:729-759.

RIBEIRO, R.A., WANDERLEY, C.W.S., WONG, D.V.T. *et al.* **Cancer Chemother Pharmacol**, 2016; 78: 881.

RICHARDSON, Jonathan P; MOYES, David L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. **Virulence**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.327-337, 21 jan. 2015.

RICHTER K, HASLBECK M, BUCHNER J. The heat shock response: life on the verge of death. **Mol Cell**, 2010.

ROBBINS N, UPPULURI P, NETT J, RAJENDRAN R, RAMAGE G, LOPEZ-RIBOT JL, *et al.* Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. **PLoS Pathog**, 2011.

- ROMANI L, BISTONI F, PUC CETTI P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Curr Opin Microbiol.** 2003; 6:338–43.
- ROUTH MM, CHAUHAN NM, KARUPPYIL SM. Cancer drugs inhibit morphogenesis in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. **Braz J Microbiol.** 2013;44(3):855–9.
- SAAG KG, KOEHNKE R, CALDWELL JR, BRASINGTON R, BURMEISTER LF, ZIMMERMAN B, KOHER JA, AND FURST DE .Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events. **Am J Med,** 1994. 96:115–123
- SAIJO, S. *et al.* Dectin-2 recognition of α -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. **Immunity,**2010. 32, 681–691.
- SAMARANAYAKE YH & SAMARANAYAKE LP .Experimental oral candidiasis in animal models.**Clin Microbiol Rev,** 2001. 14: 398–429.
- SASSE C, HASENBERG M, WEYLER M, GUNZER M, MORSCHHÄUSER J. White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. **Eukaryot Cell.** 2013;12(1):50-8.
- SCULLY C, SONIS S, DIZ PD. Oral mucositis. **Oral Dis,** 2006; 12:229-41.
- SHAMRI R., XENAKIS J. J., SPENCER L. A. (2011). Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 343, 57–83
- SHARMA, J.; ROSIANA, S.; RAZZAQ, I.; SHAPIRO, R.S. Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens. **J. Fungi** 2019, 5, 17.
- SHERRINGTON SL, SORSBY E, MAHTEY N, KUMWENDA P, LENARDON MD, *et al.* Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. **PLOS Pathogens** 13(5), 2017.
- SIDRIM JJC., ROCHA MFG. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan S. A.**, 2004.
- SMEEKENS, S. P., VAN DE VEERDONK, F. L., KULLBERG, B. J. & NETEA, M. G. Genetic susceptibility to *Candida* infections. **EMBO Mol. Med.**, 2013. 5, 805–813

SMELTZ RB, CHEN J, EHRHARDT R, SHEVACH EM. Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression. **J Immunol**, 2002.

SONIS ST . The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**, 2004; 4: 277–284.

SONIS ST, ELTING LS, KEEFE D, PETERSON DE, SCHUBERT M, *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, 2004;100:1995–2025

SONIS ST, OSTER G, FUCHS H, BELLM L, BRADFORD WZ, *et al.* Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. **J Clin Oncol**, 2001. 19: 2201–2205

SORENSEN, O. E. *et al.* Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. **Blood**, 2001 97, 3951–3959.

SUDBERY PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nat Rev Microbiol**, 2011.

SUN JN, LI W, JANG WS, NAYYAR N, SUTTON MD, EDGERTON M. Uptake of the antifungal cationic peptide Histatin 5 by *Candida albicans* Ssa2p requires binding to non-conventional sites within the ATPase domain. **Mol Microbiol**, 2008.

SUN JN, SOLIS NV, PHAN QT, BAJWA JS, KASHLEVA H, THOMPSON A, *et al.* Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. **PLoS Pathog**, 2010.

SUN Y, CAO C, JIA W, TAO L, GUAN G, HUANG G. pH Regulates White-Opaque Switching and Sexual Mating in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**. 2015.

SWIDERGALL, Marc; FILLER, Scott G.. Oropharyngeal Candidiasis: Fungal Invasion and Epithelial Cell Responses. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-7, 12 jan. 2017.

TAGHAVI, Mehdi *et al.* Role of pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) in immune responses to fungal infections. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 808, p.8-13, ago. 2017.

TAKAKURA, N., SATO, Y., ISHIBASHI, H., OSHIMA, H., UCHIDA, K., YAMAGUCHI, H., & ABE, S. A Novel Murine Model of Oral Candidiasis with Local Symptoms Characteristic of Oral Thrush. **Microbiology and Immunology**, 2003. 47(5), 321–326.

TANABE S, GOTO T, INAGAKI J, KIMURA K. Septicemia in patients with solid cancers in a Japanese cancer hospital—the significance of candidemia for patients. *Jpn J Clin Oncol*. 1991;21:52–8.

TASAKI, SONOKO *et al.* “Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis”. **FEMS yeast research** vol. 18,3 (2018): foy018.

TERÇAS, A. L. G., MARQUES, S. G., MOFFA, E. B., ALVES, M. B., DE AZEVEDO, C. M. P. S., SIQUEIRA, W. L., *et al.* . Antifungal drug susceptibility of *Candida* species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. **Front. Microbiol**, 2017.

TRAVERS, J., & ROTHENBERG, M. E.). Eosinophils in mucosal immune responses. **Mucosal Immunology**, 2015 .8(3), 464–475.

USSELMANN, B., M. NEWBOLD, *et al.* Deficiency of colonic telomerase in ulcerative colitis. **Am J Gastroenterol**, v.96, n.4, Apr, p.1106-12. 2001.

VALLABHANENI, S., MODY, R. K., WALKER, T., AND CHILLER, T. The global burden of fungal diseases. **Infect. Dis. Clin. North Am**, 2016.

VAN BRUGGEN, R. *et al.* Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for β -glucan-bearing particles. **Mol. Immunol.** 47, 575–581, 2009.

VAN DE VEERDONK, F. L. *et al.* Bypassing pathogen-induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1 β production by the fungal pathogen *Candida albicans*. **J. Infect. Dis.** 2009. 199, 1087–1096.

VAN DE VEERDONK, F. L. *et al.* Differential effects of IL-17 pathway in disseminated candidiasis and zymosan-induced multiple organ failure. **Shock.**, 2010. 34, 407–411. .

VAN VLIET MJ, HARMSSEN HJM, DE BONT ESJM, TISSING WJE. The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. **PLoS Pathog**, 2010. 6(5): e1000879.

- VIEIRA *et al.* Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **Am J Pathol.** 2009;175(6):2382-2391.
- VLIET, MICHEL J. VAN *et al.* The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. **PLOS Pathogens**, v.6, n.5, 2010.
- VOIGT, J. *et al.* Human natural killer cells acting as phagocytes against *Candida albicans* and mounting an inflammatory response that modulates neutrophil antifungal activity. **J. Infect. Dis.** 2014. 209, 616–626.
- VYLKOVA S, LORENZ MC. Modulation of Phagosomal pH by *Candida albicans* Promotes Hyphal Morphogenesis and Requires Stp2p, a Regulator of Amino Acid Transport. **PLoS Pathog.** 2014;10.
- WACHTLER B, CITIULO F, JABLONOWSKI N, FÖRSTER S, DALLE F, SCHALLER M, *et al.* *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. **PLoS One**, 2012.
- WILSON D, NAGLIK JR, HUBE B: The missing link between *Candida albicans* hyphal morphogenesis and host cell damage. **PLoS Pathog** 2016, 12:e1005867.
- ZHANG, X. *et al.* Dual functions of the human antimicrobial peptide LL-37-target membrane perturbation and host cell cargo delivery. **Biochim. Biophys. Acta**, 2010. 1798, 2201–2208.
- ZIELINSKI, C. E. *et al.* Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL- β . **Nature**, 2012. 484, 514–5.

2. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Candida albicans*: de comensal à patógeno

A população humana tem passado pelos processos de transição demográfica e epidemiológica caracterizadas pela modernização e elevação da expectativa de vida. Nas duas últimas décadas as doenças de etiologia fúngica têm se tornado um grave problema de saúde pública e isso reflete o expressivo aumento no número de pessoas com algum comprometimento do sistema imune (Vallabhaneni *et al.*, 2016). Essa alta incidência de micoses tem sido relacionada a fatores como o número crescente de transplantes de órgãos e a consequente utilização de terapias imunossupressoras, com o aumento de pessoas com câncer e diabetes (Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2014), pelo envelhecimento da população que vem acompanhado de comorbidades, ao aumento na quantidade de pacientes que recebem alimentação através de cateteres ou sondas e uso de antibióticos de amplo espectro, bem como pela alta taxa de indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Terças *et al.* 2017).

Poucos estudos multicêntricos foram publicados no Brasil, abordando a incidência de candidemia, de populações suscetíveis, de taxas brutas de mortalidade, etiologia e taxas de resistência antifúngica *in vitro* (Doi *et al.*, 2016). O estudo mais recente foi realizado pela Vigilância e Controle Brasileiro de Agentes Patogênicos de Importância Epidemiológica (BrSCOPE) e envolveu 16 hospitais públicos e privados participantes das cinco regiões do Brasil. Relataram que *Candida* spp foi a 7^a causa mais prevalente (5,6%) de infecção da corrente sanguínea nosocomial entre todos os patógenos estudados no SCOPE Brasil e foi responsável por 72,2% da taxa de mortalidade desse estudo. A ordem de classificação dos principais isolados *Candida* spp foi *C. albicans* (34,3%), *Candida parapsilosis* (24,1%), *Candida tropicalis* (15,3%), *Candida glabrata* (10,2%), *Candida krusei* (1,5%), *Candida pelliculosa* (1,5%), *Candida lusitaniae* (0,7%), *Candida famata* (0,7%) e *Candida guilliermondii* (0,7%) (Doi *et al.*, 2016). Além disso, dados relatados por uma pesquisa nacional de prevalência pontual realizada em 183 centros nos EUA revelaram que *Candida* spp se tornou o microrganismo mais comum de infecções da corrente sanguínea (Magill *et al.*, 2014; Doi *et al.*, 2016).

A espécie *Candida albicans* foi descrita pela primeira vez há aproximadamente 150 anos e, atualmente, é reconhecida como o mais importante fungo comensal e patogênico de seres humanos (Noble *et al.* 2016). Como comensal, *C.albicans* coloniza o trato gastrointestinal, a pele e o trato genitourinário feminino de pelo menos 70 % de adultos saudáveis. Todavia, a colonização pode se tornar patogênica se os hospedeiros desenvolverem deficiências imunes, danos epiteliais ou disbiose (Noble *et al.* 2016).

A *C. albicans* possui pelo menos quatro tipos celulares diferentes, e dentre esses, as hifas e as leveduras são os mais bem descritos, enquanto pseudo-hifas e clamidósporos são menos caracterizados (Sudbery, 2011; Noble *et al.*, 2016). As leveduras são unicelulares e de maneira geral apresentam morfologia variando de arredondada a oval, se reproduzem por brotamento e a divisão celular é um processo finamente regulado que envolve a divisão nuclear, rearranjo do citoesqueleto e polarização dos componentes citoplasmáticos em direção ao broto em formação. Ao final do processo o broto (célula-filha) se desprende da célula-mãe e no local é formada uma cicatriz constituída de quitina, chamada cicatriz do broto (Noble *et al.* 2016). Em contrapartida, as hifas são estruturas tubulares, pluricelulares, ramificadas ou não, podendo conter um ou mais núcleos por compartimento. Elas podem ser septadas, com septos separando os compartimentos, ou asseptadas (cenocíticas). O alongamento das hifas é apical, com remodelamento da parede celular e extensão em direção à fonte de nutrientes. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio (Carlisle *et al.* 2009; Noble *et al.* 2016).

Quando a divisão celular por brotamento não resulta na separação da célula mãe da filha, forma-se uma estrutura chamada de pseudo-hifa, de forma elipsóide. Além dessa estrutura, são formados ainda os clamidósporos. Esses são estruturas arredondadas, intercalares ou terminais, situados nas hifas. São estruturas formadas durante a propagação vegetativa das hifas e acredita-se que sejam importantes para sobrevivência em condições hostis. Podem ser observadas *in vitro* em certas condições adversas, como escassez de nutrientes e hipóxia (Noble *et al.*, 2016). Embora facilmente indutíveis *in vitro*, os clamidósporos foram raramente observados *in vivo* (Palige *et al.*, 2013; Böttcher *et al.*, 2016), por isso um possível envolvimento de clamidósporos no processo de infecção não é claro (Böttcher *et al.*, 2016).

Essas variações morfológicas de *C. albicans* podem ser consideradas um fator de virulência, pois, geralmente, as hifas e pseudo-hifas são encontradas nos tecidos do hospedeiro quando patogênicas. Elas são intrinsecamente invasivas em meios sólidos, enquanto as leveduras são vistas principalmente como comensais e envolvidas com a disseminação para outros sítios anatômicos (Noble *et al.*, 2016). Por isso, estudos sobre os fatores relacionados às variações morfológicas de *C. albicans* tem sido intensamente investigados, principalmente nas interações fungo-hospedeiro.



Figura 1: Morfologia das formas de pseudo-hifas, levedura e hifas. As barras de escala nos painéis principais representam 5 μm e na inserção no painel de hifa representa 1 mm. Fonte: adaptado de Sudbery, 2011.

Recentemente muitos estudos tem relatado um segundo sistema de transição fenotípica de *C. albicans*, caracterizado pela mudança de levedura branca (padrão) à levedura opaca. Essas transições são epigenéticas e auxiliam os microrganismos a se adaptarem a estímulos externos (Ene *et al.*, 2016). As amostras que são homozigóticas no locus para o tipo de acasalamento ($MTL a / a$ ou $MTL \alpha / \alpha$) podem mudar da forma de levedura branca para uma forma de célula alongada denominada “opaca” (Sasse *et al.*, 2013; Deng & Lin, 2018). Destaca-se, no entanto, que mesmo sem alterações na sequência de DNA (epigenéticas), ocorre transmissão hereditária (Deng & Lin, 2018). As células opacas são a forma competente para acasalamento de *C. albicans* (Deng & Lin, 2018). A alternância entre as fases branca e opaca ocorre espontaneamente em uma frequência relativamente baixa, mas também pode ser induzida por condições ambientais (Craik *et al.*, 201). As leveduras brancas e opacas possuem diferenças que vão além da competência de acasalamento, pois se diferem na expressão de

muitos genes, incluindo adesinas e genes metabólicos, sugerindo que os dois tipos de células são adaptados a diferentes ambientes dentro do hospedeiro (Sasse *et al.*, 2013; Deng & Lin, 2018). As células opacas são melhores colonizadoras da pele, mas são muito menos virulentas do que as células brancas, fato observado em modelo murino de candidíase disseminada (Sasse *et al.*, 2013). Além disso, as células opacas não filamentam na maioria das condições que as leveduras brancas, o que pode resultar em uma capacidade reduzida de invadir os tecidos (Sasse *et al.*, 2013; Deng & Lin, 2018). No entanto, muitos estudos ainda precisam ser realizados para informações mais concretas.

A espécie *Candida albicans* é aprimoradamente adaptada ao hospedeiro e pode formar hifas em várias condições ambientais que refletem a diversidade dos microambientes encontrados no hospedeiro. Podemos citar, por exemplo, que as hifas se formam em resposta à presença de soro, em pH neutro, em CO₂ a 5% (pressão parcial de CO₂ na corrente sanguínea), e na presença de N-acetil-d-glucosamina (GlcNAc) (Sudbery, 2011). Em pH baixo (<6), as células de *C. albicans* crescem predominantemente na forma de levedura, enquanto em pH alto (> 7) o crescimento de hifas é induzido (Mayer *et al.* 2013; Sherrington *et al.*, 2017). A morfogênese também mostrou ser regulada por quorum sensing, um mecanismo de comunicação microbiana (Albuquerque & Casadevall, 2012). As principais moléculas de quorum sensing de *C. albicans* incluem farnesol, tirosol e dodecanol (Hall *et al.*, 2011; Mayer *et al.* 2013).

As provas fisiológicas mais comuns e mais simples para identificação de *Candida albicans* e *Candida* spp são avaliação da formação de tubo germinativo e filamentação em cultivo em lâmina. A formação do tubo germinativo é a base para o teste de diagnóstico clássico para a presença de *C. albicans* em microbiologia médica (Sudbery, 2011). A junção de soro e temperatura de 37° C gera um ambiente extremamente propício para a formação de tubo germinativo a partir de levedura. No cultivo em lâmina, avalia-se a capacidade de produção de hifas hialinas ramificadas. Caso a levedura forme hifas hialinas ramificadas sem fragmentação, provavelmente pertence ao gênero *Candida* e se houver formação de clamidósporos característicos, é *Candida albicans* (Sudbery, 2011).

1.1.1 Fatores de virulência

A virulência de *C. albicans* está atrelada a uma gama de fatores que incluem a transição morfológica já descrita, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, o tigmotropismo, a formação de biofilme, a variação fenotípica e a secreção de enzimas hidrolíticas (Mayer *et al.*, 2013; Hoyer & Cota, 2016). Além disso, apresenta uma rápida adaptação a flutuações no pH ambiental, flexibilidade metabólica, potentes sistemas de aquisição de nutrientes e maquinarias robustas de resposta ao estresse oxidativo e nitrosativo (Nicholls *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013).

A *C. albicans* possui um conjunto específico de adesinas que permitem a aderência a outras células de *C. albicans*, a outros microrganismos, a superfícies abióticas e a interação com células hospedeiras (Mayer *et al.* 2013; Hoyer & Cota, 2016). Dentre as adesinas de *C. albicans*, as mais bem caracterizadas são as proteínas com sequência semelhante à aglutinina (Als), uma família de proteínas composta por oito membros, Als1-7 e Als9 (Mayer *et al.* 2013; Hoyer & Cota, 2016). Dessas oito proteínas, a Als3 é especialmente importante para a adesão (Mayer *et al.*, 2013; Hoyer & Cota, 2016). Outra importante adesina de *C. albicans* é a Hwp1, que serve como um substrato para transglutaminases de mamíferos e esta reação pode unir covalentemente as hifas às células hospedeiras (Mayer *et al.*, 2013). Alguns trabalhos mostraram que mutantes para Hwp1 apresentaram redução na aderência às células epiteliais bucais, além de virulência atenuada em modelo murino de candidíase sistêmica (Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Diversas proteínas, independentes da morfologia, também podem contribuir para a adesão, como as proteínas ligadas ao glicosilfosfatidilinositol (Eap1, Iff4 e Ecm33), as proteínas associadas de forma não covalente à parede (Mp65, uma suposta β -glucanase e a Phr1, uma β -1,3 glucanosiltransferase), as proteases associadas à superfície celular (Sap9 e Sap10) e a proteína de superfície semelhante à integrina Int1 (Naglik *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016).

Após a adesão às superfícies das células hospedeiras, as hifas de *C. albicans* podem secretar hidrolases que facilitam a penetração ativa nessas células (Wachtler *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Além disso, estudos salientam que as hidrolases aumentam a eficiência na aquisição extracelular de nutrientes (Naglik *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Existem três classes diferentes de hidrolases secretadas por *C. albicans*: são as proteases, fosfolipases e lipases. A família das aspartil proteases secretadas

(Saps) possui dez membros, Sap1-10, sendo que as Sap1-8 são secretadas e liberadas para espaço extracelular, enquanto Sap9 e Sap10 permanecem ligadas à superfície celular (Naglik *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2013). A contribuição de Saps para a patogenicidade de *C. albicans* é controversa, visto que alguns estudos indicam que Saps não são necessárias para invasão do epitélio humano e que as Sap1-6 são dispensáveis para virulência, fato observado em modelo murino de candidíase disseminada (Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). No entanto, a expressão de genes codificadores de Sap em *C. albicans* em amostras mais patogênicas comparadas com amostras menos patogênicas sugere um papel importante para essas proteases na virulência (Moran *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). A família de fosfolipases consiste em quatro classes diferentes (A, B, C e D) (Mayer *et al.*, 2013), contudo apenas os cinco membros da classe B (PLB1-5) são extracelulares e podem contribuir para a patogenicidade através da ruptura das membranas do hospedeiro (Mavor *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 2013). A hidrólise dos fosfolípidos do hospedeiro pelas fosfolipases produz ácidos graxos e um número de moléculas lipofílicas, como o diacilglicerol (DAG), ácidos graxos livres (FFAs), ácido fosfatídico (PA), e liso-fosfolípidos (LPLs) que estão envolvidos em vias de sinalização (Barman *et al.* 2018). A terceira família de hidrolases, as lipases, consiste em 10 membros (LIP1-10) (Mayer *et al.*, 2013;) e têm a função de catalisar a conversão de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol, sendo responsáveis pela desestabilização da membrana do hospedeiro, pela lise de lipídeos e pelo fornecimento de moléculas envolvidas nas sinalizações, assim como as fosfolipases (Mayer *et al.* 2013; Höfs *et al.*, 2016).

Para invadir as células do hospedeiro *C. albicans* pode utilizar dois mecanismos diferentes: endocitose induzida e penetração ativa (Naglik *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Para induzir a endocitose, o fungo expressa proteínas especializadas na superfície celular, as invasinas, que medeiam a ligação a ligantes do hospedeiro, como a E-caderina nas células epiteliais e a N-caderina nas células endoteliais (Dadar *et al.*, 2018) e essa interação leva ao englobamento da célula fúngica pelas célula hospedeira. Mesmo hifas mortas são endocitadas, indicando que tal processo é passivo, pois não requer a ação de células fúngicas viáveis (Höfs *et al.*, 2016; Dadar *et al.*, 2018). Vale ressaltar duas invasinas que as são mais bem descritas na literatura: a Als3 (já mencionada por também ter papel de adesina) e a Ssa1 (Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). A Ssa1 é uma molécula expressa na superfície celular e membro da família da proteína de choque térmico 70 (Hsp70) (Mayer *et*

al., 2013; Höfs *et al.*, 2016). Estudos anteriores demonstraram que o fungo com deleção em Als3 e Ssa1 exibiram reduzida aderência e invasão epitelial, com a consequente redução da virulência em modelo murino de candidíase orofaríngea (Naglik *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Já a penetração ativa é um processo fúngico e necessita de hifas de *C. albicans* viáveis (Wächtler *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013).

Descobriu-se que as hifas de *C. albicans* induzem dano epitelial e ativam a resposta imune inata, principalmente, por meio da secreção de uma toxina citolítica denominada candidalisina, um peptídeo anfipático com estrutura helicoidal codificada pelo gene ECE1 (Moyes *et al.*, 2016). Primeira toxina peptídica a ser identificada em um patógeno fúngico humano e em células epiteliais orais, a candidalisina induz o influxo de íons de cálcio e a liberação de lactato desidrogenase (LDH), que são características de dano celular e desestabilização de membrana (Moyes *et al.*, 2016). Os experimentos realizados com mutantes de *C. albicans*, em que o gene ECE1 inteiro ou a região codificadora de candidalisina foi deletado, mostraram que o fungo tem potencial invasivo eficiente *in vitro*, mas são incapazes de induzir dano tecidual ou liberação de citocinas em modelo murino de candidíase orofaríngea (OPC) (Moyes *et al.*, 2016).

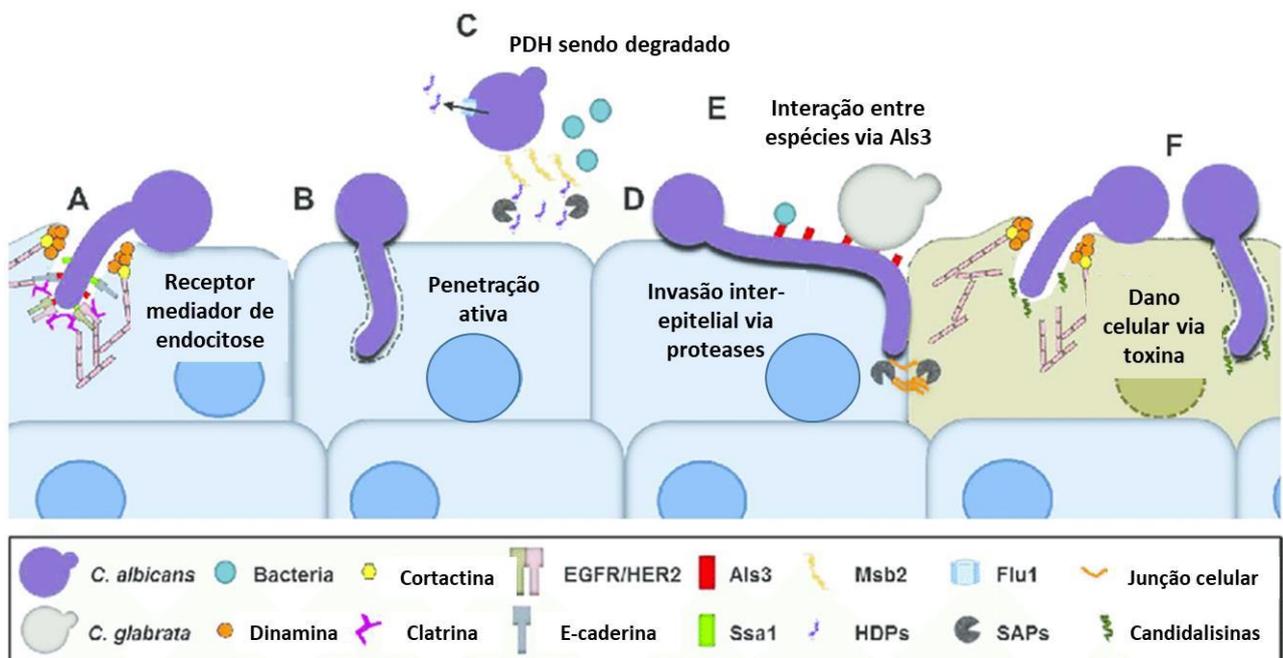


Figura 2: Diagrama das interações de *Candida albicans* com células epiteliais orais, peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) e microbiota oral. (A) invasão de células epiteliais por *C. albicans* por endocitose mediada por receptor. As invasinas Als3 e Ssa1 de *C. albicans* interagem com a E-caderina

e um heterodímero composto pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e HER2, que ativam a via da endocitose da clatrina, resultando na endocitose do fungo. (B) Invasão de *C. albicans* por penetração ativa, em que a hifa progressivamente se alonga e entra na célula epitelial. (C) Os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) liberados pela célula epitelial infectada podem levar à morte de *C. albicans*. No entanto, *C. albicans* pode resistir aos PDHs regulando positivamente a bomba de efluxo Flu1, que reduz os PDHs intracelulares, secretando as SAPs, capazes de degradar as HDPs pela liberação da mucina Msb2, que se liga e inativa os PDHs. (D) *C. albicans* pode invadir células epiteliais orais por degradação proteolítica de proteínas juncionais intercelulares. (E) As hifas de *C. albicans* se ligam à *Candida glabrata* e bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp, o que pode aumentar a capacidade de alguns desses organismos em invadir células epiteliais, enquanto alguns desses organismos podem aumentar a virulência de *C. albicans*. (F) *C. albicans* secreta candidalisina, uma toxina que causa dano epitelial. Fonte: adaptado de Swidergal & Filler, 2017.

A capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas e bióticas também é outro fator de virulência importante para *C. albicans*. Os biofilmes são estruturas constituídas por espessa matriz extracelular amorfa que envolve desde células leveduriformes a hifas e pseudo-hifas de *C. albicans* (Höfs *et al.*, 2016). Quando maduro, células leveduriformes destacam-se do biofilme, sendo essas as responsáveis pela dispersão para outros sítios (Finkel & Mitchell, 2011; Höfs *et al.*, 2016). Os biofilmes possuem resistência aumentada aos antifúngicos devido à complexa arquitetura que o engloba, presença de β -glucanas na matriz extracelular, ao aumento da expressão de bombas de efluxo de drogas e a plasticidade metabólica (Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Em estudos anteriores, identificaram que a principal proteína de choque térmico, Hsp90, é um importante regulador da dispersão de *C. albicans*. (Robbins *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013) e da resistência aos antifúngicos em biofilmes (Robbins *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016).

Várias condições ambientais desencadeiam a morfogênese e a formação de biofilme em *C. albicans*. A detecção por contato está envolvida nesse processo, pois quando as hifas se aproximam de superfícies, como as mucosas, elas realizam o tigmotropismo, que consiste na capacidade de reconhecer junções intercelulares através de sensoriamento promovendo a extensão da porção apical das hifas e penetração no substrato (Mayer *et al.*, 2013). Brand e colaboradores demonstraram que o tigmotropismo das hifas de *C. albicans* é regulado pela captação extracelular de cálcio e esse sensoriamento direcionado é necessário para o dano total das células epiteliais (Brand *et al.*, 2008; Höfs *et al.*, 2016).

C. albicans é extremamente adaptável a diversos nichos ambientais e um dos motivos que permite tal proeza é a capacidade de “sentir” o pH e regulá-lo conforme sua necessidade. No hospedeiro humano, *C. albicans* é exposta a um pH circundante variando de ligeiramente alcalino a ácido (Davis *et al.*, 2009; Höfs *et al.*, 2016). Dependendo do nicho do hospedeiro, as alterações no pH ambiental podem ser dinâmicas, como ocorre no trato gastrointestinal. Para *C. albicans*, pH neutro a alcalino pode causar estresse grave, podendo levar ao mau funcionamento de proteínas e comprometimento na aquisição de nutrientes (devido a interrupção do gradiente de prótons) (Sherrington *et al.*, 2017). Sendo assim, a forma de adaptação da *C. albicans* a mudanças de pH envolve além de indução da filamentação, a expressão de proteínas reguladoras, principalmente a PHR1 e PHR2, que são β -glicosidases de parede celular 1 e 2, respectivamente (Mayer *et al.* 2013). Enquanto a PHR1 é expressa em meio neutro-alcalino, a PHR2 é principalmente expressa em meio ácido (Mayer *et al.*, 2013).

A existência de vias reguladoras de estresse também contribui para a sobrevivência e virulência de *C. albicans*. As respostas celulares aos estresses incluem respostas de choque térmico, osmótico, oxidativo e nitrosativo (Brown *et al.*, 2012). A resposta ao estresse osmótico resulta em acúmulo intracelular de glicerol, soluto que impede a perda de água (Mayer *et al.*, 2013). Espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio, ânions superóxido e radicais hidroxilas, produzidas por células do sistema imune inato, como macrófagos e neutrófilos, induzem um dano oxidativo (Brown *et al.*, 2012) e como resposta *C. albicans* produz enzimas antioxidantes como a catalase Cta1 e as superóxidos dismutase, Sod1 e Sod5, que são cruciais para a eficiente desintoxicação de EROs (Martchenko *et al.*, 2004; Mayer *et al.*, 2013; Höfs *et al.*, 2016). Além desses radicais, macrófagos e neutrófilos produzem espécies reativas de nitrogênio que induzem uma resposta ao estresse nitrosativo em células de *C. albicans* fagocitadas e a principal proteína implicada na proteção e desintoxicação da célula fúngica são as Yhb1 (proteína relacionada com a flavohemoglobina) (Mayer *et al.*, 2013).

A resposta ao choque térmico é uma reação conservada de organismos vivos a condições estressantes, como alta temperatura, privação nutricional e estresse oxidativo (Mayer *et al.*, 2013). Tais tensões podem levar tanto a perda da estrutura das proteínas como a agregação de proteínas não específicas, resultando na morte celular. Sendo assim, como forma de proteção *C. albicans* produz proteínas especializadas ao choque térmico (Hsps) que atuam como chaperonas e previnem o desdobramento e a agregação de proteínas (Richter *et al.*,

2010). Seis Hsps principais foram identificadas em *C. albicans*: Hsp104, Hsp90, Hsp78, duas proteínas Hsp70 (Ssa1 e Ssa2) e Hsp60 (Mayer *et al.*, 2013). A Hsp90 é uma das principais Hsp em *C. albicans* e regula a resistência a drogas, a morfogênese, a formação de biofilme e a virulência (Robbins *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013). Os dois membros da família Hsp70 de *C. albicans*, Ssa1 e Ssa2 são expressos na superfície celular e funcionam como receptores para peptídeos antimicrobianos como, por exemplo, Ssa2 que se liga à histatina 5 (Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao metabolismo, os elementos traços são essenciais para o crescimento e sobrevivência de todos os organismos vivos. Entre os mais importantes para o bom funcionamento de várias proteínas e enzimas estão o ferro, o zinco, o manganês e o cobre (Mayer *et al.*, 2013). Tanto os hospedeiros como os microrganismos patogênicos desenvolveram mecanismos para adquirir ou restringir o acesso a esses elementos (Hood & Skaar, 2012). O mais investigado em processos de patogênese é o ferro e *C. albicans* é capaz de adquiri-lo por diferentes maneiras, incluindo um sistema redutor, um sistema de captação de sideróforos e um sistema de captação de ferro- heme (Almeida *et al.* 2009; Höfs *et al.*, 2016). O sistema redutor modula a aquisição de ferro da ferritina e transferrina hospedeiras ou do ambiente (Mayer *et al.*, 2013). *C. albicans* não sintetiza seus próprios sideróforos, porém o fungo utiliza um sistema de captação para roubar ferro de sideróforos produzidos por outros microrganismos, também conhecidos como xeno-sideróforos. O único transportador de sideróforo descrito em *C. albicans* é Sit1 (Mayer *et al.*, 2013) . E por último, o sistema de captação de ferro-heme que promove aquisição de ferro da hemoglobina e hemeoproteínas e são mediados pelos membros da família dos receptores heme RBT5, RBT51, CSA1, CSA2 e PGA7 (RBT6) (Almeida *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2013). Foi demonstrado que a adesina e invasina Als3 podem atuar como receptor para a ferritina (Almeida *et al.*, 2008). O zinco é o segundo elemento mais abundante na maioria dos organismos vivos (Hood & Skaar, 2012). Mayer e colaboradores elucidaram um mecanismo de aquisição de zinco por *C. albicans*, em que o fungo secreta a proteína de ligação ao zinco Pra1 (antígeno 1 regulado por pH), que semelhante à aquisição de ferro mediada por sideróforo, age como um zincóforo ligando o zinco extracelular e reassociando-o a célula fúngica. Outros elementos como cobre e o manganês também são essenciais para o crescimento de fungos, no entanto os mecanismos utilizados por *C. albicans* para obtê-los são atualmente pouco compreendidos (Mayer *et al.*, 2013; Hoyer & Cota, 2016).

Como um comensal, *C. albicans* está bem adaptado aos ambientes em rápida transição e, por muitas vezes, com escassez de nutrientes (Miramón *et al.* 2017). De fato, *C. albicans* faz uso de ambas as fontes de carbono, açúcar e não açúcar, durante a infecção (Brown *et al.* 2014; Miramón *et al.* 2017). Como por exemplo, o lactato é abundante em muitos nichos do hospedeiro e *C. albicans* utiliza esse nutriente como um sinal para promover mudanças profundas na arquitetura de sua parede celular (Ene *et al.* 2012; Netea *et al.*, 2015). Essas alterações camuflam os β -glucanos e permite a evasão do sistema imune (Ene *et al.*, 2012; Netea *et al.*, 2015). Além disso, as células cultivadas em meio com disponibilidade de lactato são menos fagocitadas por macrófagos e mais hábeis em escapar do englobamento (Ene *et al.*, 2013; Netea *et al.*, 2015). Já no interior de macrófagos, *C. albicans* é capaz de interferir na acidificação normal do fagolissoma, inibindo a maturação do fagossoma e auto induzindo a morfogênese da hifa, o que contribui para a fuga (e morte) do macrófago tanto pela ruptura física quanto pela indução de piroptose (Vylkova *et al.* 2014).

1.1.2 Colonização X Invasão

A capacidade do sistema imune em realizar a discriminação entre colonização e invasão é crucial para manutenção da homeostase. Os fungos dimórficos como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffei* e *Blastomyces dermatitidis*, geralmente apresentam formas filamentosas quando saprofíticos, mas se transformam em levedura dentro do hospedeiro (May & Casadevall, 2018). Portanto, a morfologia em que o fungo se encontra, pode determinar sua capacidade de colonização ou invasão.

Em relação a *C. albicans* não há conhecimento sobre sua forma saprofítica e esse microrganismo pode crescer tanto como levedura quanto como hifa no hospedeiro (Romani *et al.* 2003). Embora não sendo um dimórfico clássico, as alterações morfológicas de *C. albicans* estão diretamente ligadas à sua virulência (Gow *et al.* 2012; May & Casadevall, 2018) como já descrito.

Existem diferenças estruturais no envoltório externo entre leveduras e hifas. Os β -glucanos das leveduras de *C. albicans* são protegidos contra o reconhecimento do sistema imune pelas manoproteínas, mas se tornam expostos na levedura em desenvolvimento e nas hifas, o que conduz a diferenças nos perfis de ativação do sistema imune por essas células (Davis *et al.* 2014). Em um modelo de tecido epitelial oral humano, as hifas invasoras desencadearam múltiplas vias de sinalização pró-inflamatórias do hospedeiro, enquanto as

leveduras apenas colonizam a superfície do tecido sem causar danos (Moyes *et al.* 2010; Pappas *et al.*, 2018).

Em indivíduos saudáveis, as superfícies mucosas são frequentemente colonizadas por *C. albicans*, no entanto essa colonização não induz dano epitelial, já que o número de células de levedura é pequeno e, além disso, há uma microbiota natural que atua como um antagonista/competidor ao crescimento exacerbado de qualquer espécie. Como consequência disso, há comprometimento da resposta de citocinas induzida a partir das células epiteliais, de macrófagos da mucosa e/ou DCs. Nas leveduras de *C. albicans*, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) responsáveis pela ativação do inflamassoma são ocultados, e a resposta do tipo IL-1 β ou Th17 é prejudicada (Gow *et al.*, 2012; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018).

Como demonstrado na figura 3, as leveduras podem desencadear uma via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), envolvendo MAPKs p38, e levar à ativação dos fatores de transcrição JUN e FOS, mas isso não é suficiente para desencadear uma resposta de citocinas em células epiteliais. A invasão de superfícies mucosas se inicia com a transição da forma leveduriforme para a filamentosa. Nesse caso, as hifas induzem não apenas a via MAPK, normalmente ativada pelas leveduras, mas também uma segunda via de MAPK que leva à ativação da MAPK fosfatase 1 (MKP1), desencadeando a produção de IL-1 α e IL-6. Além disso, as hifas são capazes de ativar o inflamassoma e induzir a produção de IL-1 β por células imunes, como os macrófagos. Tal citocina pode estimular as células Th17 a produzir outros mediadores como a IL-17, que ativa os neutrófilos, e a IL-22 que induz a liberação de defensas pelas células epiteliais (Figura 3) (Gow *et al.*, 2012; Netea *et al.*, 2015). Portanto, o estado colonizador ou invasor de *C. albicans* depende de dois fatores principais: um é o sistema imune do hospedeiro e outro está relacionado aos fatores de virulência desse patógeno (Kabir *et al.* 2012; Campos *et al.*, 2018).

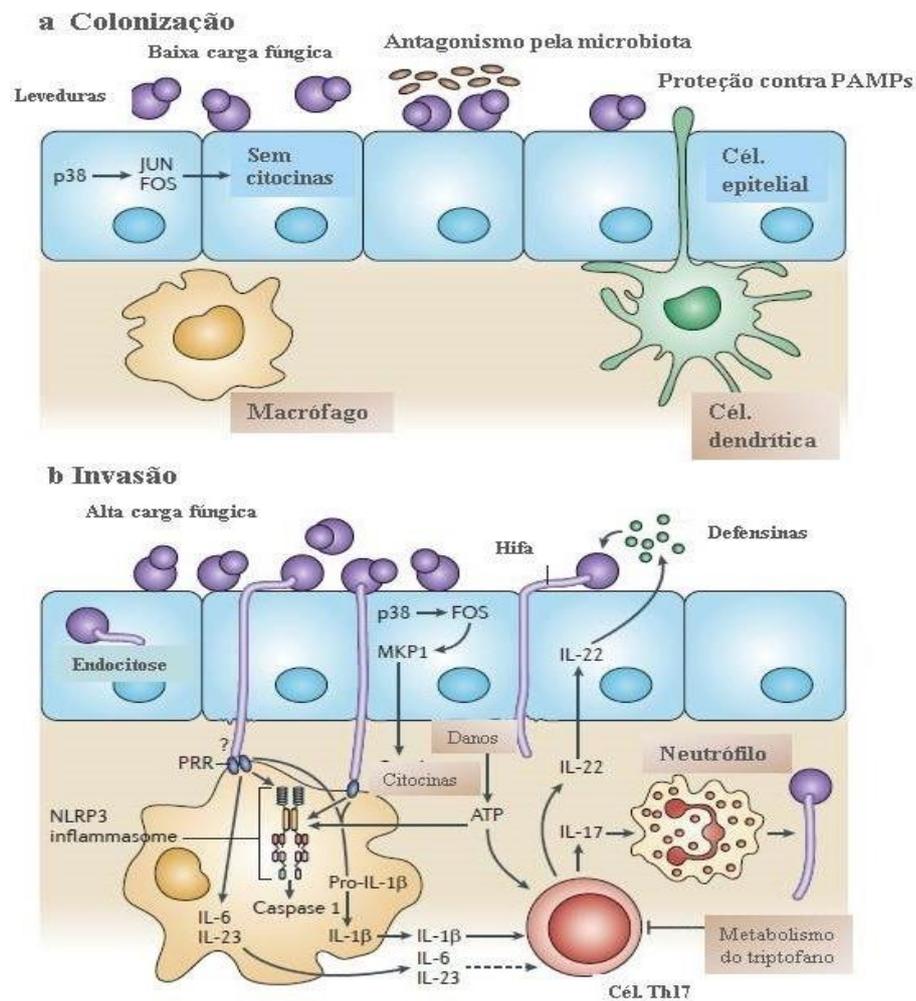


FIGURA 3: Colonização versus invasão. a) Colonização da pele e superfícies mucosas por *C. albicans*. b) Invasão de superfícies mucosas por *C. albicans*. Fonte: adaptado de Gow *et al.*, 2011

1.2 CANDIDÍASE

As espécies de *Candida*, patógenos oportunistas, são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Pfaller *et al.*, 2014; de Oliveira Santos *et al.*, 2018) e podem causar vaginite, candidíase oral, candidíase cutânea e infecções sistêmicas (Wächtler *et al.*, 2012; de Oliveira Santos *et al.*, 2018). A *Candida albicans* é a espécie patogênica mais isolada, no entanto outras espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* estão sendo cada vez mais isoladas, principalmente em indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Mayer *et al.*; de Oliveira Santos *et al.*, 2018).

As células dos fungos, assim como as células humanas, são eucarióticas, e isso gera uma grande dificuldade na elaboração de antifúngicos com toxicidade seletiva, resultando em efeitos colaterais consideráveis aos pacientes, além de menor número de alvos disponíveis para ação de drogas (de Oliveira Santos *et al.*, 2018). Na década de 90 houve um aumento na descoberta de agentes antifúngicos, sendo as equinocandinas a classe de antifúngicos mais recentemente descobertos, no início dos anos 2000 (Paramythiotou *et al.*, 2014). Apesar dos avanços terapêuticos as candidíases continuam sendo infecções altamente prevalentes na população.

1.2.1 Candidíase oral (CO)

A candidíase oral é uma infecção mucosa oportunista causada, na maioria dos casos, pelo fungo *Candida albicans*, e pode prejudicar a fala, a ingestão nutricional e a qualidade de vida (Pankhurst, 2009; HELLSTEIN & MAREK, 2019). A candidíase oral ocorre em 35% dos pacientes com síndrome de Sjogren, em idosos, bebês, usuários de próteses e indivíduos com o vírus do HIV (Conti *et al.*, 2009; HELLSTEIN & MAREK, 2019). Os achados clínicos na candidíase oral são bastante variáveis, podendo ser observados desde quadros localizados, como as estomatites, até formas graves e generalizadas, como a candidíase hiperplásica crônica. Sendo assim, pode-se subdividir clinicamente a candidíase oral em cinco apresentações distintas, pseudomembranosa, atrófica aguda, hiperplásica crônica, queilites angulares e língua negra pilosa (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

A forma pseudomembranosa é a manifestação clínica mais comum da candidíase oral e as lesões são popularmente conhecidas como “sapinho”. Essas lesões ocorrem, principalmente, em recém-nascidos, pois ainda não possuem uma microbiota totalmente formada e, além disso, apresentam um pH ácido, fatores esses que facilitam a colonização da cavidade oral por microorganismos patogênicos (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019). Clinicamente, inicia-se por pequenos pontos esbranquiçados na mucosa e esses vão se tornando confluentes, para formar pseudomembranas de coloração esbranquiçada, aderidas à mucosa e suportadas por um fundo eritematoso, que pode ser vista quando removidas (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019). Esta forma pode ser facilmente diagnosticada pela visualização, em microscópio, de leveduras e de pseudo-hifas no material coletado por swab e também pode ser confirmada

pelo isolamento das espécies em cultura. Nas formas eritematosas, a escassa presença de leveduras na superfície da mucosa, muitas vezes, exige a realização de biópsia para estabelecimento do diagnóstico (Repentigny *et al.*, 2004; Lewis; Williams, 2017).

A candidíase atrófica aguda é uma condição secundária a um quadro pseudomembranoso e pode ser identificada pela presença de eritema visível no dorso da língua. Esse tipo de lesão, bastante dolorosa, pode ser observado também como uma lesão primária em outras regiões da boca e está geralmente associada à antibioticoterapia prévia (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

A candidíase hiperplásica crônica é também conhecida como candidíase leucoplásica e é caracterizada por placas brancas, fortemente aderidas à cavidade oral, em que pode se observar um contorno eritematoso ao redor das placas. Essas lesões diferenciam-se da candidíase pseudomembranosa em razão da forte aderência das placas às mucosas (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

A queilite angular, popularmente conhecida como “boqueira”, apresenta lesões com início por maceração no ângulo de junção do lábio superior com o inferior e apresentam ainda uma fissura exatamente na junção dos lábios e são recobertas por uma camada cremosa que tende à dessecação, formando crostas. As lesões podem sangrar facilmente, principalmente se a crosta que as recobre é deslocada. O paciente queixa-se de sensações de picadas no local, dor e queimadura (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

A lesão da língua negra pilosa pode iniciar-se por sintomas generalistas, como boca seca, prurido e sensação de queimaduras, com o aparecimento de hipertrofia nas papilas. As lesões ficam com uma coloração escurecida por impregnação de substâncias escuras encontradas nos alimentos e bebidas. O papel das leveduras como único agente etiológico é muito discutido, entretanto o fato de isolar leveduras em algumas infecções e o desaparecimento destas após tratamento específico demonstra seu papel importante como agente causador dessa patologia. Em alguns casos, a presença da levedura é somente uma colonização de lesões prévias, como nos carcinomas verrucosos da mucosa oral, e isso pode ser confundido com a língua negra pilosa (Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019). De fato a candidíase oral/orofaríngea é uma patologia associada ao rompimento da homeostase imune, sendo, portanto a infecção fúngica oportunista que mais

acomete pacientes com a resposta imunológica comprometida. (Conti *et al.*, 2009; Sidrim & Rocha, 2004; Lewis & Williams, 2017; Hellstein & Marek, 2019).

1.3 INTERAÇÃO *Candida albicans*/hospedeiro

O padrão de resposta imune desencadeado pela interação microrganismo-hospedeiro determina o prognóstico. A resposta imune às espécies de *Candida* é moldada pelo caráter comensal que esse fungo possui (Netea *et al.*, 2015). O primeiro estágio de uma resposta imune é o reconhecimento desses fungos por receptores reconhecedores de padrão (PRRs), incluindo os receptores do tipo Toll (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs), receptores do tipo NOD (NLRs) e receptores do tipo RIG-I (RLRs) (Netea *et al.*, 2015). A parede celular de *C. albicans* possui duas camadas que podem ser diferenciadas em camada externa, composta principalmente por glicoproteínas ligadas a O e N que consistem em 80-90% de manose, e em camada interna, que contém os polissacarídeos quitina, β -1,3-glucana e β -1,6-glucana, que conferem resistência e forma às células (Netea *et al.*, 2015). Essas estruturas fúngicas são os PAMPs mais imunoestimuladores sendo, portanto, os responsáveis pela ativação inicial da resposta (Netea *et al.*, 2015). Entretanto, *C. albicans* e outros fungos são capazes de evitar o reconhecimento pela redução da disponibilidade de β -glucanas na superfície celular (Hopke A. *et al.*, 2016).

O receptor de β -glucana mais descrito é o dectina-1 (também conhecido como CLEC7A), um CLR expresso principalmente em monócitos e macrófagos que induz a produção de citocinas, bem como a internalização do fungo (Goodridge *et al.*, 2011; Pappas *et al.*, 2018). Além de induzir a ativação celular direta, o envolvimento da dectina-1 potencializa as respostas à ligação em TLR2 e TLR4 e estes TLRs reconhecem estruturas contendo manana da parede celular de *C. albicans* (Ferwerda *et al.*, 2008; Pappas *et al.*, 2018). A sinalização via dectina-1 também foi descrita por evitar a liberação desordenada de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) durante a infecção fúngica, o que evita a ocorrência de dano tecidual extenso pela resposta imune (Branzk *et al.* 2014). Todavia, nem todas as *C. albicans* são reconhecidas pela dectina-1, provavelmente devido a diferenças tênues na estrutura dos componentes β -glucanas da parede celular, o que pode justificar a diferença na suscetibilidade dos hospedeiros deficientes em dectina-1 aos diferentes tipos de *C. albicans* (Marakalala *et al.*, 2013). Trabalhos mostraram que polimorfismos no receptor

dectina-1 estão mais associados à colonização do trato geniturinário, à candidíase vulvovaginal recorrente por espécies de *Candida* (Smeekens *et al.* 2013; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018).

As β -glucanas também são reconhecidas por receptores do complemento 3 (CR3), principalmente em neutrófilos. O CR3, e não a dectina-1, é o principal receptor de neutrófilos humanos para partículas que possuem β -glucana (van Bruggen *et al.* 2009; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018). As mananas e manoproteínas também são componentes importantes e imunogênicos da parede celular de *C. albicans* e são reconhecidos por vários CLRs, incluindo o receptor de manose e dectina-2 (também conhecida como CLEC6A) (Netea *et al.* 2015). O receptor de manose é expresso em macrófagos e reconhece N-mananas de *C. albicans* (Netea *et al.* 2008; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018) e essa via de sinalização desempenha um papel crucial na expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-17 (van de Veerdonk *et al.* 2009; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018). Já a dectina-2, expressa principalmente em DCs, macrófagos e neutrófilos, reconhece α -mananas de *C. albicans* (Saijo *et al.* 2010; Netea *et al.*, 2015; Campos *et al.*, 2018).. A dectina-2 tem seu papel bem descrito na modulação de respostas celulares Th17 (Ifrim *et al.* 2014; Netea *et al.*, 2015).

Os TLRs são capazes de reconhecer os patógenos fúngicos de duas maneiras: por meio dos TLRs ligados à membrana, como TLR2, TLR4 e TLR6, que reconhecem principalmente os constituintes manoproteicos da parede celular fúngica (Netea *et al.* 2008; Pappas *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018) e pelos receptores intracelulares que reconhecem os ácidos nucléicos citoplasmáticos (TLR3 e TLR9) (Netea *et al.* 2015). O TLR9 é capaz de reconhecer a quitina e tal interação culmina na produção de citocinas anti-inflamatórias necessárias para manter uma resposta imunológica equânime (Wagener *et al.* 2014; Taghavi *et al.*, 2017). Interessantemente, a ativação epitelial por candidalisina, não é mediada por CLRs ou TLRs (Moyes *et al.*, 2015). Tal fato propõe que as células epiteliais utilizem mecanismos sensoriais diferentes das células mieloides, visto que as células mieloides respondem aos componentes da parede celular de *C. albicans*, como β -glucana e manana, enquanto as células epiteliais respondem por meio da via de sinalização p38 / c-Fos / MKP1 detectando a atividade de candidalisina (Naglik *et al.*, 2014; Wilson *et al.*, 2016).

Ainda inserido no contexto de reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, vale ressaltar os receptores do tipo NOD (NLRs). São receptores citoplasmáticos que executam várias funções biológicas essenciais, incluindo o processamento, apresentação de antígeno e ativação dos inflamassomas (Netea *et al.* 2015). Na infecção por *Candida* spp esses receptores tem como principal função o reconhecimento e a modulação de respostas mediadas por quitina, especialmente a produção de IL-10 pela ativação de NOD2 (Wagener *et al.* 2014). Outro efeito biológico importante dos NLRs é a sua participação como componente do inflamassoma. A ativação do inflamassoma NLRP3 por hifas de *Candida*, mas não por leveduras, foi mencionado em vários estudos (Joly *et al.* 2009; Netea *et al.*, 2015) e isso tem sido proposto como um dos mecanismos que torna o hospedeiro capaz de diferenciar a colonização da invasão de *Candida* (Gow *et al.* 2012). Existem estudos que relatam que Sap2 e Sap6, principalmente, secretadas por *C. albicans* são capazes de ativar inflamassoma NLRP3, o que resulta em uma produção potente de IL-1 β e IL-18 (Pietrella *et al.* 2013; Netea *et al.*, 2015).

Após todo esse processo inicial de reconhecimento dos PAMPs fúngicos pelas várias famílias de PRRs, inicia-se uma cadeia de mecanismos efetores que, em último caso, leva à depuração dos fungos (Netea *et al.* 2015). Tanto células imunes quanto não imunes contribuem para a resposta inata antifúngica, como por exemplo, os macrófagos, neutrófilos, células natural killer (NK) e as células epiteliais. Além disso, um epitélio e endotélio íntegros são importantes barreiras mecânicas contra a invasão tecidual por fungos (Netea *et al.* 2015).

As células epiteliais auxiliam no controle do estado comensal de *Candida* pela produção de β -defensinas, que têm uma poderosa atividade antifúngica, em resposta a IL-22 liberada pelas células Th17 ou células linfoides inatas (ILCs) (Tomalka *et al.*, 2015). O epitélio responde à colonização de espécies de *Candida* por meio de um mecanismo dependente de TLR4 e essa interação leva a ativação de NF- κ B e AP-1 (Netea *et al.*, 2015). No entanto, quando há formação de hifas, há ativação de proteína quinase 1 (PKA 1) por mitógenos (MAPK1) e a sinalização de FOS nas células epiteliais (Moyes *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2018).

Os macrófagos possuem grande relevância na defesa antifúngica. Os macrófagos residentes teciduais são células efetoras, produtoras de citocinas e quimiocinas inflamatórias que atuam no recrutamento e ativação de outras células imunes no local da infecção (Netea, *et*

al., 2015). A considerável influência de macrófagos na defesa anti-*Candida* foi evidenciada por estudos *in vivo* que utilizaram camundongos com depleção de macrófagos e demonstraram que esses animais apresentaram elevada carga fúngica nos tecidos, se tornaram mais susceptíveis à candidíase invasiva, com uma maior taxa de mortalidade (Netea *et al.*, 2015). Estudos avaliaram camundongos deficientes para o receptor de quimiocina CX3CL1 (CX3CR1) e mostraram que o acúmulo diminuído de macrófagos derivados de monócitos no rim leva à insuficiência renal e à morte (Lionakis *et al.*, 2013) em modelo murino de candidíase sistêmica. Outros trabalhos mostraram que a deficiência do receptor CCR2, essencial para o recrutamento de monócitos para tecidos infectados, promove um aumento da suscetibilidade à candidíase sistêmica (Ngo *et al.*, 2014).

Os neutrófilos também desempenham um papel importante na resposta do hospedeiro contra infecções por *Candida* (Netea *et al.*, 2015; Pappas *et al.*, 2018). Células epiteliais ativadas e macrófagos residentes teciduais liberam quimiocinas que recrutam neutrófilos para o local da infecção fúngica (Netea *et al.*, 2008; Pappas *et al.*, 2018). A ativação de neutrófilos é importante para o controle da infecção por *Candida*, sendo a neutropenia um importante fator de risco para infecções fúngicas invasivas (Pappas *et al.*, 2018). Além disso, os neutrófilos são hábeis em inibir com sucesso o processo de morfogênese de *C. albicans* (Brown, 2011; Pappas *et al.*, 2018). Utilizam mecanismos efetores oxidativos e não oxidativos para combater *Candida* (Netea *et al.*, 2015; Pappas *et al.*, 2018) como a liberação de EROs, a produção de fatores antimicrobianos, como lisozima, lactoferrina, elastase, β -defensinas, gelatinases e catepsina G (Amulic *et al.*, 2012; Pappas *et al.*, 2018). A elastase neutrofílica e a catepsina B foram caracterizadas como tendo atividade antifúngica e a elastase contribuiu para a liberação de NETs (Netea *et al.*, 2015). As fibras de NETs se ligam e neutralizam os patógenos, fornecendo um mecanismo para combater as hifas que são grandes demais para serem fagocitadas (Menegazzi *et al.*, 2012; Netea *et al.*, 2015). Além disso, a formação de NETs induz a liberação de substâncias antimicrobianas como, por exemplo, a mieloperoxidase (MPO), lactoferrina, azurocidina e catelicidina, dos grânulos dos neutrófilos (Netea *et al.*, 2015). Há também uma proteinase, a proteinase-3 derivada de neutrófilos, que é capaz de quebrar a catelicidina no peptídeo antimicrobiano LL-37, também conhecido como CAMP, (Sorensen, *et al.*, 2011; Netea *et al.*, 2015) e este pode promover a ruptura da membrana celular fúngica (Zhang *et al.*, 2010; Kahlenberg *et al.*, 2013; Netea *et al.*, 2015), inibir a formação de biofilme e adesão fúngica, aumentar a quimiotaxia, produzir

EROs e inibir a apoptose de neutrófilos (Netea *et al.*, 2015; Pappas *et al.*, 2018) As vias receptoras que levam à morte de *Candida* por neutrófilos foram recentemente descobertas (Netea *et al.* 2015). Os mecanismos dependentes de EROs necessários para a depuração de *Candida* opsonizada dependem dos Fc γ Rs e da proteína quinase C, enquanto a via independente de EROs, importante para a morte de *Candida* não opsonizada, depende da ligação de CR3 e do recrutamento de CARD9 (Gazendam *et al.* 2014) e para ambos mecanismos a dectina 1 é dispensável (Netea *et al.* 2015).

Assim como monócitos, macrófagos e neutrófilos, as células NK contribuem para a rápida resposta imune inata contra patógenos (Netea *et al.*, 2015). Sabe-se que as células NK não inibem a transformação de levedura em hifa em *Candida*, entretanto foi descrito atividade antifúngica dependente de perforina das NK (Voigt *et al.* 2014). A ativação de uma resposta imune inata robusta pelas células epiteliais e fagocitárias, provavelmente com a ajuda de células NK, é na maioria dos casos suficiente para evitar o deslocamento de espécies de *Candida* da colonização de superfícies para invasão de tecidos (Netea *et al.* 2015).

Estudos demonstraram que as DCs são essenciais para a resposta do hospedeiro contra espécies de *Candida* por meio da produção de IFN- β (del Fresno *et al.*, 2013; Pappas *et al.*, 2018). As DCs podem fagocitar e eliminar espécies de *Candida*, porém são menos efetivas que os macrófagos na morte de fungos (Pappas *et al.*, 2018). Uma vez em contato com os fungos, as DCs os fagocitam, e estes são degradados no compartimento fagocítico, dando origem a peptídeos antigênicos, que são montados associados ao MHC de classe II, e posteriormente são direcionados para a superfície das DCs ativadas para apresentação a células T CD4⁺ (Moyes *et al.*, 2015). Estudos mostram que tanto as células T CD4⁺ como as células T CD8⁺ desempenham um papel importante na imunidade anti-fúngica e a ativação dessas células é controlada pelas populações de células dendríticas (Moyes *et al.*, 2015). Embora os linfócitos T CD8⁺ tenham demonstrado inibir o crescimento de hifas de *C. albicans in vitro*, o principal mecanismo que dá início a resposta imune adaptativa efetiva é a apresentação de antígeno pelas DCs a células T CD4⁺ naive (Moyes *et al.*, 2015). O reconhecimento do antígeno é realizado por um receptor de célula T (TCR) na presença de co-estimulação de CD28 e CD80/86 e isso é seguido por polarização dirigida por citocina para um dos 4 subconjuntos Th conhecidos (Moyes *et al.*, 2015).

As respostas com perfil Th1 foram historicamente consideradas como a resposta celular predominante contra *C. albicans*, entretanto esse protagonismo do fenótipo de proteção de Th1 em superfícies mucosas tem sido substituída pela resposta Th17 (Moyes *et al.*, 2015). Ao contrário dos fenótipos Th17 / Th1 que são protetores, a indução de um fenótipo Th2 está ligada ao aumento do crescimento e disseminação do fungo (Moyes *et al.*, 2015). As DCs que fagocitam leveduras de *C. albicans* são induzidas a produzir IL-12, que impulsiona a polarização para o subconjunto Th1 (Smeltz *et al.*, 2002; Moyes *et al.*, 2015). Após a estimulação com IL-12, as células Th1 iniciam a sinalização autócrina, via secreção de IFN- γ , que tem o papel de regular positivamente a expressão do receptor IL-12R β 2. Isso torna as células cada vez mais sensíveis à estimulação de IL-12 e mantém a diferenciação do fenótipo Th1 (Smeltz *et al.*, 2002; Moyes *et al.*, 2015). Em contraste, a polarização para o fenótipo Th2 é conduzida por IL-4 e é sustentada por mais secreção de IL-4 (Moyes *et al.*, 2015).

A diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo Th17 é induzido, inicialmente, pela citocina IL-1 β (Chung *et al.*, 2009; Zielinski *et al.*, 2012; Tasaki, *et al.* 2018) enquanto a maturação e a diferenciação terminal dependem da sinalização da IL-23. A IL-6 também tem tido papel na diferenciação para Th17, citocina que pode ser produzida por células epiteliais em resposta a infecção por *C. albicans* (Moyes *et al.*, 2015; Tasaki, *et al.* 2018)). A diferenciação de TCD4⁺ em células Th17, bem como a síntese de IL-17A, IL-17F e IL-22 são importantes para a defesa do hospedeiro contra espécies de *Candida* (Tasaki, *et al.* 2018). Tanto a IL-17 como a IL-22 induzem o recrutamento e ativação de neutrófilos, são incumbidas da ativação de células epiteliais e liberação de defensas antifúngicas. As células Th17 expressam os receptores de quimiocinas CCR4 e CCR6 na sua superfície (Moyes *et al.*, 2015; Tasaki, *et al.* 2018).

A literatura científica têm demonstrado que camundongos com deficiência de sinalização por IL-17 são mais suscetíveis a candidíase sistêmica (Netea *et al.*, 2015; Tasaki, *et al.* 2018) e a infecções da mucosa (Conti *et al.* 2016; Tasaki, *et al.* 2018). Esses dados propõe que, em humanos, as respostas de células Th17 são especialmente importantes para respostas antifúngicas da mucosa (Netea *et al.*, 2015; Conti *et al.*, 2016; Tasaki, *et al.* 2018). Alguns trabalhos mais recentes caracterizaram uma classe adicional de células Th17 (nTh17) naturais que são fenotipicamente distintas das células Th17 convencionais (Conti *et al.*, 2016; Tasaki, *et al.* 2018) As células nTh17 funcionam como vigilantes inatas na mucosa oral e,

juntamente com células T $\gamma\delta$, secretam IL-17 em resposta a *C. albicans* (Conti *et al.*, 2016; Tasaki, *et al.* 2018)

Em relação à defesa humoral às espécies de *Candida*, ainda há muito a ser elucidado. Já foi proposto que mecanismos imunes humorais estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra infecções por *Candida*, embora sua contribuição seja mais modesta do que os mecanismos celulares (Netea *et al.*, 2015) ressaltados acima. Por mais que o complemento ativado não possa eliminar as hifas de *Candida*, ele pode induzir uma resposta de citocinas (Cheng *et al.*, 2012). As pesquisas utilizando camundongos com deficiência dos fatores C3 ou C5 do complemento demonstraram que os animais apresentam aumento da mortalidade como consequência da resistência diminuída à *Candida* ou uma imunopatologia robusta (Netea, *et al.*, 2015). As moléculas de manoproteínas com polissacarídeos de manose complexos ligados em O e N são exibidas na superfície celular de *C. albicans* e são alvos para a proteção imune mediada por anticorpos devido a sua acessibilidade (Moyes *et al.* 2015). Ao administrarem uma imunoglobulina humana recombinante anti-manana de *C. albicans* em camundongos observaram uma sobrevivência prolongada em animais inoculados com dose letal do fungo (Richardson & Moyes, 2015). As adesinas Als de *C. albicans* por se localizarem na superfície celular são alvos de anticorpos monoclonais, visto que podem se ligar a Als3 e interferir na adesão a superfícies epiteliais, impedir a filamentação e aquisição de ferro, além de possuir atividade fungicida (Brena *et al.* 2011; Richardson & Moyes, 2015). Ao estudar camundongos com deficiência de células B, pesquisadores descobriram que não havia aumento da suscetibilidade à infecção por *C. albicans* nesses animais (Richardson & Moyes, 2015), o que salienta a modesta resposta mediada por anticorpos e justifica a predominância de respostas celulares adaptativas (Th1/ Th 17)(Richardson & Moyes, 2015).

Os eosinófilos, células multifuncionais que contribuem para a imunidade inata e adaptativa, estão envolvidos na iniciação, propagação e resolução de respostas imunes, incluindo reparo tecidual. Eles alcançam essa multifuncionalidade pela expressão de um conjunto diversificado de receptores de ativação, incluindo aqueles que reconhecem diretamente patógenos e alvos opsonizados, e por sua capacidade de armazenar e liberar mediadores citotóxicos pré-formados que participam da defesa do hospedeiro (Travers & Rothenberg, 2015). No contexto da infecção, os eosinófilos estão associados a infecções por helmintos onde eles possuem efeitos tóxicos ao patógeno através da degranulação e liberação de diferentes proteínas catiônicas, como a principal proteína básica (MBP), eosinófilo

peroxidase (EPO), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) (Hogan *et al.*, 2008 ; Ravin & Loy, 2015). Embora a associação entre inflamação eosinofílica e sensibilização ou colonização fúngica tenha sido reconhecida há muito tempo, os mecanismos imunológicos subjacentes às interações efetoras moleculares diretas entre fungos e eosinófilos permanecem pouco compreendidos (Figueiredo & Neves, 2018). Utilizando métodos de microscopia eletrônica de transmissão, foi sugerido que os eosinófilos humanos são capazes de fagocitar esporos de *C. albicans*. (Figueiredo & Neves, 2018). No entanto, muitos estudos ainda são necessários, pois pouco se sabe sobre os papéis funcionais dos eosinófilos na candidíase. Um estudo recente utilizando camundongos deficientes em eosinófilos (Δ BLGATA1), mostrou pela primeira vez que os eosinófilos contribuem para o dano e disfunção do tecido pulmonar dependente de IL-17 durante a infecção por *Aspergillus fumigatus* (Malacco *et al.*, 2019).

A defesa do hospedeiro contra infecções por *Candida*, portanto, é complexa e abrange uma cascata de mecanismos. O reconhecimento inicial dos fungos pelas células epiteliais, macrófagos teciduais, neutrófilos, entre outras células imunes resulta em inflamação e montagem da resposta imune. A resposta inata é crucial para a defesa do hospedeiro contra a candidíase mucosa e sistêmica, enquanto as defesas adaptativas do hospedeiro estão principalmente envolvidas nas respostas da mucosa (Netea *et al.*, 2015). De fato, um dos maiores problemas associados ao comprometimento da resposta imune são os quadros de imunossupressão que resultam na maior susceptibilidade dos hospedeiros à patógenos oportunistas.

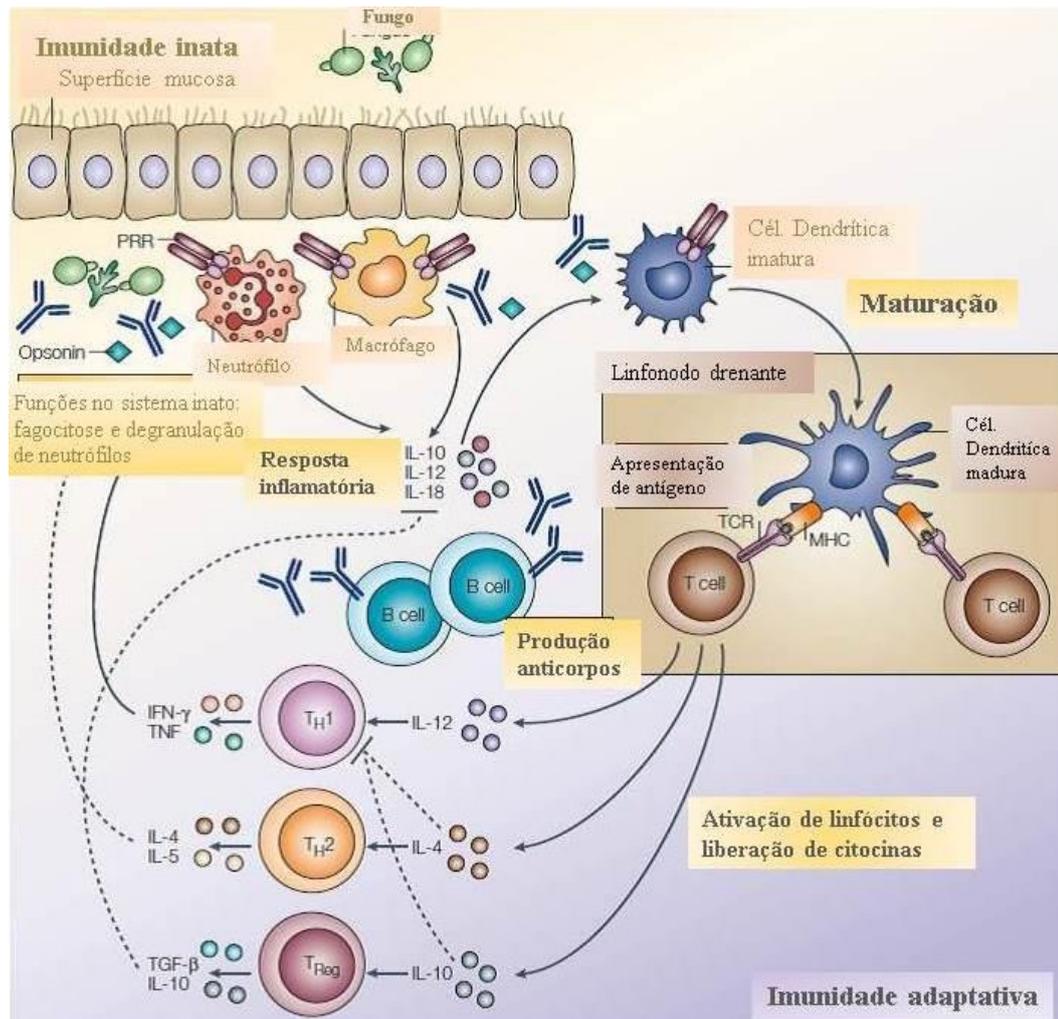


Figura 4: Cooperação dos sistemas imune inato e adaptativo em infecções fúngicas. . A maioria dos fungos é reconhecida por mecanismos de defesa inatos mediados por fagócitos e opsoninas através do envolvimento de PRRs distintos. Esses mecanismos agem imediatamente e são seguidas algumas horas depois por uma resposta inflamatória induzida precoce, que deve ser ativada pela infecção, mas não gera imunidade protetora duradoura. Essas fases iniciais ajudam a manter a infecção sob controle. Nos vertebrados, no entanto, se o organismo infeccioso consegue romper essas linhas iniciais de defesa, uma resposta imune adaptativa ocorrerá, com a geração de células efetoras T auxiliares (Th) antígeno-específicas, células T reguladoras (TReg) e células B que direcionam especificamente o patógeno e induzem as células de memória que impedem a infecção subsequente com o mesmo microrganismo. As DCs conduzem os fungos do local da colonização / infecção para os nódulos linfáticos de drenagem e ativam células Th e TReg de um modo dependente do morfotipo e do tecido. Fonte: adaptado de Romani, 2004. *Nature Reviews Immunology*.

1.4 IMUNOSSUPRESSÃO

Os fármacos utilizados nesse trabalho foram escolhidos baseando-se na clínica, visto que são os mais administrados. E um dos grandes problemas desencadeadores de imunossupressão está o uso desses fármacos, dentre eles destacamos, primeiramente, os glicocorticoides. Os glicocorticoides possuem fortes propriedades imunossupressoras e são amplamente utilizados em medicina humana e veterinária devido a seus efeitos amplos, embora inespecíficos, anti-inflamatórios e antialérgicos (Diehl *et al.*, 2016). As aplicações comuns incluem o tratamento da artrite reumatóide e da asma e a administração concomitante em transplante de órgãos sólidos (Lee *et al.*, 2013; Diehl, *et al.*, 2016). Apesar dos efeitos terapêuticos significativos da DEX, seu uso sustentado deve ser limitado por apresentar efeitos adversos ao longo do tempo, tais como, imunossupressão exacerbada, miopatia, retardo de crescimento, distúrbios metabólicos e osteoporose (Saag *et al.*, 1994).

Como glicocorticoide sintético, DEX atua primariamente por meio da ligação ao receptor de glicocorticoide citosólico e causa inibição de fatores transcricionais como NF-κB e AP-1, suprimindo assim a ativação de genes que codificam vários mediadores pró-inflamatórios que agravam a inflamação e causam dano tecidual (Coutinho e Chapman, 2011). As ações rápidas de DEX são parcialmente atribuídas a efeitos não-genômicos, regulando diretamente as vias de transdução de sinal através de receptores de glicocorticóides associados à membrana e segundos mensageiros (Cato *et al.*, 2002). Eles inibem linfócitos T e APCs e induzem uma regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias (Lee *et al.*, 2013; Diehl, *et al.*, 2016).

Além dos glicocorticoides, o uso de fármacos com atividade antitumoral também está associado à imunossupressão, entre eles o 5-Fluorouracil (5-FU). O 5-FU é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de uma variedade de neoplasias, incluindo câncer colorretal, de mama, de cabeça e pescoço. É um fármaco antimetabólito, da classe das fluoropirimidinas, que atua inibindo processos biossintéticos essenciais, ou sendo incorporados em macromoléculas, tais como DNA e RNA (Longley, *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2016). Segundo Longley *et al.*, 2003, o 5-FU é uma droga de fase específica, que atua na fase G1 e na fase S do ciclo celular, inibindo a síntese do RNA ou do DNA, respectivamente. Foi introduzido na década de 1950 e produzido baseado em experimentos que mostravam que células neoplásicas utilizavam uracila para síntese de ácido nucléico de forma mais rápida que

as células normais (Diasio & Harris, 1989). Ao sintetizar um análogo de base pirimídica com propriedades físico-químicas semelhantes à uracila, esperava-se a obtenção de um potente antimetabólito que interferisse na síntese de ácido nucléico e, conseqüentemente, no crescimento tumoral (Diasio & Harris, 1989).

A atividade do 5-FU ocorre somente após sua metabolização intracelular para nucleotídeos citotóxicos, como o 5-fluoro-uridina-5'-trifosfato (FUTP), o 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-difosfato (FdUDP) e o 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) (Diasio & Harris, 1989; Longley *et al.*, 2003). Estes três nucleotídeos atuam em três mecanismos diferentes de citotoxicidade: o FUTP substitui a UTP, incorpora-se e causa dano ao RNA; o FdUDP, após a ação de DNA polimerase, substitui a timidina-5'-trifosfato (dTTP) e incorpora-se ao DNA e o FdUMP inibe a atividade da timidilato sintase (TS) (Longley *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2016). Embora o 5-FU seja muito eficaz no tratamento de neoplasias ele pode causar vários efeitos colaterais como mielossupressão, dermatite, toxicidade cardíaca, diarreia e mucosite (Chang *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2016). Entre esses efeitos adversos, a mucosite gastrointestinal é uma complicação muito importante que ocorre em aproximadamente 80% dos pacientes e causa inchaço abdominal, vômitos e diarreia (Sonis *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2016).

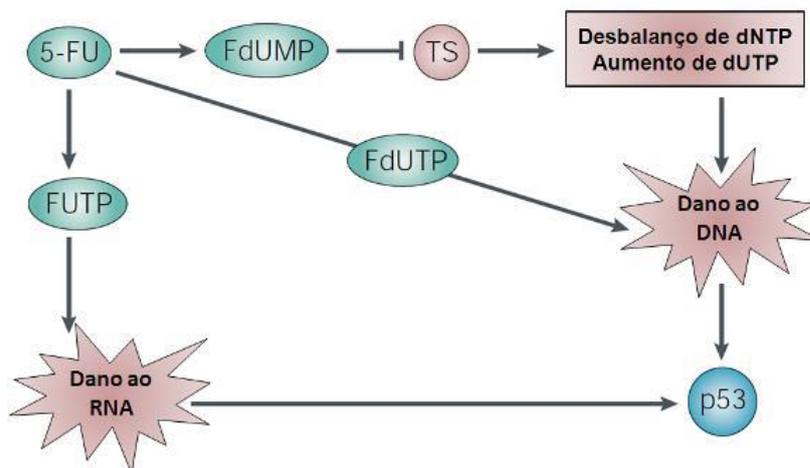


Figura 5: Esquema representativo dos mecanismos antineoplásicos do 5-fluorouracil (5-FU). O 5-FU pode induzir a morte celular via a ativação da p53 por mais de um mecanismo: incorporação de fluorouridina trifosfato (FUTP) ao RNA, incorporação de fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) ao DNA e inibição da timidilato sintase (TS) devido a ligação estável com a fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP). Essa inibição resulta no desbalanço de desoxinucleotídeos (dNTP) e aumento de desoxiuridina (dUTP). Modificado de Longley *et al.*, 2003.

A mucosite, também chamada de lesão da barreira mucosa, é um dos efeitos colaterais mais debilitantes do tratamento de radioterapia e quimioterapia (Ribeiro *et al.*, 2016). Patologicamente, a mucosite é caracterizada tanto pela inflamação quanto pela perda de células da barreira epitelial do trato gastrointestinal, se estendendo da região da boca até o ânus (van Vliet *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2016). Isso resulta em dor, disfagia, diarreia e disfunção, dependendo do tecido afetado (Ribeiro *et al.*, 2016). Como a maioria das doenças, a mucosite possui um espectro variável de manifestações clínicas. Na sua forma mais branda, apresenta uma lesão atrófica, eritematosa, na qual a mucosa permanece intacta e os pacientes têm uma sensibilidade semelhante a queimaduras causadas por alimentos muito quentes (Sonis, *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2016). Em contrapartida, pacientes com mucosite mais grave desenvolvem ulcerações que transpõe inteiramente a submucosa e causam dor forte que frequentemente necessita de analgesia narcótica (Sonis *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2016). Segundo o modelo introduzido por Sonis, cinco fases são importantes na fisiopatologia da mucosite: (1) a formação de espécies reativas de oxigênio que conduz à ativação de NF- κ B durante a fase inicial; (2) a indução de moléculas mensageiras, como o TNF resultando em inflamação tecidual e apoptose devido ao tratamento durante a fase de regulação; (3) amplificação de moléculas mensageiras na fase de amplificação / sinalização, levando a uma exacerbação da inflamação e da apoptose (4) descontinuidade da barreira epitelial resultante da apoptose durante a fase ulcerativa, promovendo a translocação bacteriana e (5) uma fase de cura (Sonis, 2004; Ribeiro *et al.*, 2016). A permeabilidade intestinal aumenta após o tratamento quimioterápico e tem demonstrado ser uma característica da terceira e quarta fases da mucosite (Sonis *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2016). Um dos mecanismos que resulta em um aumento da permeabilidade induzido pela quimioterapia é provavelmente a atrofia das vilosidades (Van Vliet, *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2016).

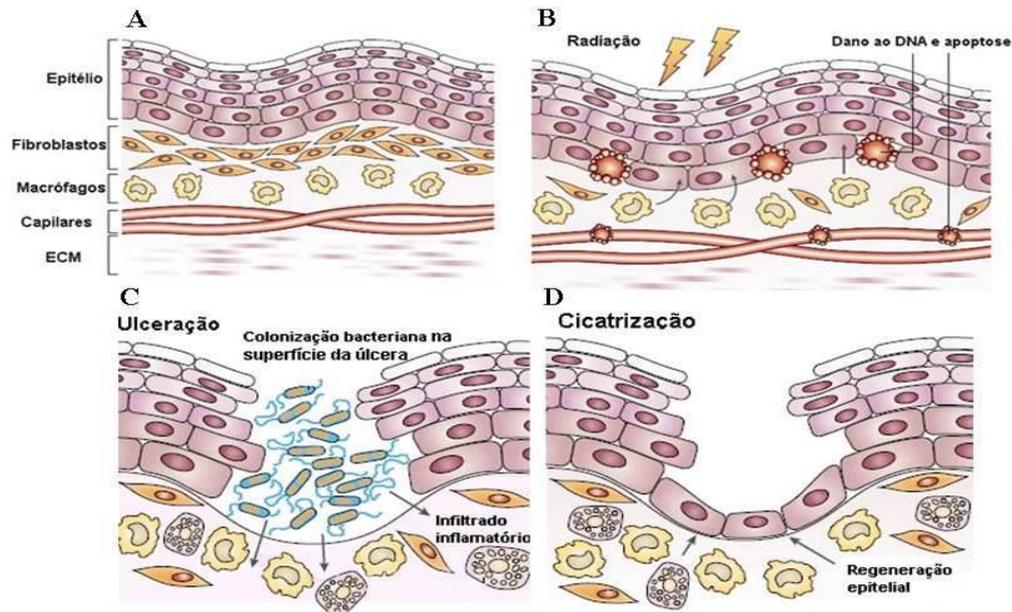


FIGURA 6: Fases da mucosite. A- Fase de início da mucosite induzida por quimioterapia ou radioterapia. B- Fase de amplificação de sinais. C- Fase de ulceração. D- Fase de cicatrização. Adaptado de Sonis (2004).

A mucosite é um fenômeno agudo que desaparece espontaneamente após cessar o tratamento. A última fase é a cicatrização, caracterizada por intensa proliferação celular, que resulta na restauração estrutural e funcional das vilosidades, retorno da barreira intestinal e da superfície de absorção. A resposta inflamatória diminui e a mucosa é completamente regenerada, retomando a sua função normal (Sonis, 2004; Van Vliet *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2016). Durante o período em que a mucosite está ativa, existe um alto risco de infecções, causadas principalmente pelo fungo *Candida albicans*, sendo mais frequente em pacientes com neutropenia prolongada (Scully *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2016). A mielossupressão por sua vez é um evento tardio que surge por volta do sétimo dia após a administração do 5-FU e se caracteriza pela diminuição da produção de células pela medula óssea. Além dos sintomas e seu impacto na qualidade de vida, a mucosite tem complicações que levam a internações mais longas, aumentam os custos com o tratamento e é uma razão frequente para redução das dosagens de quimioterápicos ou para interrupção do tratamento, conduzindo a uma maior mortalidade em pacientes com câncer devido à ameaça à eficácia dos planos de tratamento (Sonis *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2016). Alguns trabalhos atuais têm abordado que neutrófilos e eosinófilos têm papel importante na patogênese da mucosite (Guabiraba *et al.*, 2014; Arifa *et al.*, em preparação). Em relação ao eosinófilo, a ausência do acúmulo dessas

células no tecido, seja em animais com depleção genética $\Delta db/GATA$ ou tratados com Evasina-4 (proteína que se liga as quimiocinas CCL11 e CCL5, quimiotática para eosinófilos) resultou em menor lesão intestinal (Arifa *et al.*, em preparação). O papel essencial do eosinófilo foi constatado, uma vez que a ausência dessas células em camundongos $\Delta db/GATA$ levou a melhora dos sinais clínicos após o tratamento com Irinotecano, bem como uma mucosite menos grave (Arifa *et al.*, em preparação).

2. JUSTIFICATIVA

Com a evolução da medicina e a consequente disponibilidade de medicamentos para o tratamento de transplantados de órgãos sólidos, doenças autoimunes, inflamatórias e de neoplasias percebe-se o aumento do número de casos de infecções por patógenos oportunistas, como *Candida albicans*. Essa levedura é um componente da microbiota gastrointestinal que em situações de lesão tecidual, imunossupressão e disbiose, comporta-se como um agente agressor. A candidíase oral, causada por *C. albicans*, é a infecção oportunista mais prevalente em hospitais, podendo evoluir para candidíase invasiva, sepse e morte dos pacientes. Dados oficiais históricos de doenças fúngicas foram coletados no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) e mostraram que em um ano foram estimados 2.981 416 casos de infecções graves por *Candida*, incluindo doenças invasivas e não invasivas (Giacomazzi *et al.*, 2016).

Mesmo sendo um patógeno oportunista com elevada taxa de ocorrência entre pacientes submetidos a tratamentos contra tumores sólidos e malignidades hematológicas, ainda pouco se sabe sobre os fatores relacionados à transição de comensal para patogênico nesses hospedeiros. Portanto, percebe-se a urgente relevância no desenvolvimento de modelos murinos que permitam avaliar mecanismos fisiopatológicos dessa infecção em quadros de imunossupressão. Embora a associação entre inflamação eosinofílica e sensibilização ou colonização fúngica tenha sido reconhecida há muito tempo, os mecanismos imunológicos envolvidos entre eosinófilos e *C. albicans* ainda não foram reportados. Portanto a presente proposta propõe a padronização de modelos murinos de imunossupressão associados à infecção por *C. albicans* e ao papel dos eosinófilos nesse contexto, para que forneçam subsídios para mais estudos e identificação de possíveis alvos terapêuticos.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar modelos experimentais de candidíase oral para avaliação do papel do eosinófilo na patogênese da infecção por *Candida albicans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Implementação do modelo de candidíase oral em camundongos C57BL/6 e BALB/c utilizando o glicocorticoide dexametasona como indutor de imunossupressão, avaliando os seguintes parâmetros:

Em animais C57BL/6:

- Definição do inóculo de *C.albicans* a ser utilizado;
- Definição do tempo de infecção.

Em animais C57BL/6 e BALB/c:

- Análise de parâmetros clínicos (perda de peso e morbidade), inflamatórios (MPO e NAG) e carga fúngica;
- Análise histopatológica da língua dos animais.

2) Implementação do modelo de imunossupressão em camundongos C57BL/6, utilizando o quimioterápico 5-FU, avaliando os seguintes parâmetros:

- Análise da letalidade nas doses de 75 mg/Kg e 150 mg/Kg de 5-FU para estabelecimento da dose a ser utilizada;
- Avaliação da ação imunossupressora de 5-FU por meio da contagem total de leucócitos no sangue.

3) Padronização da candidíase oral em camundongos C57BL/6, utilizando o quimioterápico 5-FU para avaliar as seguintes respostas:

- Análise de parâmetros clínicos (perda de peso, morbidade, textura das fezes) inflamatórios (MPO, NAG e ELISA) e carga fúngica;
- Avaliação do efeito do antagonista do receptor CXCR2, DF2156A, na candidíase oral induzida por 5-FU;
- Análise histopatológica da língua dos animais.

4) Avaliar o papel dos eosinófilos, com a utilização de animais BALB/c deficientes para o fator de transcrição GATA1 ($\Delta db/Gata1^{-/-}$), na candidíase oral induzida por 5-FU. Avaliando os seguintes parâmetros:

- Padronização da candidíase oral induzida por 5-FU em animais BALB/c WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$;
- Análise de parâmetros clínicos, inflamatórios (MPO e ELISA) e carga fúngica;
- Análise histopatológica da língua dos animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$.

4. METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas WT da linhagem C57BL/6 e da linhagem BALB/c de 6 a 8 semanas de idade adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte, Minas Gerais. Além disso, foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c deficientes para o fator de transcrição GATA1 ($\Delta db/Gata1^{-/-}$) deficientes em eosinófilos, os quais foram adquiridos do Biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG sob condições controladas de temperatura (28°C a 30°C), umidade (50%), ventilação, ciclos de iluminação claro e escuro de 12 horas, ração e água sem restrições. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFMG, sob o protocolo 157 / 2018 (ANEXO 1).

4.2 *Candida albicans*

Neste trabalho foi utilizada uma amostra clínica (L3881) de *C. albicans* (LEMI # L3881, Padovan *et al.*, 2009). Consiste em uma amostra gentilmente cedida pelo Prof. Frederico Marianetti Soriani, do Departamento de Genética, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A L3881 é proveniente do LEMI (Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo, Brasil), isolada do sangue de um paciente que teve candidemia e foi curado clinicamente. A amostra foi devidamente armazenada em freezer a -80°C e, paralelamente, foi feito um estoque de trabalho, mantido a 4°C em meio Mycosel.

4.3 DROGAS UTILIZADAS

Para realização do primeiro protocolo de imunossupressão foi utilizado o corticoide sintético dexametasona (Decadron/Àche) na dose de 10 mg/kg, administrado uma dose/dia, via i.p, durante todo o experimento. Para a indução de imunossupressão no outro modelo utilizou-se o quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) (Fauldfluor), nas doses de 75 mg/Kg e 150 mg/Kg, sendo administrado uma dose/dia, via i.p, durante três dias consecutivos. Para avaliar o papel dos neutrófilos na candidíase oral utilizou-se um antagonista seletivo dos receptores CXCR1/CXCR2, DF 2156A (Guabiraba *et al.*, 2014), na dose de 10 mg/Kg diluído em salina e administrado, por via subcutânea, de 12h em 12h, começando 12h antes da infecção até 12h antes da eutanásia.

4.4 INDUÇÃO DE CANDIDÍASE ORAL EXPERIMENTAL

A candidíase oral foi induzida em camundongos tratados com DEX e 5-FU. Para esse procedimento os camundongos foram anestesiados com uma solução contendo xilazina (15mg/Kg) e cetamina (100 mg/kg). Como estratégia para facilitar a infecção, foi realizada uma raspagem/escoriação sublingual nos animais com bisturi para retirar camadas do epitélio sem, no entanto, provocar lesões profundas na língua. Posteriormente a essa escoriação, os animais foram infectados por meio de uma bola de algodão estéril de aproximadamente 0,0025 g, saturada com 30 µL do inóculo estabelecido, 2×10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Candida albicans*. Esse algodão foi colocado na região sublingual dos animais anestesiados por 75 minutos (adaptado de Conti *et al.*, 2009). A anestesia foi readministrada de 20 em 20 minutos, em um volume de aproximadamente 20 microlitros. A escoriação foi realizada somente em animais da linhagem BALB/c.

4.4.1 Preparo do inóculo

O cultivo de *Candida albicans* foi realizado em meio Myosel, a 37°C, por 24h (Adaptado de Conti *et al.*, 2009). Os inóculos foram preparados em PBS 1X e ajustados para uma solução com $6,66 \times 10^8$ UFC/mL de *C. albicans* por contagem em câmara de Neubauer. Dessa suspensão foram retirados 30 µL por animal para realização da infecção com 2×10^7 e 2×10^9 UFC de *C.albicans*.

4.4.2 Carga fúngica

A língua e o baço foram coletados, homogeneizados/triturados, diluídos em PBS 1X até 1: 1000. 50 µL do homogenato de cada órgão foram plaqueados em meio Mycosel e em seguida incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as colônias foram contadas visualmente e a quantidade de UFC/mg de órgão foi estabelecida. O sangue também foi coletado e 50 µL distribuído em meio Mycosel e a contagem de colônias de *C.albicans* expressas em UFC/mL.

4.5 INDUÇÃO DE IMUNOSSUPRESSÃO NOS ANIMAIS

O modelo de imunossupressão induzido por dexametasona foi baseado em LIMA *et al.*, 2015, com a utilização de Decadron/Àche na dose de 10 mg/Kg, uma dose/ dia, via i.p, todos os dias, durante todo procedimento experimental (figura 7) Os animais foram infectados no quinto dia de administração de dexametasona. Um trabalho do nosso grupo já havia realizado um experimento de dose-resposta para determinar a dose de 5-FU necessária para induzir mucosite intestinal, testando as doses de 50, 150 e 450 mg/kg. Os resultados mostraram que a dose de 50 mg/kg induzia uma mucosite e uma imunossupressão bem discretas e a dose 450 mg/kg era extremamente letal (Menezes-Garcia, 2014). Por isso, optamos por testar as doses de 75 mg/kg e a de 150 mg/kg e foram administradas aos camundongos, via i.p, durante três dias consecutivos. No quinto dia após a primeira dose de 5-FU, os animais foram infectados por *C. albicans*, conforme descrito o protocolo de infecção oral. Os animais controles receberam PBS. As doses de 75 e 150 foram utilizadas e comparadas para a avaliação da letalidade e da condição clínica dos animais, para posterior infecção com *C. albicans*. A dose de escolha, portanto, foi a de 75 mg/Kg e foi usada para todos os demais experimentos (figura7).

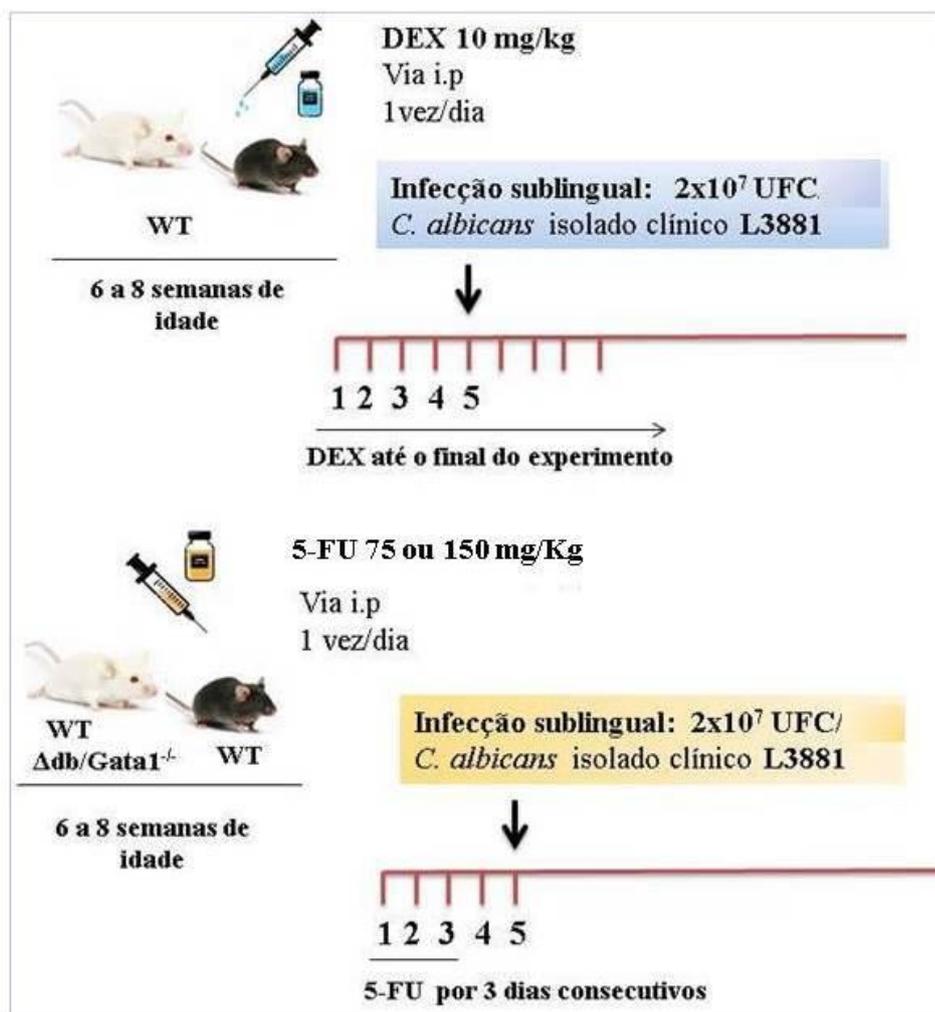


Figura 7: Protocolo experimental para indução de imunossupressão pelo corticoide dexametasona e pelo antitumoral 5-FU em camundongos C57BL/6 e BALB/c.

4.6 DETECÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILOS (MPO)

O acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi avaliado pelo ensaio indireto através da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para tanto, fragmentos da língua e do baço dos animais infectados ou controles foram retirados e congelados a -20°C . Após o descongelamento, 100mg do tecido foi homogeneizado em 2mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO_4 ; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 – Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 3000g, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelada (para 100mg de

tecido, 1,5mL de solução) seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão Na_3PO_4 0,05M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% p/v e re-homogeneizado. Alíquotas de 1mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 3000g e os sobrenadantes coletados. As amostras dos tecidos de camundongos foram diluídas previamente à análise em tampão Na_3PO_4 0,05 M. A atividade da mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450nm) usando *tetramethylbenzidine* (1.6mM) e H_2O_2 (0.5mM) para a medição das alterações da densidade óptica (OD). Os resultados foram expressos como unidade relativa comparados com neutrófilos de camundongos não infectados. Uma curva padrão do número de neutrófilos *versus* OD foi previamente obtida pelo processamento de neutrófilos purificados do peritônio de camundongos como padronizado anteriormente por Souza e colaboradores, 2004.

4.7 DETECÇÃO INDIRETA DE MACRÓFAGOS (NAG)

O acúmulo de macrófagos foi avaliado pelo ensaio da quantificação da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG). Fragmentos da língua e baço dos animais infectados ou controles foram retirados e congelados a -20°C . Após o descongelamento, 100mg do tecido foi homogeneizado em 2 mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO_4 ; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 – Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 3000g, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelada (para 100mg de tecido, 1,5mL de solução) seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em solução salina 0,9%/Triton x-100 0,1% v/v e re-homogeneizado. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000g e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Alíquotas de 100 μL da suspensão foram transferidas para placas de 96 poços, em duplicata e 100 μL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosiminida) e manter a 37°C . Após 10 minutos, adicionou-se a solução 100 μL de tampão

glicina 0,2 M e a atividade da NAG foi determinada através de leitor de ELISA (400nm). Os resultados foram expressos como densidade óptica (OD).

4.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

Amostras de soro e língua foram utilizadas para dosagem das citocinas (TNF, IL-1 β , IFN- γ e IL-17) e quimiocinas (CCL-11 e CXCL-1). Fragmentos de língua foram homogeneizados em solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1mM *phenylmethanesulfonyl fluoride*; 0,1mM *benzethonium chloride*; 10mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% *Tween 20*, na proporção de 0,1g de tecido para cada mL de solução; utilizou-se um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e os sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) a -20°C, para posterior análise. As amostras de soro e tecidos foram analisadas na diluição 1:2 para citocinas e 1:3 para quimiocinas em PBS contendo 0,1% de albumina bovina, como previamente padronizada em nosso laboratório. Foram utilizados kits de anticorpos (R&D Systems, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Para a realização do ensaio, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4), sendo que a sensibilização ocorreu durante 18h a 4°C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, 25 EUA). As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços e incubados por 18h. Os poços foram então lavados e o anticorpo de detecção adicionado pelo período de 2h. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingen – 1:4000) e revelada com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride – Sigma-Aldrich, EUA). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 492nm. Os ensaios apresentaram uma sensibilidade de 8-16pg/ml.

4.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Amostras de língua foram coletadas dos camundongos após dois dias de infecção. Posteriormente a retiradas dos tecidos eles foram imediatamente fixados em 10% de formalina tamponada durante 24 horas, processadas, incluídas em parafina, cortadas, montadas em lâminas, coradas com H&E e PAS. Foram avaliadas sob um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha) adaptado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Japão). Na língua o score histopatológico foi adaptado a partir de alterações morfológicas no epitélio e tecido conjuntivo da mucosa da língua descritas nos trabalhos de Takakura *et al* 2003 e Conti *et al* 2009. Nessa avaliação, pontuamos a presença (1) ou ausência (0) de exocitose, erosão epitelial, ulceração e/ou necrose no tecido epitelial, além de hiperemia vascular e hemorragia no tecido conjuntivo. Além disso, avaliamos a intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo (e entre as fibras musculares da língua) em uma pontuação que variou de 0-5, sendo 0 indicativo de ausência e 5 indicativo de infiltrado muito intenso.

4.10 AVALIAÇÃO DA GRADUAÇÃO CLÍNICA DA MUCOSITE ASSOCIADA À CANDIDÍASE ORAL

A graduação clínica da doença foi adaptada e modificada para o nosso modelo (Maslowski *et al.*, 2009). Foi avaliada a consistência das fezes, perda de peso, ingestão de comida, bem como sinais de morbidade, como pelo arrepiado, postura arqueada e diminuição da mobilidade dentro da caixa.

4.11 ANÁLISE DO LEUCOGRAMA

Para a avaliação da imunossupressão, antes da infecção foram coletados sangue dos animais pela veia caudal e para isso eles foram colocados em um contensor, um tubo de Acrílico Cristal, frente e traseira removíveis, com sistema de travamento. Além disso, esse tubo possui cinco furos laterais de 6,3 mm para entrada e saída de ar. Na eutanásia, as amostras de sangue foram obtidas diretamente da veia cava inferior dos animais, coletadas em tubos heparinizados e posteriormente separadas para contagem total de leucócitos e coleta do

soro. Para contagem total, amostras de sangue foram diluídas em solução de Turk e contadas em câmara de Neubauer e o resultado foi expresso em número total de leucócitos/mL de sangue.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Os resultados serão apresentados como média±erro padrão médio. O nível de significância adotado será de $P < 0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Padronização de candidíase oral em modelo de imunossupressão utilizando dexametasona

5.1.1 Animais C57BL/6

- Definição do melhor inóculo fúngico a ser utilizado no modelo experimental

Inicialmente testamos se animais WT não infectados possuíam *C. albicans* como parte da microbiota e com o método de plaqueamento não foi encontrado esse fungo nas amostras. Posteriormente, padronizamos o inóculo de *C. albicans* em animais pré-tratados com Dexametasona (DEX) (10mg/Kg; via i.p) ou com veículo (PBS). Os animais foram submetidos à infecção com os dois inóculos, 2×10^7 e 2×10^9 UFC de *C. albicans*, após cinco dias de tratamento com DEX ou PBS. Os animais foram eutanasiados sete dias após infecção e os dados demonstram que houve recuperação de carga fúngica na língua em todos os grupos avaliados, sendo que o maior aumento foi verificado com o inóculo de 2×10^7 UFC de *C. albicans* com o pré-tratamento com DEX (figura 8A). Ao avaliarmos baço (figura 8B) e sangue (figura 8C) apenas nos grupos pré-tratados com DEX houve recuperação de carga fúngica, entretanto, há grande variações entre os animais e esses dados não foram conclusivos.

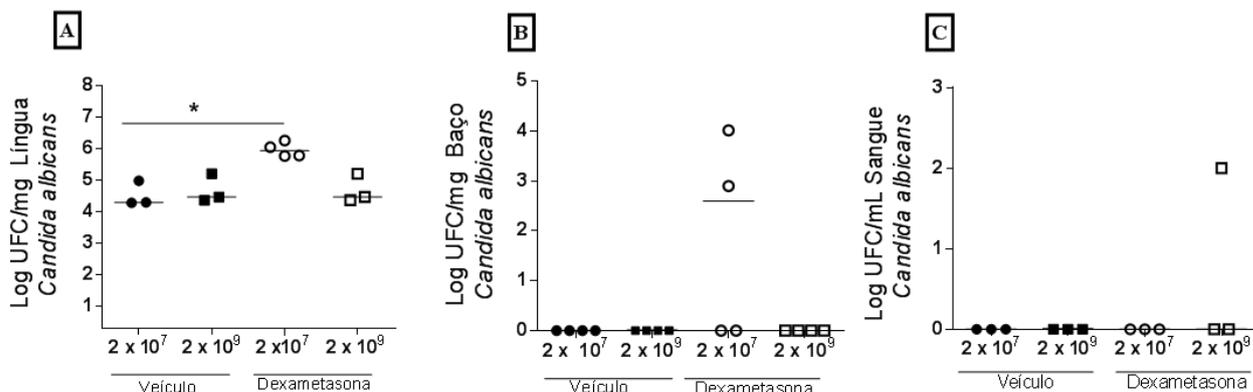


Figura 8: Carga fúngica de animais infectados com *C. albicans* por via sublingual. Um grupo de camundongos da linhagem C57/BL6 foram imunossuprimidos com DEX via i.p e infectados, por via sublingual, com 2×10^7 e 2×10^9 UFC de amostra clínica de *C. albicans*. Os camundongos controle

(veículo) receberam injeção i.p.de PBS e foram infectados. Os animais foram avaliados por sete dias. N= 3-4 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle infectados, não tratados com DEX. # $p < 0,05$ quando comparados os animais infectados e tratados com DEX.

- A candidíase oral associada ao tratamento com DEX induz maior perda de peso corporal

Após padronizar o inóculo a ser utilizado avaliamos perda de peso corporal como parâmetro clínico. As alterações no peso dos camundongos infectados foram avaliadas durante sete dias, conforme demonstrado na figura 9. Nossos resultados demonstraram que durante o curso da infecção, os animais tratados com DEX/infectados perdem peso quando comparados ao grupo controle (veículo) e aos animais que receberam PBS/infectados.

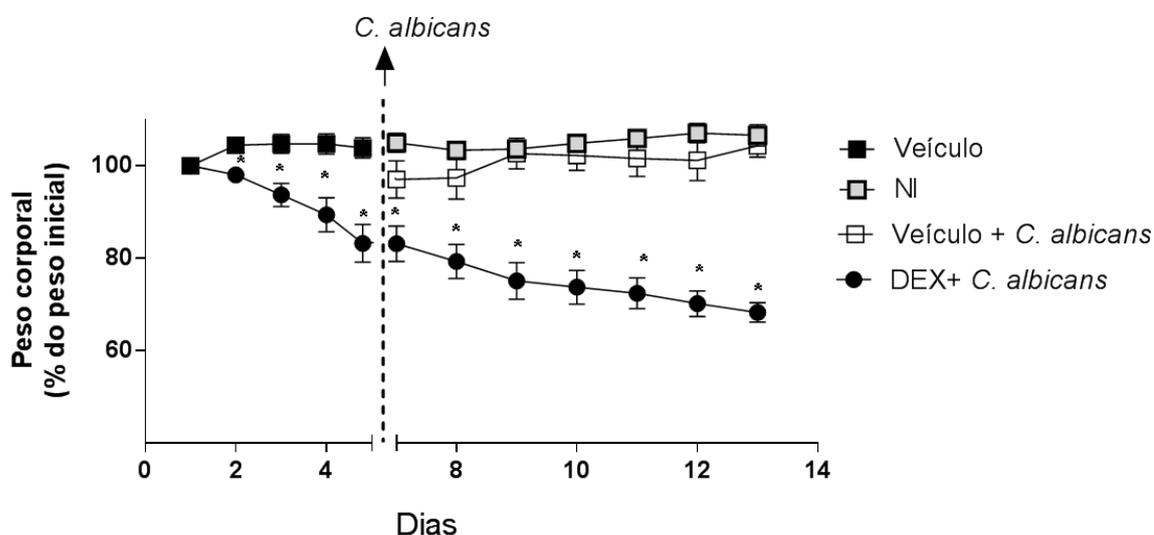


Figura 9: Animais tratados com DEX e infectados com *C. albicans* apresentam maior perda de peso. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados via sublingual por 2×10^7 UFC de *C. albicans*. A seta no gráfico indica o dia em que os animais foram infectados. N= 12 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais veículo. # para $p < 0,05$ quando comparados com os grupos infectados.

- Determinação do tempo de infecção

Após estabelecimento o inóculo de 2×10^7 UFC de *C. albicans*, realizamos uma cinética de infecção. Os animais pré-tratados com dexametasona foram eutanasiados com 5, 7 e 10 dias após infecção e os animais veículo foram eutanasiados juntamente com o grupo de q0 dias, ou seja, no último dia da cinética.

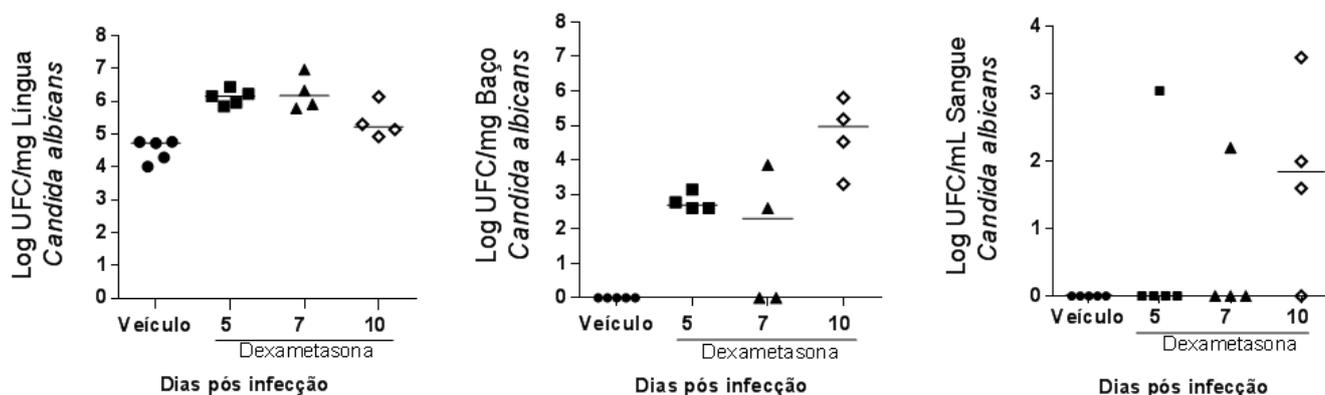


Figura 10: Carga fúngica de animais infectados com *C. albicans* após 5, 7 e 10 dias de infecção. Os camundongos da linhagem C57/BL6 foram infectados com o inóculo estabelecido de 2×10^7 UFC. Os grupos 5, 7 e 10 dias de infecção receberam DEX e o grupo controle (veículo) receberam PBS e foram igualmente infectados. N=4-5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais veículo. # $p < 0,05$ quando comparados com animais tratados com DEX.

Os resultados de carga fúngica referente aos dias 5, 7 e 10 dias após infecção não apresentaram diferença estatística. Logo, os parâmetros inflamatórios foram utilizados para designar o tempo de infecção para esse modelo. Na Fig 11A podemos notar que não houve diferença na quantidade de MPO na língua, entretanto houve uma diferença estatística no influxo de neutrófilos no baço, mostrando que no sétimo dia de infecção há uma inflamação neutrofílica mais exacerbada quando comparado aos outros grupos. Na Fig 10B, a média das quantidades relativas de N-acetilglicosaminidase (NAG) foi maior também no sétimo dia de infecção, em ambos os órgãos. Os dados de MPO e NAG se corroboram e demonstram que o sétimo dia representa uma inflamação bem estabelecida e por isso optamos por realizar a eutanásia sete dias após a infecção nesse modelo.

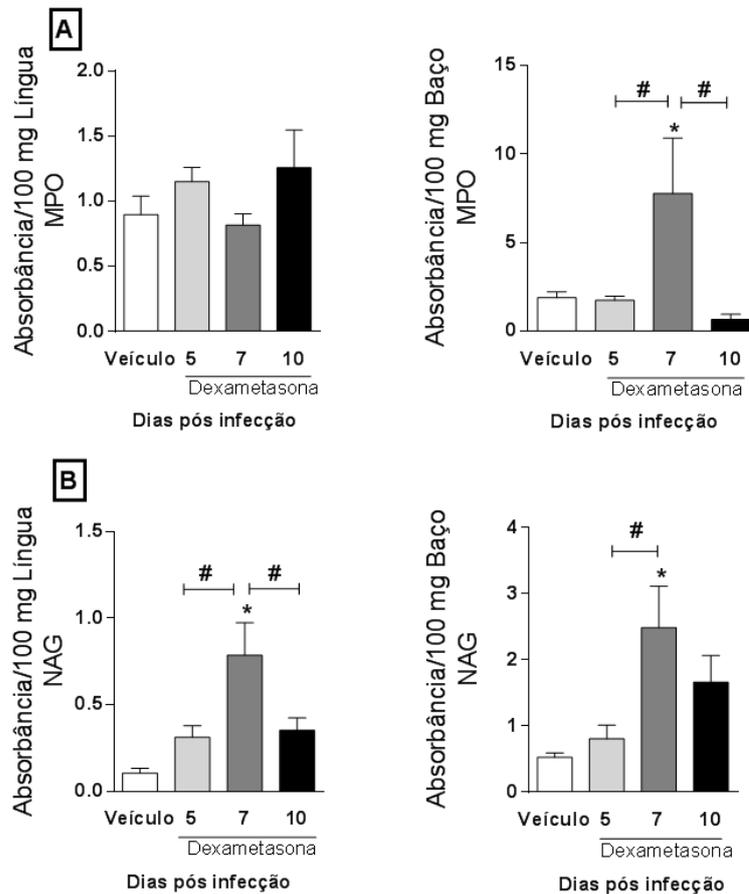


Figura 11: A infecção por *Candida albicans* após sete dias induz aumento do recrutamento de neutrófilos no baço e maior recrutamento de macrófagos em ambos os tecidos. O acúmulo de neutrófilos (A) e macrófagos (B) na língua e no baço dos animais foi avaliado por meio dos métodos indiretos baseados nas atividades de MPO e NAG, respectivamente. Os grupos 5, 7 e 10 dias de infecção receberam DEX e o grupo controle (veículo) receberam PBS e foram igualmente infectados. N=4-5 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais veículo. # $p < 0,05$ quando comparados os animais tratados com DEX.

5.1.2 Animais BALB/c

Seguindo o protocolo de imunossupressão por DEX (10 mg/Kg) já descrito, os animais da linhagem Balb/c foram imunossuprimidos e infectados por *C. albicans* no inóculo de 2×10^7 UFC. Sob anestesia, foram utilizadas três estratégias para facilitar a infecção por *C. albicans*, em três grupos diferentes: um grupo com Clorexidina 0,12 % + 2% de carboximetilcelulose, um antisséptico oral com a finalidade de causar disbiose; o segundo grupo com ácido acético a 50% (Katagiri *et al.*, 2018) e o terceiro grupo com

escoriação/raspagem sublingual. Ao comparar as três estratégias (dados não mostrados) a que mais facilitou o estabelecimento da *C. albicans* foi a escoriação sublingual, visto que, a clorexidina não provocou alterações significativas e o ácido foi tóxico, provocando a morte por asfixia de alguns animais mesmo antes da infecção. Portanto, nesse modelo, os animais dos grupos DEX + *C. albicans* e Raspado + *C. albicans* foram submetidos a uma escoriação/raspagem sublingual antes da infecção com a finalidade de mimetizar o efeito de lesões orais na infecção. Segundo Itai *et al.*, 2017, o uso de DEX pode desencadear uma leucopenia e isso se deve, principalmente, à neutropenia.

A figura 12 demonstra que após dois dias de infecção os animais tratados com DEX e infectados com *C. albicans* apresentam uma leucopenia estatisticamente significativa quando comparada ao veículo.

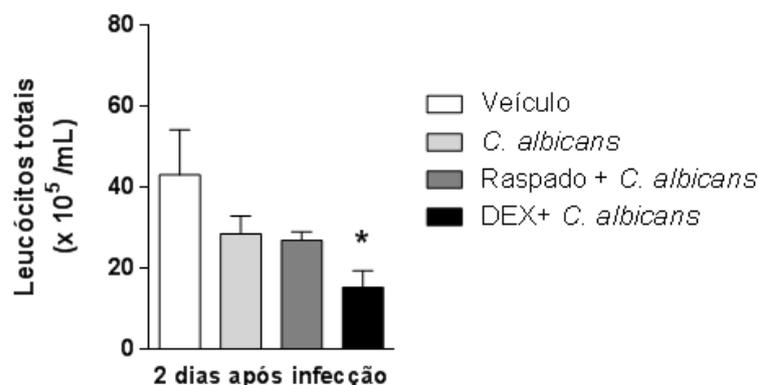


Figura 12: Contagem total de leucócitos do sangue de animais após dois dias de infecção por *C. albicans*. Os animais da linhagem Balb/c foram imunossuprimidos com DEX e infectados com inóculo de 2×10^7 UFC. N= 5-6 * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle.

- Animais BALB/c tratados com DEX apresentam maior carga fúngica na língua

Os animais foram eutanasiados dois dias após infecção e os dados demonstram que houve recuperação de carga fúngica na língua em todos os grupos avaliados, sendo que o maior aumento foi verificado no grupo infectado com *C. albicans* com o pré-tratamento com DEX (figura 13). Ao avaliarmos o baço apenas no grupo pré-tratado com DEX houve recuperação de carga fúngica, entretanto, há grande variações entre os animais.

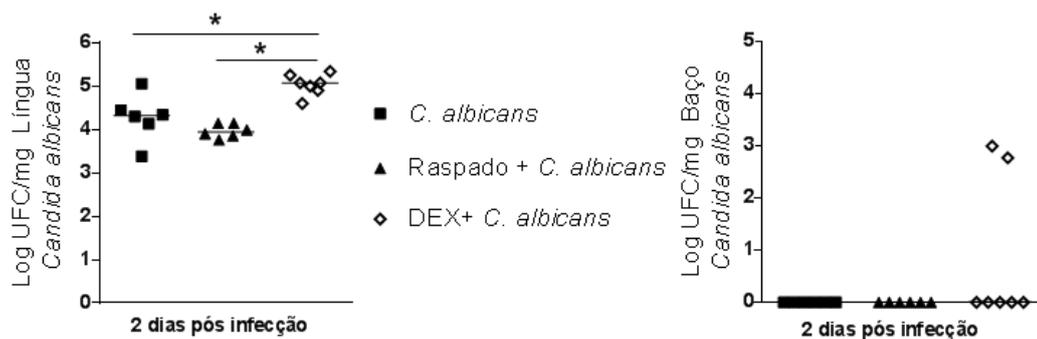


Figura 13: Carga fúngica de animais infectados com *C. albicans* por via sublingual, tratados com DEX ou veículo. Os animais da linhagem Balb/c foram infectados após tratamento com DEX ou PBS e eutanasiados dois dias após a infecção. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais do grupo *C. albicans*.

- A infecção oral por *C. albicans* induz aumento do recrutamento de neutrófilos e macrófagos no baço dos camundongos BALB/c

A figura 14 demonstra a quantificação da atividade das enzimas MPO e NAG na língua e no baço dos animais infectados com *C. albicans*. Pode ser observado que ocorre um aumento no número de neutrófilos no baço no grupo Raspado + *C. albicans* quando comparado ao grupo controle NI (veículo) e aos outros grupos infectados. Por outro lado, não foi detectado MPO na língua dos animais. A enzima NAG teve um discreto aumento no baço dos animais dos grupos Raspado + *C. albicans* e DEX + *C. albicans* quando comparamos ao veículo e ao grupo *C. albicans*.

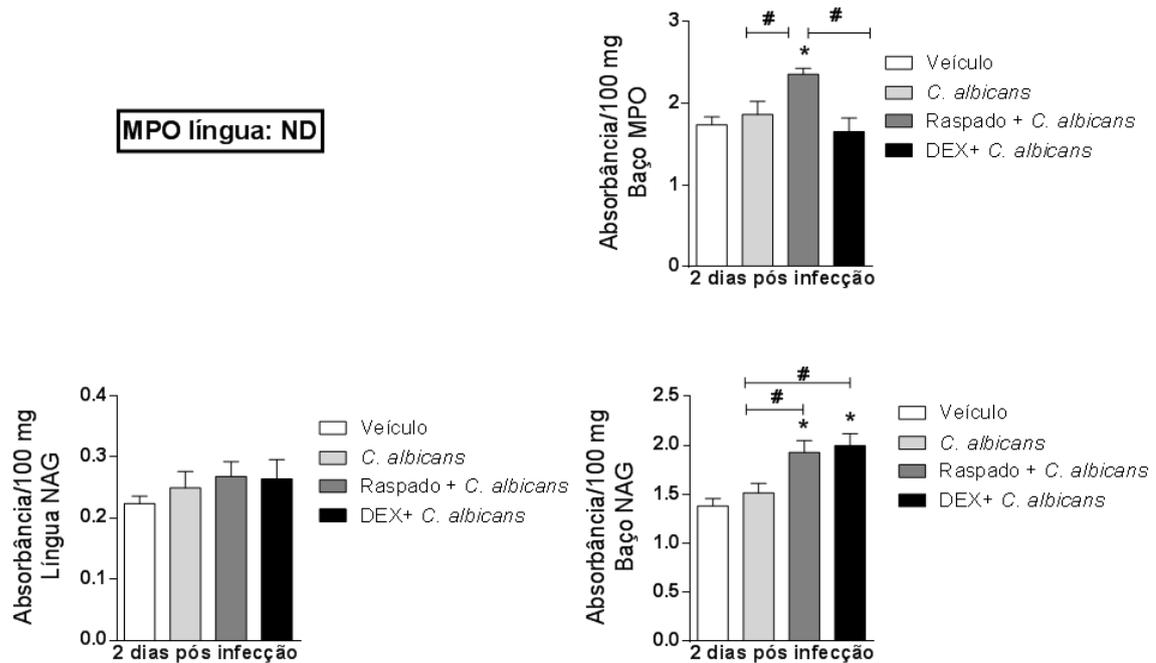


Figura 14: A infecção oral por *C. albicans* e tratamento com DEX induz aumento do recrutamento de neutrófilos e macrófagos no baço dos camundongos. Os camundongos da linhagem Balb/c foram infectados com *C. albicans* e eutanasiados após 48h de infecção. A migração de neutrófilos foi avaliada pela quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) e a de macrófagos foi avaliada pela quantificação dos níveis da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) na língua e no baço. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos e macrófagos por 100mg de tecido. Os grupos foram de 5-6 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos infectados.

- A infecção oral por *C. albicans* associada à imunossupressão por DEX induz maior perda de peso corporal em camundongos BALB/c

A figura 15 mostra que a perda de peso mais exarcebada e estatisticamente significativa foi dos animais tratados com DEX e infectados com *C. albicans*. Entretanto, após a infecção os animais do grupo raspado+ *C. albicans* apresentou um declínio no peso de forma estatisticamente significativa quando comparado ao veículo e ao grupo *C. albicans*. De fato, os animais tratados com DEX perdem mais peso, porém a infecção associada ao raspado também induz uma redução considerável do peso corporal dos animais.

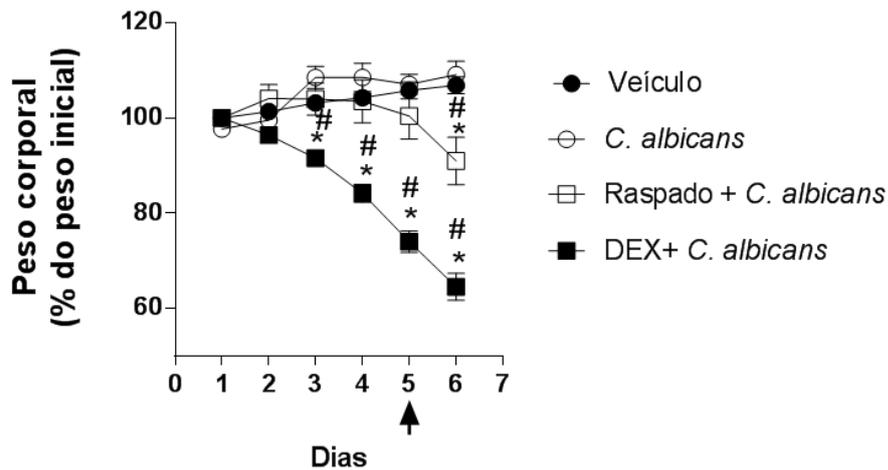


Figura 15: A infecção oral por *C. albicans* induz maior perda de peso corporal em camundongos tratados com DEX. Os camundongos da linhagem Balb/c foram infectados por *C. albicans* e o peso foi avaliado durante sete dias. A seta no gráfico indica o dia em que os animais foram infectados. N=6 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com o grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos infectados.

- Alterações histopatológicas na língua de animais com candidíase oral

Na figura 16 A podemos está representada a língua de um animal controle caracterizada pela presença de um epitélio estratificado íntegro, com uma fina camada de tecido conjuntivo subjacente. A figura 16 B corresponde a uma língua infectada por *C. albicans* e tal processo deu origem à hiperplasia do epitélio e à exocitose. O processo inflamatório foi caracterizado pela presença de um infiltrado celular, principalmente de leucócitos polimorfonucleares (PMN), que são células características de inflamação aguda. Ainda nessa figura há a hiperplasia do tecido conjuntivo devido ao aparecimento de infiltrado moderado e difuso próximo às áreas de lesão epitelial e um infiltrado leve entre as fibras musculares. A figura 16C apresenta uma língua infectada com *C. albicans* associada ao raspado sublingual. O perfil de lesão histológica é semelhante ao da figura B, diferindo na maior frequência com que as lesões apareceram nos animais. Além disso, o infiltrado celular (PMN) é intenso e também semelhante ao da figura B, porém na figura C as células inflamatórias invadem mais as fibras musculares. O score referente à figura C foi maior devido a maior frequência com que as lesões foram observadas, além de ter alguns animais desse grupo com processos de ulceração, necrose e hemorragia no tecido lingual. A seção

histológica 16 D demonstra a língua de um animal tratado com DEX e infectado com *C. albicans*, podendo ser caracterizada por uma lesão restrita ao epitélio e com presença de exocitose. Há menor lesão tecidual devido uma menor quantidade de células inflamatórias quando comparado aos animais não imunossuprimidos, no entanto há uma maior quantidade de células fúngicas no tecido. As seções histológicas da figura 17 representam as mesmas fotos da figura 18, porém com coloração de PAS que permite a visualização do fungo. De fato, os scores histopatológico e infiltrado inflamatório (Figura 18) traduzem o que está sendo demonstrado pelas figuras histológicas.

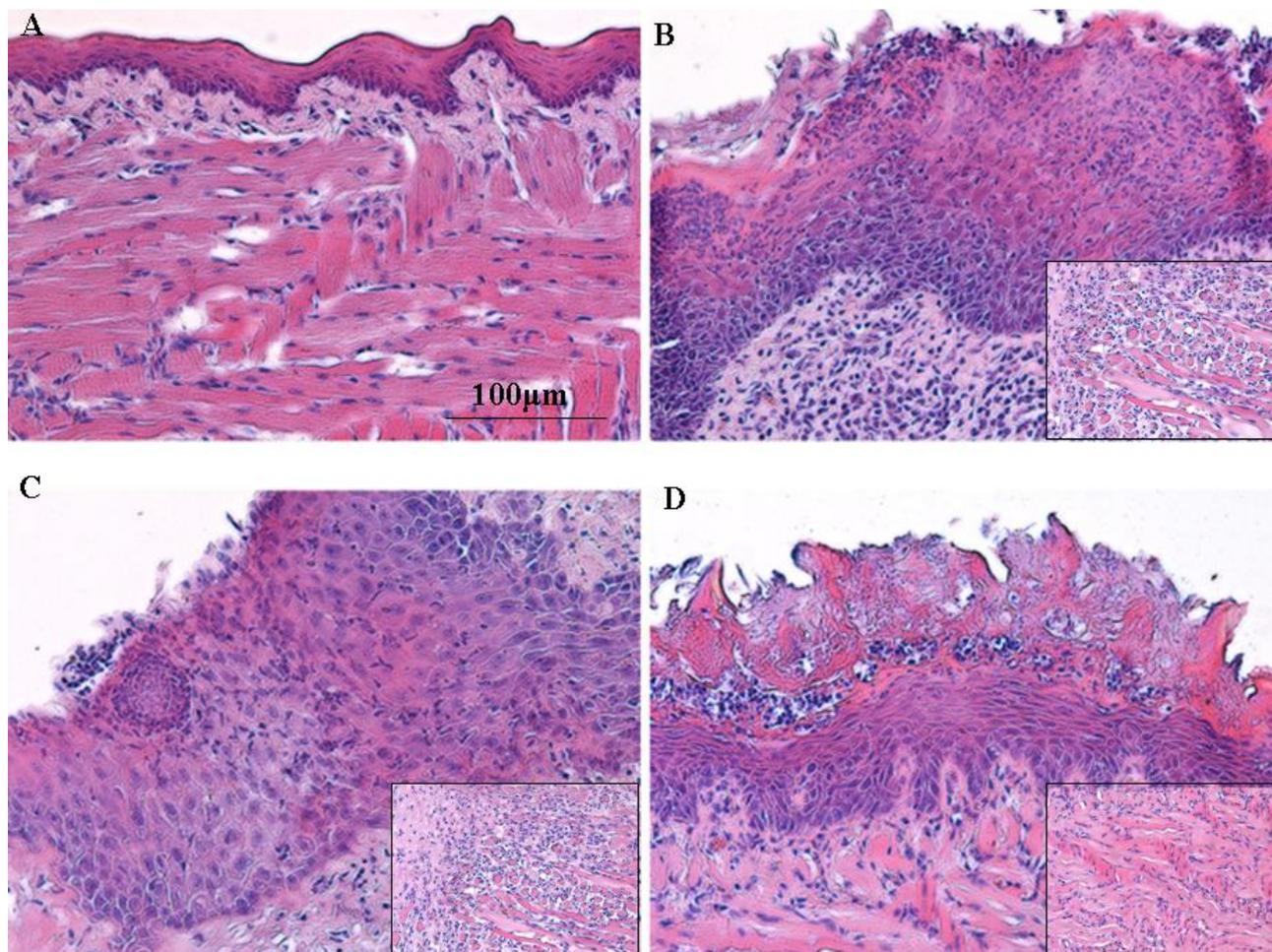


Figura 16: Seções histológicas do dorso da língua de camundongos com candidíase oral. Em (A) língua veículo; em (B) língua infectada com *C. albicans*; (C) língua com raspado e infectada com *C. albicans*; (D) língua de animal tratado com DEX e infectado com *C. albicans*. [Coloração de hematoxilina-eosina (HE), aumento original de 20x]. O insert de cada figura representa o tecido conjuntivo Os grupos foram de 3- 4 animais.

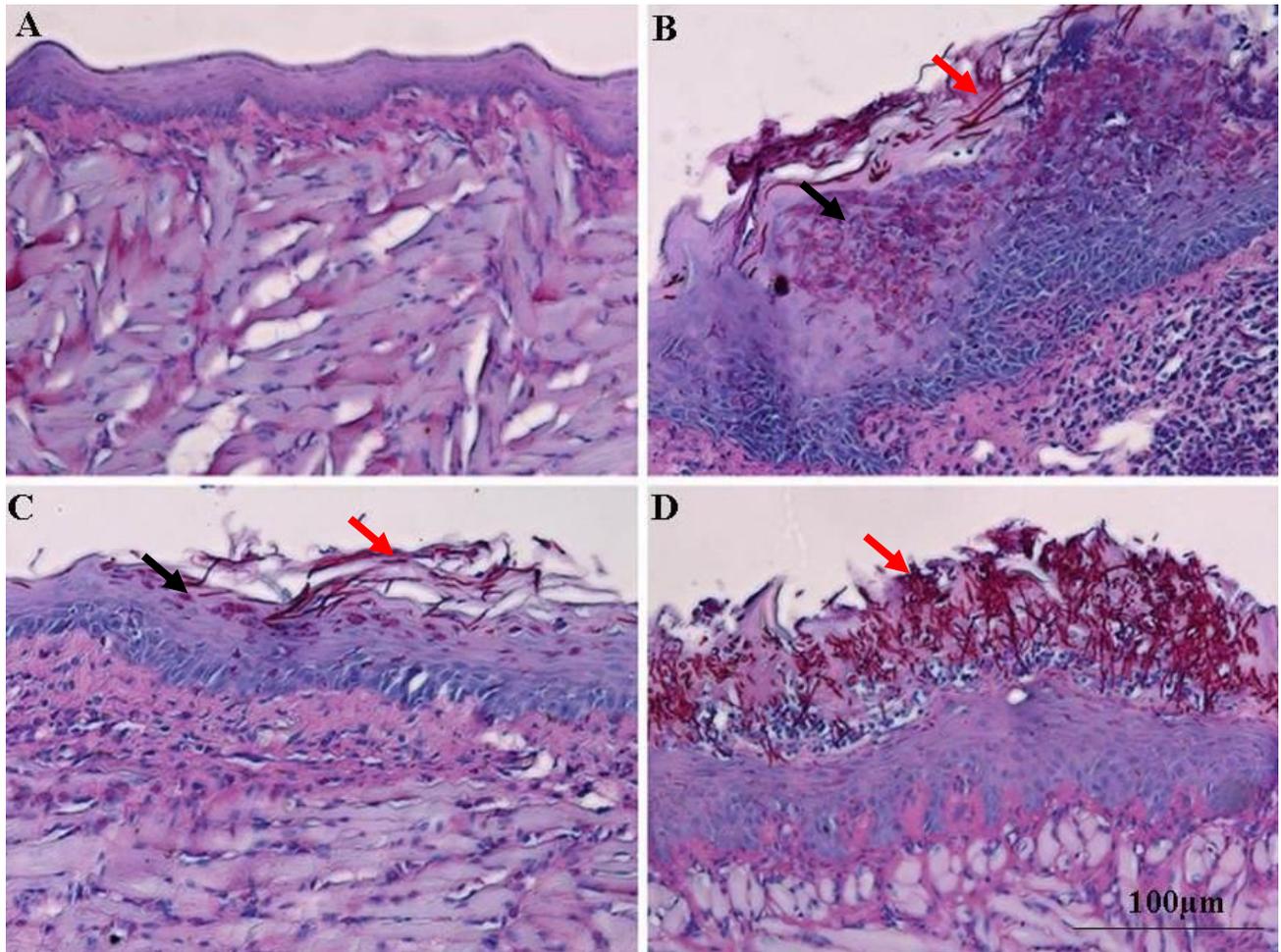


Figura 17: Seções histológicas do dorso da língua de camundongos com candidíase oral. Em (A) língua veículo; em (B) língua infectada com *C. albicans*; (C) língua com raspado e infectada com *C. albicans*; (D) língua de animal tratado com DEX e infectado com *C. albicans*. [Coloração Ácido periódico de Schiff (PAS), aumento original de 20x]. Podemos observar nas figuras B, C, D a presença de hifas (setas vermelhas) e leveduras (setas pretas) de *C. albicans*. Os animais do grupo tratado com DEX apresentou uma filimentação mais exacerbada comparada aos outros grupos. Os grupos foram de 3- 4 animais.

O grupo Raspado + *C. albicans* apresentou o maior score histopatológico quando comparado ao grupo controle NI (veículo). Todos os grupos apresentaram diferença estatística no parâmetro infiltrado inflamatório quando comparado a controle. Os grupos *C. albicans* e Raspado + *C. albicans* apresentaram um infiltrado celular semelhante e maior que o do grupo DEX+ *C. albicans*.

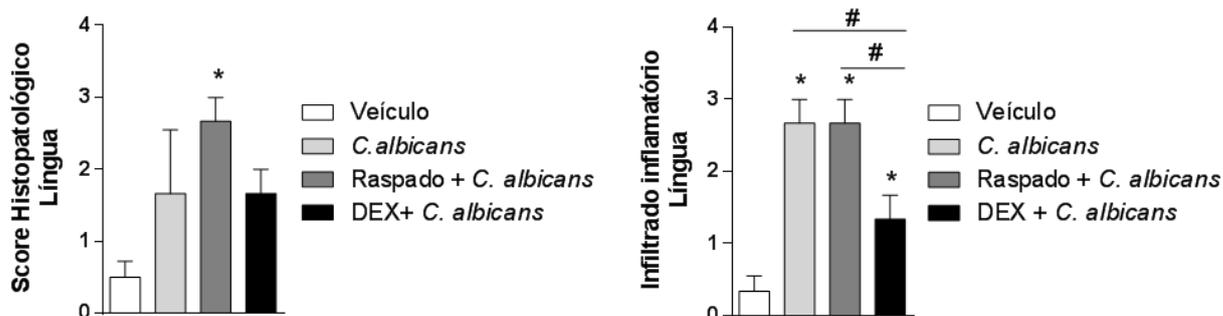


Figura 18: Escore histopatológico e infiltrado inflamatório na língua de camundongos com candidíase oral. Os animais da linhagem Balb/c foram infectados com *C. albicans* e após dois dias de infecção foram eutanasiados para realização das histologias e dos escores correspondentes. Os grupos foram de 3-4 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos infectados.

5.2 Padronização da candidíase oral em modelo de imunossupressão utilizando o quimioterápico 5-FU

5.2.1 Testes de doses de 5-FU em camundongos C57/BL6

As doses de 75 mg/Kg e 150 mg/kg foram utilizadas conforme um trabalho anterior do nosso grupo (Menezes-Garcia, 2014) e comparadas para a avaliação da letalidade e da condição clínica dos animais. A dose de escolha, portanto, foi a de 75 mg/Kg e foi usada para todos os experimentos posteriores. Os animais foram monitorados quanto à morbidade e letalidade por duas semanas. Diante disso, podemos inferir pela figura 19 que a dose de 150 mg/kg sozinha provoca a morte de todos os animais em oito dias e associada a *C. albicans* leva ao óbito com uma semana. Já a dose de 75 mg/kg sozinha ou associada à *C. albicans* apresentou uma letalidade de aproximadamente 80%. A figura 20 ilustra a variação de peso corporal, um dos parâmetros clínicos que utilizamos para avaliar a morbidade das doses utilizadas nesse modelo. A dose de 150 mg/kg induziu uma perda de peso muito maior do que a dose de 75 mg/kg.

O score clínico (figura 21) também foi utilizado para auxiliar na avaliação da dose de 5-FU. O score foi realizado baseado nos parâmetros de perda de peso, consistência das fezes, postura arqueada, piloereção e atividade/inatividade dos animais dentro da caixa. De fato, a letalidade, a perda de peso corporal e o score clínico se corroboraram para que a dose de escolha para a realização dos próximos experimentos fosse a de 75 mg/Kg.

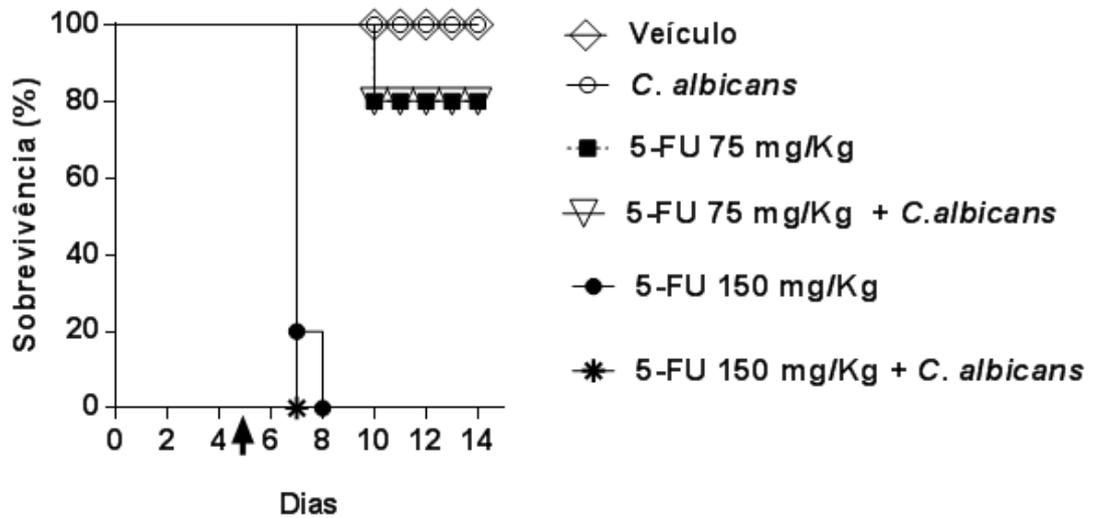


Figura 19: Letalidades induzidas pelas doses de 75 e 150 mg/kg de 5-FU. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU nas doses de 75 de 150 mg/kg por três dias consecutivos. No quinto dia após a primeira dose de 5-FU esses animais foram infectados com 2×10^7 UFC de *C. albicans* e monitorados por duas semanas. A seta do gráfico indica o dia da infecção dos animais. O grupo foi de 4- 5 animais.

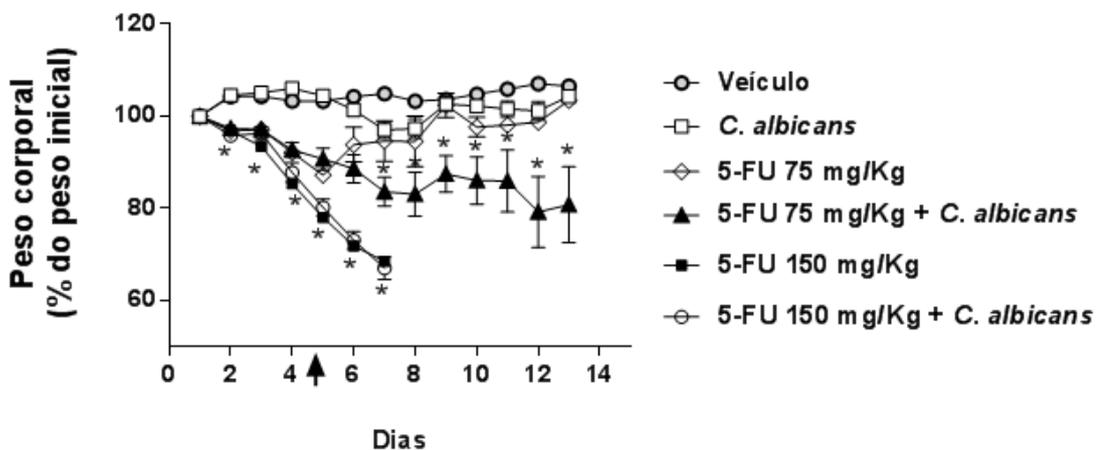


Figura 20: Perda de peso corporal induzida pelas doses de 75 e 150 mg/Kg de 5-FU. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU nas doses de 75 de 150 mg/kg por três dias consecutivos. No quinto dia após a primeira dose de 5-FU esses animais foram infectados com 2×10^7 UFC de *C.*

albicans e monitorados por duas semanas. A seta do gráfico indica o dia da infecção dos animais. N= 8-13 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais veículo NI.

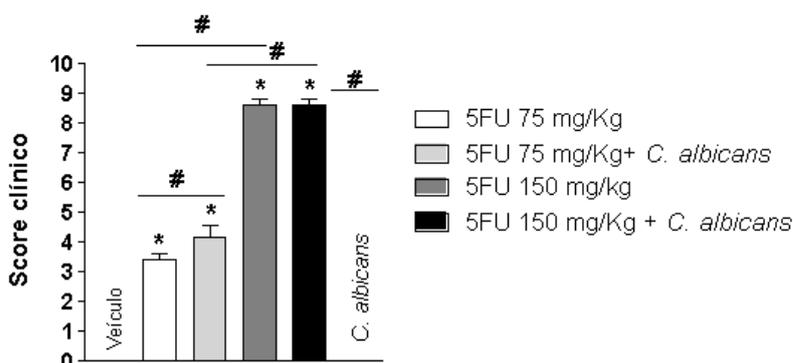


Figura 21: Score clínico referente ao uso de 5-FU nas doses de 75 e 150 mg/Kg. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU nas doses de 75 de 150 mg/kg por três dias consecutivos. No quinto dia após a primeira dose de 5-FU esses animais foram infectados com 2×10^7 UFC de *C. albicans* e foram monitorados por duas semanas. Os parâmetros inclusos no score clínico foram perda de peso, consistência das fezes, postura arqueada, piloereção e atividade/inatividade dentro da caixa. N= 8-13 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando a comparados os outros grupos.

5.2.2 Tempo de infecção por *C. albicans* em animais tratados com 5-FU (75 mg/Kg)

O tempo de infecção nesse modelo de imunossupressão induzido por 5-FU foi definido com base nos resultados anteriores desse trabalho que nos mostram que os animais imunossuprimidos com DEX perdem em torno de 20% do peso corporal durante o curso da infecção de sete dias. Por isso, optamos por realizar a eutanásia com dois dias de infecção. Foi analisado o potencial de 5-FU (75 mg/Kg) em causar leucopenia, a recuperação da carga fúngica, a atividade de MPO, scores e quantificação de citocinas e quimionas por ELISA.

A figura 22, com baixa contagem de leucócitos em animais tratados com 5-FU, e a figura 23 com elevada carga fúngica na língua de animais tratados com 5-FU, mostram os efeitos imunossupressores causados pelo antitumoral.

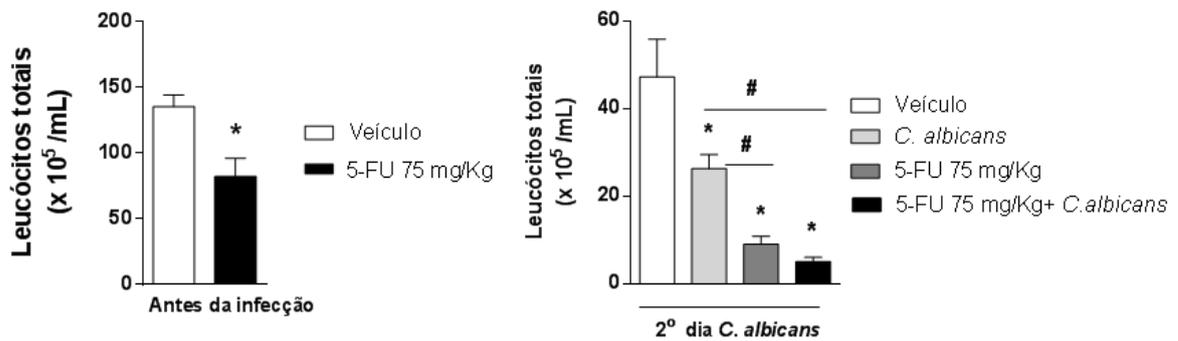


Figura 22: Contagem total de leucócitos do sangue de animais tratados com 5-FU (75 mg/Kg) e infectados com *C. albicans* após 2 dias de infecção. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. N= 4-7 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos.

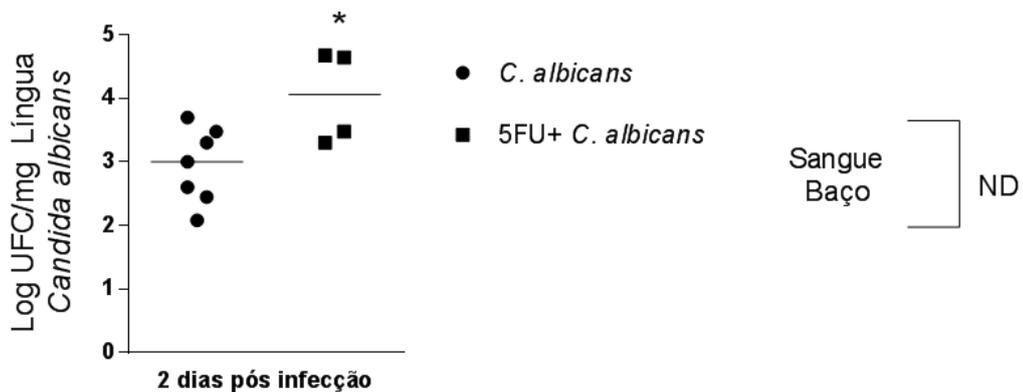


Figura 23: Carga fúngica em animais tratados com 5-FU após dois dias de infecção por *C. albicans*. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU e infectados *C. albicans* no quinto dia posterior a primeira dose do quimioterápico. O grupo 5-FU 75 mg/Kg + *C. albicans* receberam 5-FU e o *C. albicans* receberam injeção de PBS. N= 4-7 animais.* para $p < 0,05$.

Corroborando com os dados de contagem total de leucócitos e carga fúngica, na figura 24, podemos constatar que o MPO na língua não foi detectável e no baço houve um baixo recrutamento de neutrófilos dos animais tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans* quando comparado com os outros grupos.

MPO Língua: ND

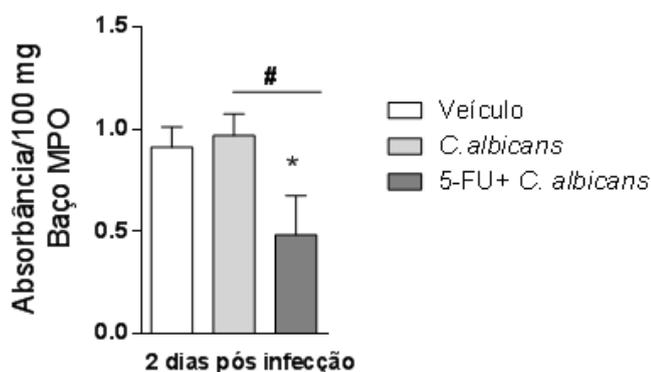


Figura 24: Animais tratados com 5-FU 75 mg/Kg infectados com *C. albicans* têm redução do recrutamento de neutrófilos na língua e no baço no segundo dia de infecção. A migração de neutrófilos foi avaliada pela quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO). Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por 100mg de tecido. N= 4-7 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI (veículo). # $p < 0,05$ quando comparados com os outros grupos.

Para avaliar o perfil de algumas citocinas e quimiocina com dois dias de infecção por *C. albicans*, quantificou-se, no soro e na língua dos animais, TNF, CXCL-1 e CCL-11. Os resultados mostraram uma discreta elevação da quimiocina CCL-11 na língua dos animais tratados e infectados e um aumento de CXCL-1 tanto na língua como no soro desses animais. Enquanto TNF, por ser uma citocina de resposta inicial, não foi encontrada em níveis elevados com dois dias de infecção (figura 25).

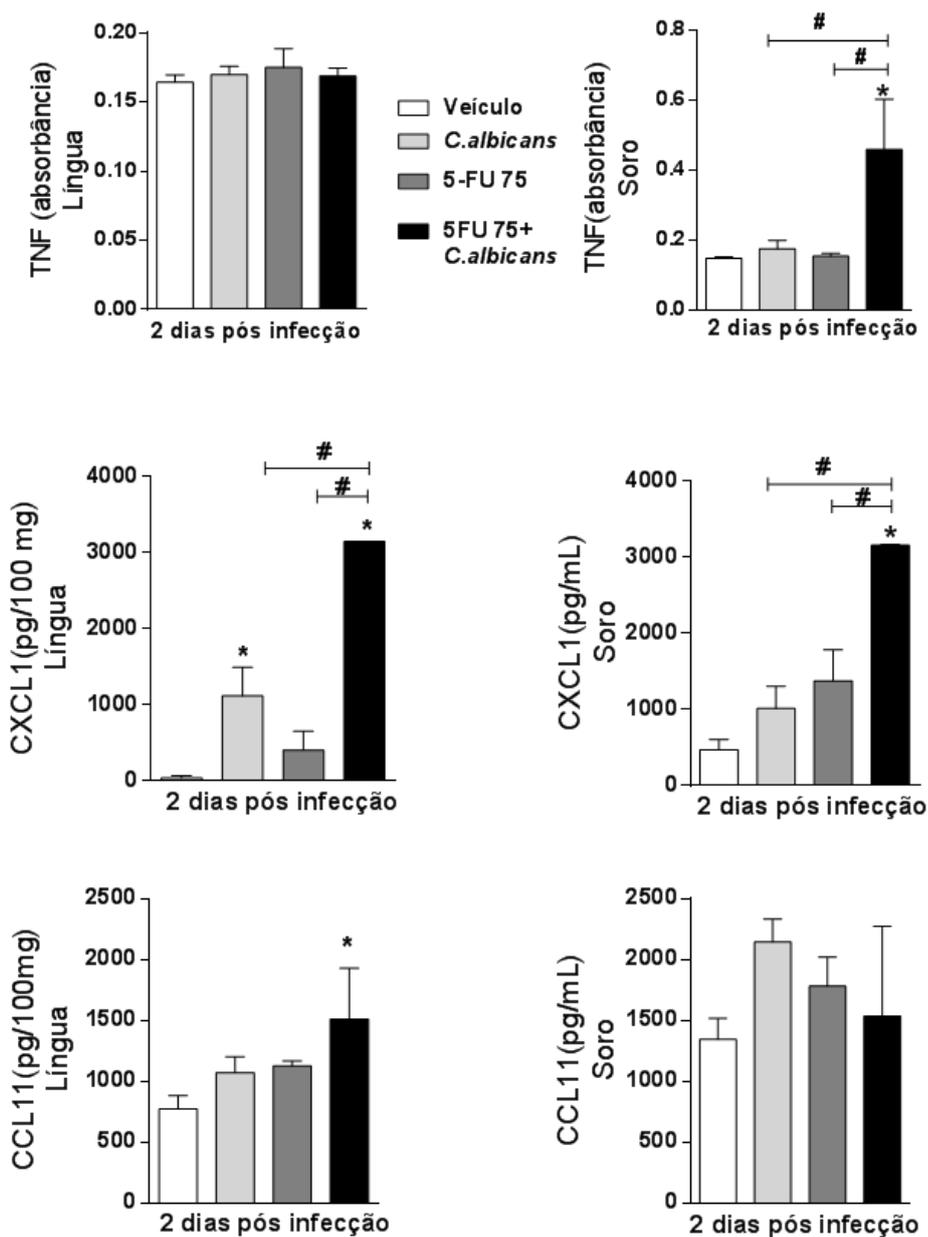


Figura 25: Níveis de citocina e quimiocinas em animais tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans* após dois dias de infecção. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Os mediadores inflamatórios TNF, CXCL-1 e CCL-11 foram quantificados por ELISA na língua e soro dos animais. Os resultados são apresentados como pg/100mg de tecido e por mL de soro. N= 4-7 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos.

5.2.3 Efeito do antagonista do receptor CXCR2 na candidíase oral em animais tratados com 5-FU

Como observamos um aumento significativo da quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos, CXCL-1, tratamos os animais com um antagonista do receptor dessa quimioquina, CXCR2, denominado DF 2156. Esse antagonista foi utilizado na dose de 10 mg/Kg, por via subcutânea. O DF 2156A é um inibidor não competitivo potente e seletivo dos receptores CXCR1 e CXCR2 (Bertini *et al.*, 2012). A contagem total de leucócitos no sangue demonstra uma menor quantidade dessas células no grupo tratado com DF 2156A, no entanto não observamos aumento da carga fúngica (figura 26).

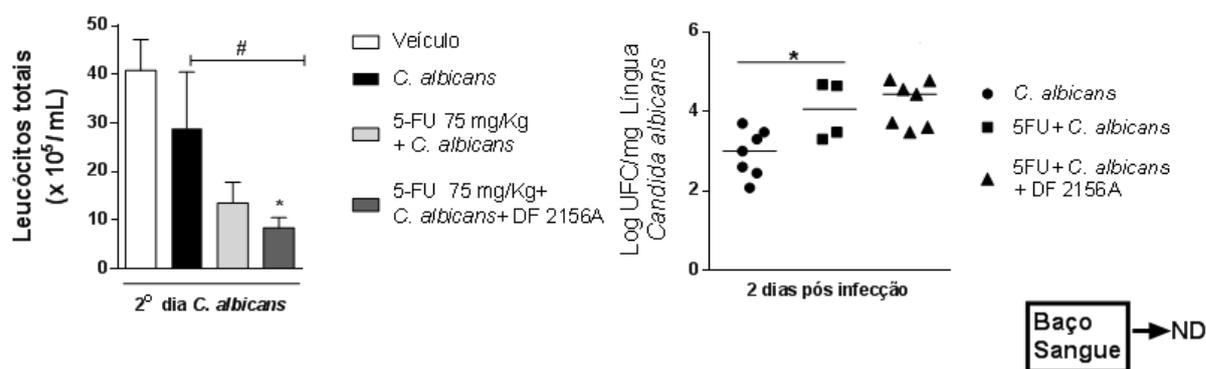


Figura 26: O tratamento com DF 2156A não altera a depuração fúngica. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans* no quinto dia posterior a primeira dose do quimioterápico. Um grupo de animais recebeu DF 2156A por via subcutânea, de 12h em 12h, começando 12h antes da infecção até 12h antes da eutanásia. N= 4-7 animais.* para $p < 0,05$.

Após a quantificação dos níveis da enzima MPO, demonstramos que em animais tratados com DF 2156A teve uma brusca redução no recrutamento de neutrófilos no baço e quantidades de MPO não detectáveis na língua quando comparamos com o veículo e com os outros grupos (figura 27). No entanto, a redução do recrutamento de neutrófilos não refletiu em aumento da carga fúngica nos tecidos dos animais tratados com o antagonista de CXCR2.

MPO Língua: ND

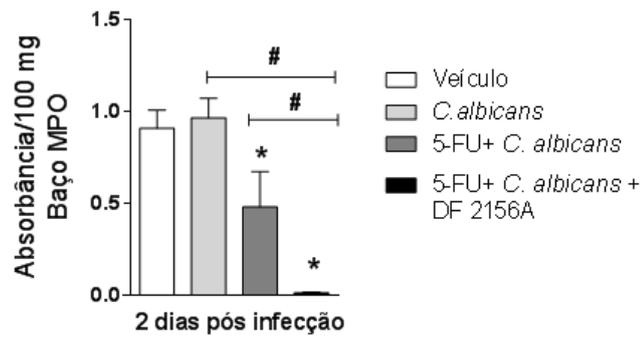


Figura 27: O recrutamento de neutrófilos, em animais tratados com DF 2156A, foi significativamente reduzido no baço e não detectável na língua. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Um grupo de animais recebeu DF 2156A por via subcutânea, de 12h em 12h, começando 12h antes da infecção até 12h antes da eutanásia. A migração de neutrófilos foi avaliada pela quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) na língua e no baço. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por 100mg de tecido. N= 4-7 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI (veículo). # $p < 0,05$ quando comparados com os outros grupos.

Como parâmetro clínico, os animais foram pesados todos os dias durante todo experimento. Como resultado podemos identificar que o tratamento com DF 2156A não altera a perda de peso corporal induzida por 5-FU e *C. albicans*

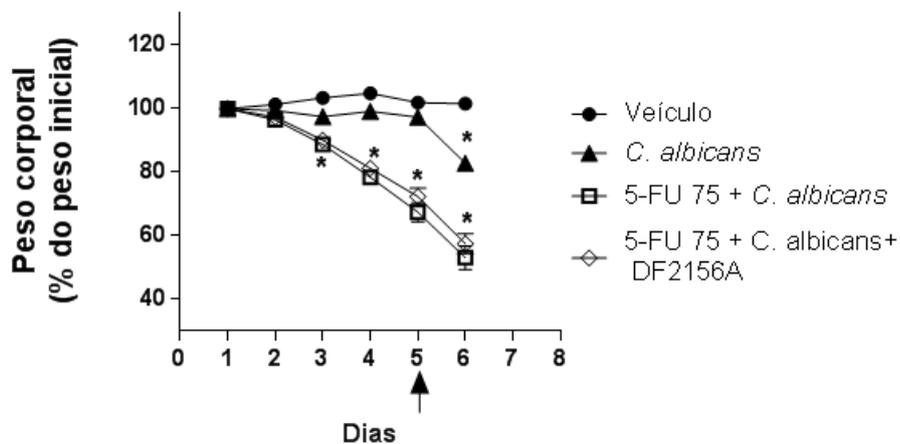


Figura 28: O tratamento com DF 2156A não altera, significativamente, a perda de peso corporal induzida por 5-FU e pela infecção por *C. albicans*. Animais da linhagem C57/BL6 foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Um grupo de animais recebeu DF 2156A N= 6 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle.

6. Modelo de candidíase oral associada ao quimioterápico 5-FU 75 mg/Kg em animais BALB/c WT e BALB/c deficientes em eosinófilos ($\Delta db/Gata1^{-/-}$)

6.1 Alterações da resposta imune induzidas pela infecção oral por *C. albicans* em animais Balb/c, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU 75 mg/Kg.

Após dois dias de infecção por *C. albicans* os animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ foram eutanasiados e o sangue foi coletado para realização da contagem total de leucócitos. De acordo com a figura 29, os animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ apresentaram perfis semelhantes de leucopenia.

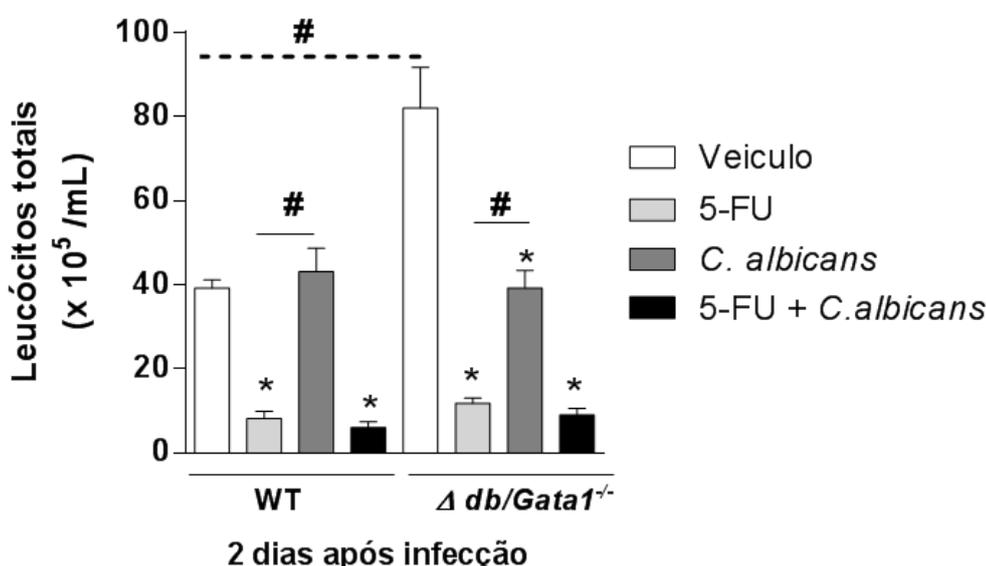


Figura 29: Contagem total de leucócitos em animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Animais da linhagem Balb/c, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, foram tratados com 5-FU, via i.p, por três dias consecutivos, uma vez/dia e infectados com 2×10^7 UFC de *C. albicans* no quinto dia posterior a primeira dose do quimioterápico. N= 6-9 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados com os outros grupos.

O score clínico relaciona as características clínicas da doença à gravidade e ao prognóstico. O tratamento com 5-FU associado à candidíase oral foi avaliado com base na perda de peso, na consistência das fezes, postura arqueada, piloereção e comportamento de

atividade ou inatividade dos animais dentro da caixa. Nossos resultados mostraram que os animais deficientes em eosinófilos ($\Delta db/Gata1^{-/-}$), apesar de apresentarem uma leucopenia semelhante aos animais WT, apresentaram melhor condição clínica. De acordo com a figura 30, os animais do grupo 5-FU WT apresentaram um score clínico significativamente maior do que os animais 5-FU $\Delta db/Gata1^{-/-}$. Os animais tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans* WT também exibiram sinais clínicos estatisticamente mais intensos quando comparados aos animais do grupo 5-FU + *C. albicans* $\Delta db/Gata1^{-/-}$.

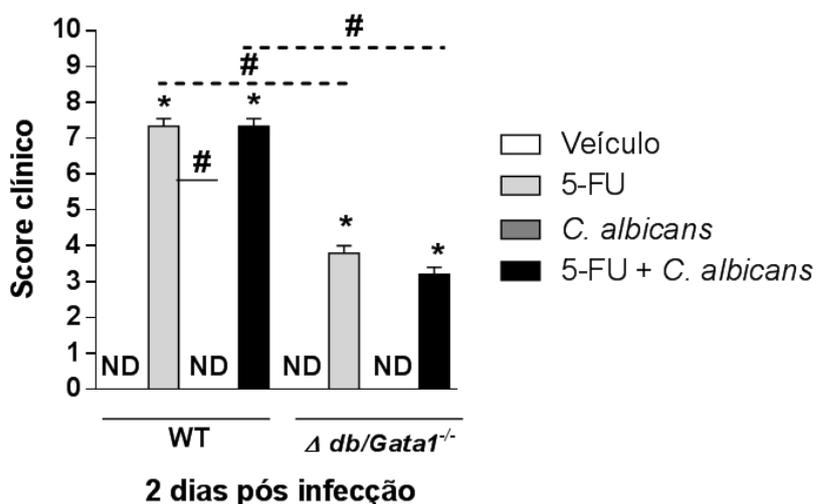


Figura 30: Score clínico de animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Animais da linhagem Balb/c foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Os parâmetros inclusos no score clínico foram perda de peso, consistência das fezes, postura arqueada, piloereção e atividade dentro da caixa. N= 6-9 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais veículo NI. # $p < 0,05$ quando a comparados os outros grupos.

Os animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ foram avaliados e comparados quanto à carga fúngica e o que detectamos foi uma discreta redução da quantidade de *C. albicans* na língua dos animais do grupo *C. albicans* $\Delta db/Gata1^{-/-}$ quando comparado ao grupo *C. albicans* WT. Ao compararmos os animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ dos grupos 5-FU + *C. albicans* não apresentaram diferença na carga fúngica.

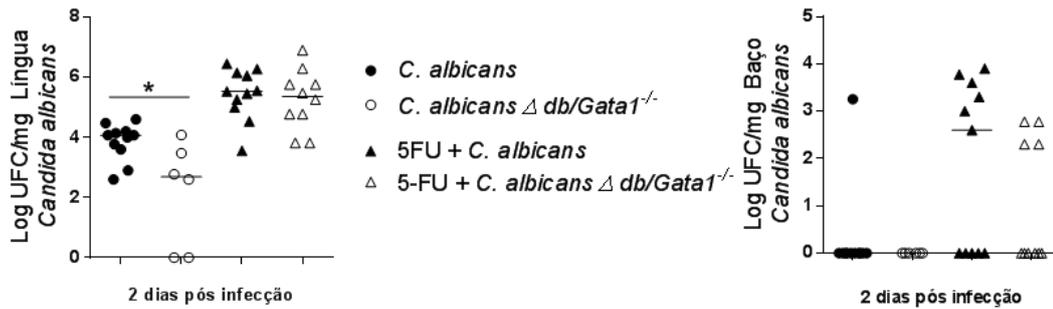


Figura 31: A carga fúngica dos animais $\Delta db/Gata1^{-/-}$ infectados com *C. albicans* é menor que a dos WT *C. albicans*. Animais da linhagem Balb/c, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ foram tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. A eutanásia foi realizada no segundo dia de infecção para avaliação da carga fúngica da língua e do baço. N= 6-11 animais. * para $p < 0,05$

O recrutamento de neutrófilos nos animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ foi avaliado por meio da quantidade de MPO presente nos tecidos da língua e do baço. Na língua e no baço não houve diferença estatística no recrutamento de neutrófilos entre os grupos WT e os $\Delta db/Gata1^{-/-}$. O recrutamento de macrófagos nos animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ foi avaliado por meio da quantidade de NAG presente nos tecidos da língua e do baço. Nossos resultados mostram que houve maior quantidade de NAG na língua de animais *C. albicans* $\Delta db/Gata1^{-/-}$ em relação ao grupo WT e no baço não houve diferença.

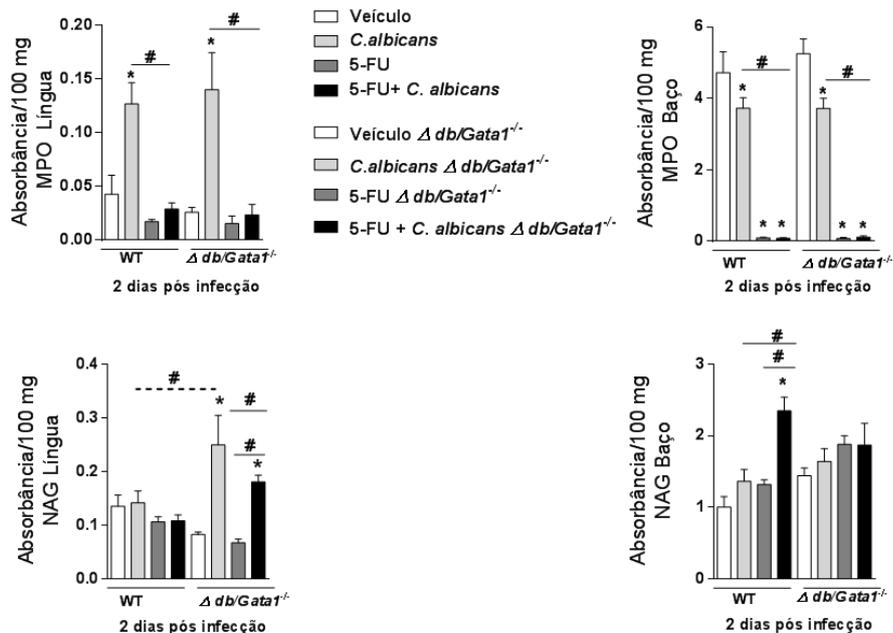
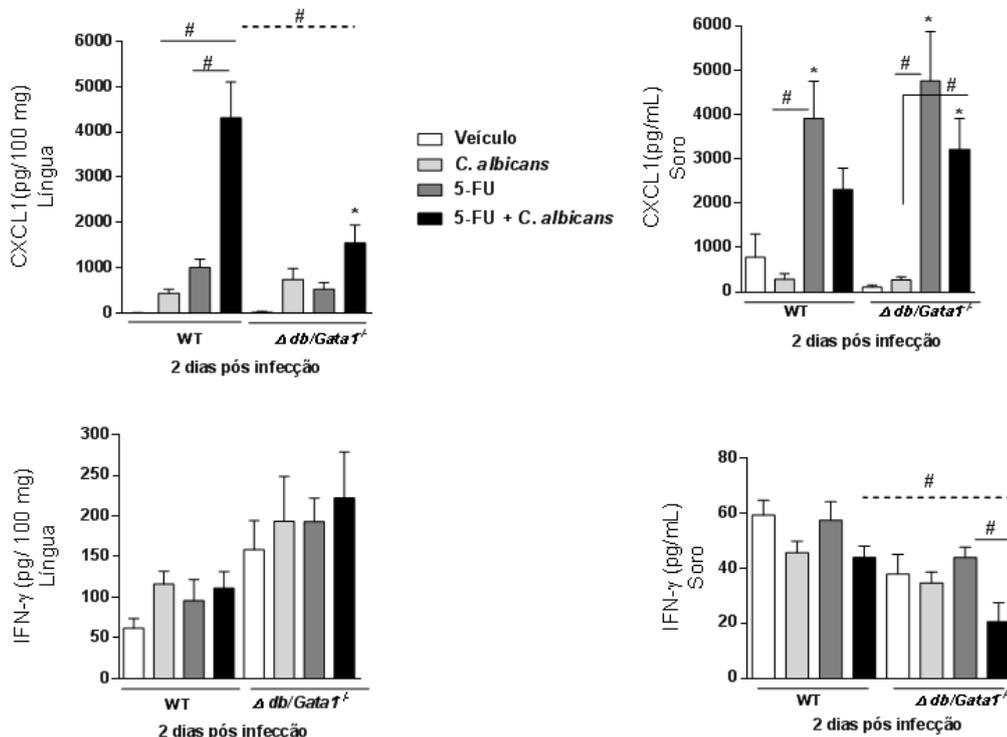


Figura 32: Recrutamento de neutrófilos e macrófagos em animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com

5-FU e infectados com *C. albicans*. A migração de neutrófilos foi avaliada pela quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) e a de macrófagos foi avaliada pela quantificação dos níveis da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) na língua e no baço. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos e macrófagos por 100mg de tecido. N= 6-9 animais * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI (veículo). # $p < 0,05$ quando comparados com os outros grupos.

Para a determinação do perfil de algumas citocinas e quimiocinas na candidíase oral, a língua e o soro de animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, foram utilizados para o ensaio de ELISA. A figura 33 demonstra que ocorreu um aumento significativo de CXCL-1 na língua dos animais WT do grupo 5-FU+*C. albicans* em relação ao grupo 5FU+ *C. albicans* $\Delta db/Gata1^{-/-}$. Além disso, a quantidade de IFN- γ também foi maior no soro de animais do grupo 5FU + *C. albicans* WT. Já a IL-1 β se elevou na língua dos animais do grupo *C. albicans* WT quando comparado ao grupo *C. albicans* $\Delta db/Gata1^{-/-}$. A citocina IL-17 foi encontrada em maior quantidade na língua dos animais do grupo tratado com 5-FU WT quando comparado ao grupo 5-FU $\Delta db/Gata1^{-/-}$. No entanto, TNF não apresentou diferença entre os grupos. De maneira geral, tais resultados nos mostram que a resposta de mediadores é mais exacerbada em animais WT em relação aos $\Delta db/Gata1^{-/-}$.



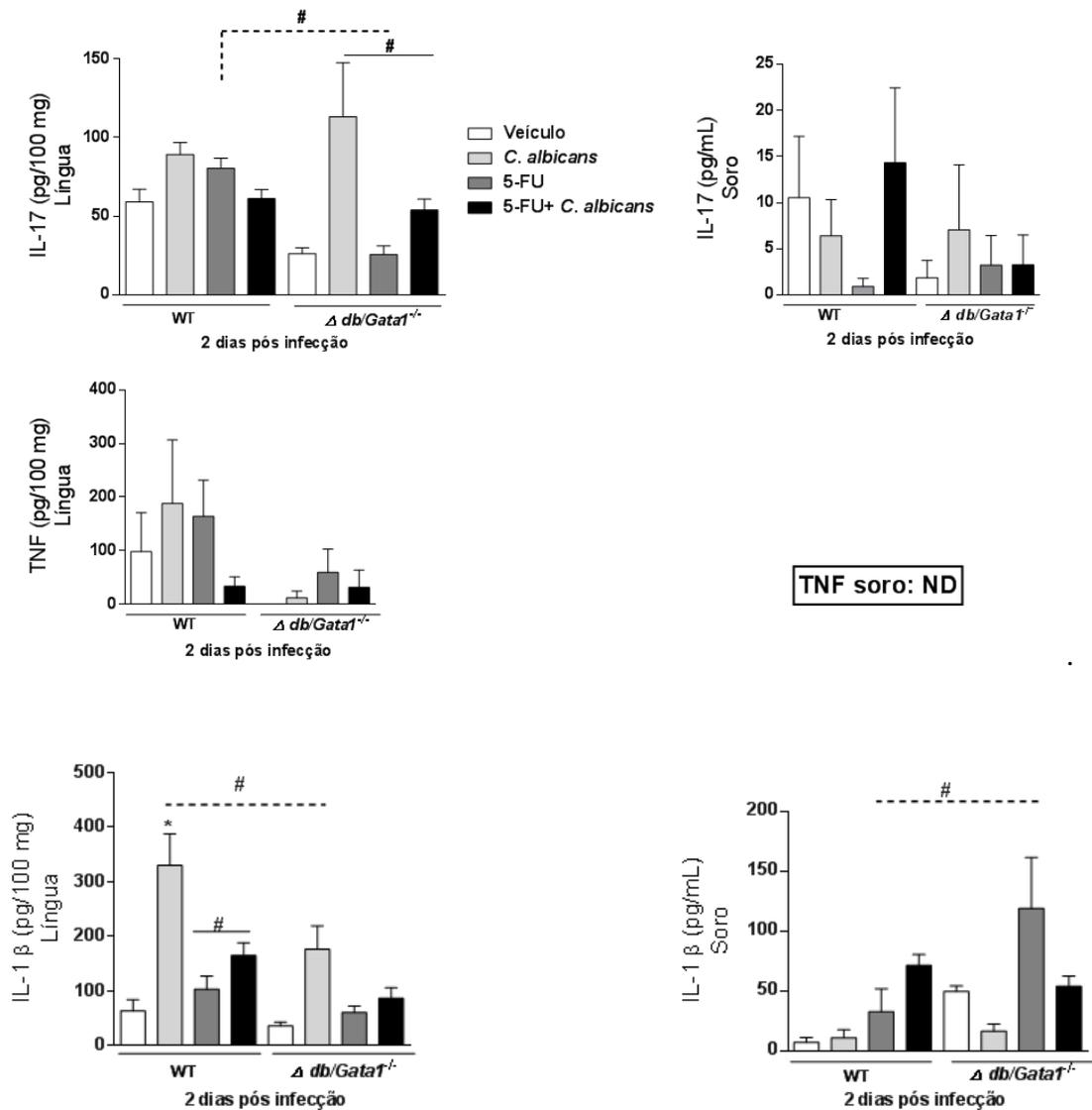


Figura 33: Níveis de citocinas e quimiocinas em animais, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Os mediadores inflamatórios TNF, CXCL-1, IFN- γ , IL-1 β e IL-17 foram quantificados por ELISA na língua e soro dos animais. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido e por mL de soro. N= 5-6 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando a comparados os outros grupos.

6.2 Alterações histopatológicas na candidíase oral em animais Balb/c, WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$, tratados com 5-FU 75 mg/Kg.

Na figura 34 estão representadas línguas de animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Na seção histológica 34 A está sendo mostrada a língua de um animal WT tratado com 5-FU a 75 mg/Kg e infectado com *C. albicans*, em que podemos constatar a perda completa do epitélio, com exposição do conjuntivo (ulceração), necrose epitelial e necrose no conjuntivo, com presença de um infiltrado discreto no tecido conjuntivo (coloração de HE). A figura 34 C está representando a língua de um animal WT tratado com 5-FU e infectado com *C. albicans*, porém com coloração de PAS em que podemos observar uma grande quantidade de hifas de *C. albicans* invadindo o tecido epitelial e o conjuntivo. As amostras de língua de camundongos deficientes em eosinófilos (figura 34 B e D) apresentaram alterações histopatológicas mais discretas que as de camundongos WT, embora tenhamos observado exocitose, em algumas amostras de língua de animais $\Delta db/Gata1^{-/-}$, hiperemia vascular e um leve infiltrado inflamatório difuso no conjuntivo (figura 34 B). A quantidade de fungos nas amostras de língua de camundongos $\Delta db/Gata1^{-/-}$ (figura 34 D) foi visivelmente menor, portanto, ao se comparar animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ podemos inferir que a maioria dos camundongos deficientes em eosinófilos apresentam menor lesão tecidual e menor carga fúngica.

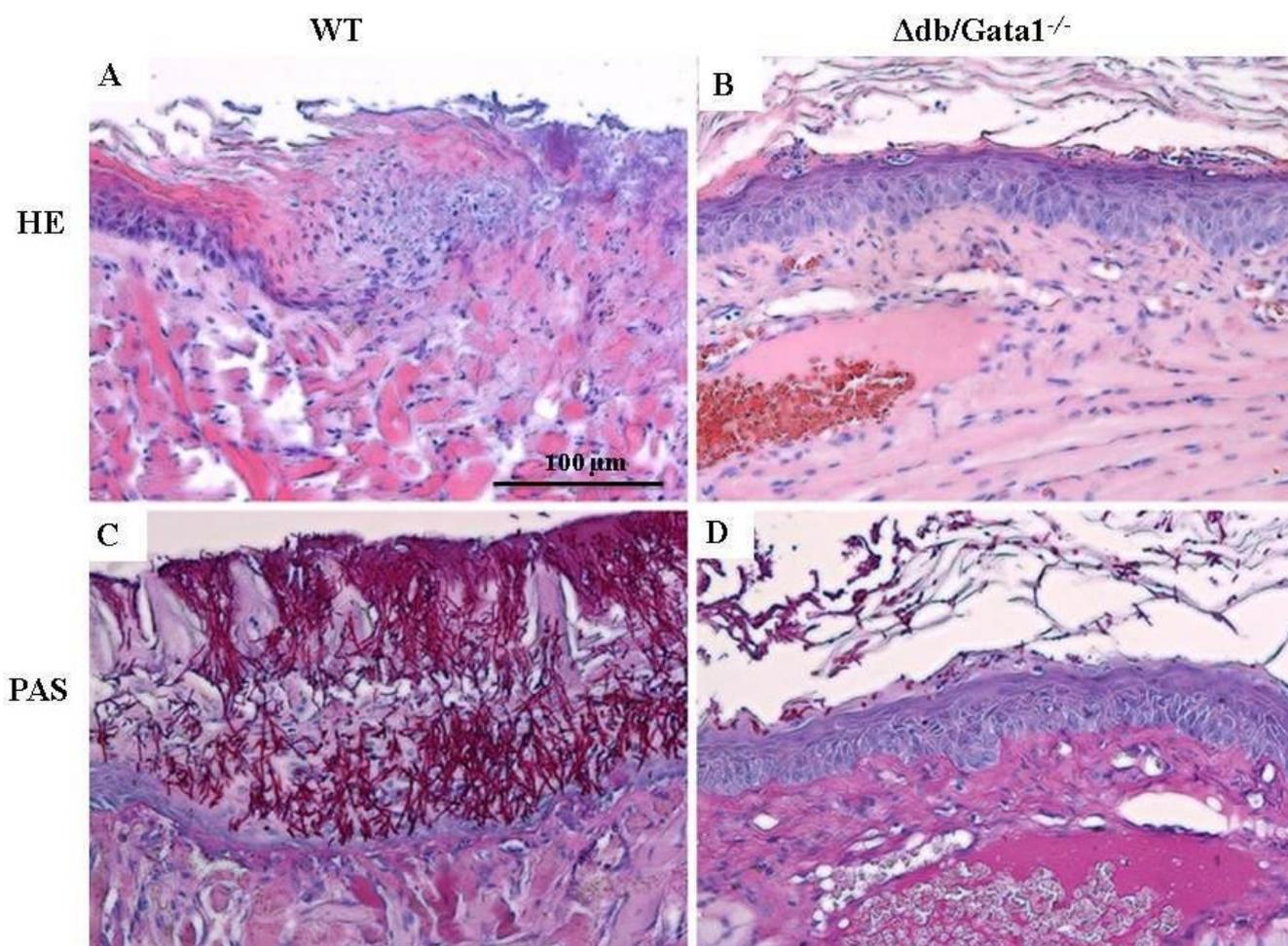


Figura 34: Seções histológicas da língua de animais WT e $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Em (A) e (C) animal WT tratado com 5-FU e infectado com *C. albicans*; Em (B) e (D) animal $\Delta db/Gata1^{-/-}$ tratado com 5-FU e infectado com *C. albicans* (HE e PAS, aumento original de 20x).

A figura 35 representa o score histopatológico e o infiltrado inflamatório da língua desses animais da figura 34. O maior score ocorreu no grupo 5-FU+ *C. albicans* WT e foi construído com base nos parâmetros de exocitose, erosão epitelial, hiperemia, necrose, ulceração e hemorragia. O maior infiltrado inflamatório foi encontrado na língua de animais WT não tratados com 5-FU, mas infectados com *C. albicans*. Segundo os dados de score não houve diferença estatística entre os animais WT e os $\Delta db/Gata1^{-/-}$.

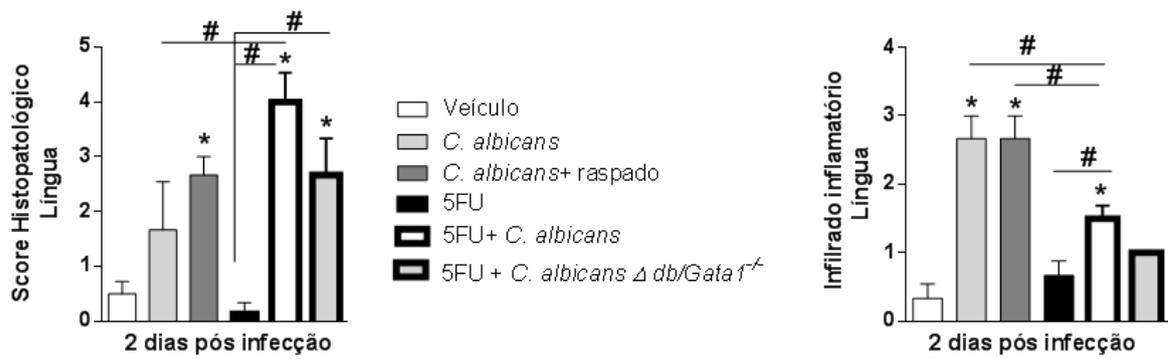


Figura 35: Escore histopatológico e infiltrado inflamatório da língua de animais, WT e Δ db/Gata1^{-/-}, tratados com 5-FU e infectados com *C. albicans*. Os animais da linhagem Balb/c, WT e Δ db/Gata1^{-/-} foram tratados com 5-FU, infectados e após 2 dias de infecção foram eutanasiados para realização das histologias e dos escores correspondentes. Os grupos foram de 4 animais.* para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI. # $p < 0,05$ quando comparados com grupos infectados.

7. DISCUSSÃO

As infecções fúngicas são um crescente problema de saúde pública e uma causa cada vez mais importante de mortalidade humana, com as espécies de *Candida*, especialmente *C. albicans*, estando entre as infecções oportunistas mais prevalentes. Diversos estudos salientam que o risco de candidíase é aumentado em pacientes com neoplasias subjacentes e em quimioterapia, em pacientes submetidos a transplante de células-troncos hematopoiéticas ou de órgãos sólidos e com doenças imunossupressoras, em uso de antibióticos ou corticosteroides de amplo espectro (Sharma *et al.*, 2019). Modelos animais permitem um estudo mecanístico detalhado de problemas clínicos que podem fornecer informações aplicáveis aos seres humanos. A escolha de um modelo que produz fisiopatologia semelhante é fundamental para garantir a relevância da condição clínica. Diante disso, esse trabalho buscou padronizar modelos de imunossupressão associados à candidíase oral como estratégia para fornecer subsídios para o estudo do papel dos eosinófilos nesse contexto clínico.

Baseado no modelo de imunossupressão de Lima, *et al.*, 2016 que utiliza dexametasona, padronizamos nosso modelo de candidíase oral. Os resultados dessa padronização mostraram que semelhante a humanos imunocompetentes, os camundongos veículos WT, da linhagem C57BL/6, infectados com *C. albicans* são quase completamente resistentes à infecção, com uma carga fúngica menor do que a dos animais WT infectados e tratados com DEX. Além disso, como parâmetro clínico, avaliamos a perda de peso corporal, demonstrando que o tratamento com DEX associado à infecção por *C. albicans* induz uma perda de peso significativamente maior quando comparado ao grupo infectado que recebeu veículo. Esses dados são consistentes com os de Conti *et al.*, 2009 que demonstraram que os animais do grupo DEX tiveram uma perda de peso corporal considerável e uma maior recuperação de *C. albicans* na língua quando comparado com os animais infectados que receberam veículo.

O modelo de imunossupressão por DEX também foi realizado em animais da linhagem Balb/c. Muitos estudos já relataram que até o momento, nenhum modelo murino de candidíase mucosa conseguiu mimetizar uma candidíase bem estabelecida sem causar alguma predisposição do animal, seja por oclusão oral, imunossupressão, alteração cirúrgica ou eliminação da microbiota competidora, e muitas vezes até essas condições associadas (Samaranayake & Samaranayake, 2001). Sendo assim, no modelo de Balb/c, além do tratamento com DEX, incluímos no protocolo uma raspagem/escoriação sublingual anterior à

infecção dos animais para avaliar como as lesões na mucosa podem alterar o perfil de infecção por *C. albicans*. Na literatura existem dados que destacam as diferenças na resposta imunológica entre camundongos BALB/c e C57BL/6 o que pode estar associado a diferente padrão de resposta de linfócito T entre as linhagens: enquanto camundongos BALB/c apresentam um perfil de resposta Th2 os camundongos C57BL/6 apresentam uma resposta com perfil Th1 (Busche *et al.*, 2014).

Nossas análises histopatológicas da língua foram semelhantes com o trabalho de Conti e colaboradores, pois também observamos que na língua de animais infectados e infectados/escoriados houve filamentação de *C. albicans* e invasão da camada epitelial da língua, destruindo a arquitetura geral do epitélio com extensa hiperplasia do tecido epitelial e do conjuntivo que é indicativo de reparo tecidual em andamento. Foi observado um infiltrado inflamatório moderado com predominância de células polimorfonucleares em animais não tratados com DEX. Em contrapartida, o infiltrado no tecido de animais que receberam DEX foi substancialmente reduzido em comparação com os camundongos não imunossuprimidos, o que reflete menor dano tecidual, embora maior carga fúngica. Os animais tratados apresentam menor número de células no tecido devido ao processo de imunossupressão induzido por DEX, caracterizado por leucopenia (Itai *et al.*, 2017). Na língua dos animais estavam presentes tanto leveduras quanto hifas de *C. albicans*, mostrando que este modelo mimetiza as principais características clínicas da candidíase oral humana (Kamai *et al.*, 2001). Portanto, esses dados nos permite inferir que somente a lesão causada pela escoriação não associada ao tratamento por DEX não aumenta a suscetibilidade dos camundongos a uma candidíase oral mais grave, visto que os animais não apresentam leucopenia e conseguem resolver o processo inflamatório.

Um trabalho do nosso grupo já havia realizado um experimento de dose-resposta para determinar a dose de 5-fluorouracil (5-FU) necessária para induzir mucosite intestinal e imunossupressão (Menezes-Garcia, 2014). A mucosite representa um prognóstico negativo para os pacientes em tratamento antineoplásico podendo acarretar interrupção e/ou redução da dose do quimioterápico ou radioterápico (Sonis, 2004). Vários estudos têm demonstrado que a quimioterapia com 5-FU está associada ao desenvolvimento de mucosite, tanto em humanos quanto em camundongos (Menezes-Garcia, 2014). Em nosso modelo experimental, demonstramos que há uma significativa leucopenia nos animais tratados com o 5-FU na dose de 75 mg/kg, confirmando os dados da literatura (Cool *et al.*, 2005). Existem relatos clínicos

de ocorrência de fungemia associada à quimioterapia utilizando cisplatina (CDDP) e 5-FU (Tanabe *et al.*, 1991). No entanto, o fungo não existe no camundongo como parte de sua microbiota, portanto, mesmo se ele aderir será eliminado pela resposta imune do hospedeiro (McMillan *et al.*, 1992). Como tal, não adere por muito tempo e a invasão das hifas só é conhecida por atingir a camada superficial do epitélio (Samaranayake & Samaranayake, 2001). Diante dessas informações, no presente estudo, conseguimos desenvolver um modelo murino de candidíase oral através da administração da droga antineoplásica imunossupressora 5-FU. No entanto, sabemos que o 5-FU pode ter efeitos antifúngicos, visto que a flucitosina, um antifúngico, é um dos seus pró-fármacos. Por esta razão, existe uma preocupação sobre o impacto do efeito antifúngico quando se administra 5-FU como droga anticâncer para desenvolver candidíase oral em modelos murinos. A concentração inibitória mínima (CIM50) de 5-FU em *C. albicans in vitro* é de 100 µg/ mL (Routh *et al.*, 2013). Quando foram administrados 200 mg/kg de 5-FU, por via i.p em camundongos, a concentração no sangue foi de apenas 0,39µg/ml (Chadwick & Rogers *et al.*, 1972). Portanto, previmos que a concentração da droga de 75 mg/Kg que administramos, esperando efeitos imunossupressores/antitumorais não teria efeito antifúngico. Além disso, as análises histopatológicas da língua nos mostraram maior lesão e maior presença de fungo em animais tratados com 5-FU. Portanto, acreditamos que não houve efeito antifúngico de 5-FU e isso não impactou o modelo experimental.

A maioria dos modelos que induzem mucosite oral seguem o método de Sonis *et al.*, sem estimulação física, mas com estimulação química usando ácido acético em uma concentração de 50% para destruir a camada basal do epitélio. No entanto, em nosso trabalho a utilização de ácido acético provocou asfixia e levou os animais a óbito e por isso optamos por utilizar a estimulação física por escoriação sublingual com bisturi. Com a coloração de HE, observamos a destruição causada pela escoriação foi apenas na região ventral e não do dorso da língua e que, de fato, conseguimos reproduzir a mucosite oral clínica por esse método.

Há evidências que sugerem que mediadores pró-inflamatórios, desempenham um papel importante na patogênese da mucosite (Logan *et al.*, 2007) e na infecção por *C. albicans* (Filler *et al.*, 2005). Em trabalhos do nosso grupo foi observado aumento da concentração de CXCL1 e IL-1β, no intestino delgado, mediadores conhecidos envolvidos na patogênese da mucosite (Arifa *et al.*, 2014 e Menezes-Garcia, 2014). De fato,

foi observado aumento discreto da concentração de TNF no soro dos animais do grupo 5-FU+ *C. albicans* após dois dias de infecção e aumento da concentração de CXCL-1 na língua e no soro dos animais após dois e sete dias de infecção (dados não mostrados). O TNF desempenha um papel importante na resposta do hospedeiro contra infecções por *C. albicans* por estimular a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão de leucócitos, o que leva ao recrutamento de leucócitos polimorfonucleares e aumento da fagocitose e morte de fungos por essas células (Cannom *et al.*, 2012). Além de TNF e CXCL-1, houve elevação da quimiocina CCL11 na língua dos animais do grupo 5-FU+ *C. albicans* após dois dias de infecção. As quimiocinas CXCL-1 e CCL-11 estão relacionadas ao recrutamento de neutrófilos e de eosinófilos, respectivamente (Johnston *et al.*, 2004).

Mesmo que a neutropenia sangüínea possa comprometer a resposta imune do hospedeiro em momentos posteriores, o acúmulo precoce de neutrófilos na mucosa é um evento chave na condução de danos e doenças teciduais durante a quimioterapia do câncer (Guabiraba *et al.*, 2014). Um estudo utilizando o antineoplásico Irinotecano (CPT-11) como indutor de mucosite demonstrou que os neutrófilos desempenham um papel fundamental na patogênese da mucosite através da liberação de IL-33 (Guabiraba *et al.*, 2014). Como estratégia depletaram os neutrófilos e bloquearam o receptor CXCR2 com DF2156A, que resultou na redução significativa da mucosite intestinal induzida por CPT-11. Esses resultados indicam o papel crítico da migração de neutrófilos na mucosite induzida por CPT-11. (Guabiraba *et al.*, 2014). Portanto, com o objetivo de investigar o papel dos neutrófilos na candidíase oral associada ao tratamento com 5-FU, administramos nos camundongos C57BL/6 um antagonista seletivo dos receptores CXCR1/2, DF2156A (Bertini *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com DF2156A, por via subcutânea, não refletiu em alteração na carga fúngica tecidual dos animais quando comparamos com os animais que não receberam DF2156A. No entanto, a medida de MPO no baço de animais que receberam DF2156A apresentou uma redução drasticamente significativa em relação aos outros grupos. Além disso, avaliamos como parâmetro clínico a perda de peso corporal e não observamos uma melhora clínica significativa nesse aspecto. Em um estudo que avaliou o papel dos neutrófilos na artrite experimental aguda, também utilizou o antagonista DF2156A e concluíram que não houve melhora nas alterações metabólicas sistêmicas observadas em camundongos com artrite induzida por antígeno (AIA) (Oliveira *et al.*, 2016).

Um outro trabalho realizado em nosso grupo utilizou animais $\Delta db/Gata1^{-/-}$ para avaliar o papel de eosinófilos na mucosite induzida por Irinotecano. Os resultados mostraram que na ausência de eosinófilos os animais apresentaram atenuação na perda de peso e melhora no escore clínico. Além disso, os camundongos $\Delta db/Gata1^{-/-}$ apresentaram menor lesão intestinal, melhor preservação da arquitetura intestinal, menores áreas de erosão/ulceração e menor infiltrado inflamatório. E a menor gravidade da mucosite foi associada à diminuição da produção de CCL-11 e CCL-24, quimiocinas envolvidas no recrutamento de eosinófilos (Arifa *et al.*, em preparação). Acredita-se que os eosinófilos possuam grânulos eosinofílicos que podem liberar seu conteúdo, incluindo EPO e citocinas, por estimulação de sinais pró-inflamatórios (Fulkerson & Rothenberg, 2013). Esses eventos podem causar dano tecidual e ativação de outras células, como neutrófilos (Vieira *et al.*, 2009).

Até então não existem dados na literatura que correlacionam candidíase e ação dos eosinófilos. Sendo assim, para estudarmos o papel dos eosinófilos nesse contexto utilizamos camundongos $\Delta db/GATA1^{-/-}$ com retirada completa de eosinófilos na circulação, medula óssea e tecidos. Os animais $\Delta db/GATA1^{-/-}$ possuem deleção de um sítio de ligação ao GATA de alta afinidade no promotor GATA-1, um elemento que supostamente medeia a autorregulação positiva da expressão do GATA-1 e leva à perda seletiva da linhagem dos eosinófilos (Yu *et al.*, 2002). Nossos resultados demonstram que os eosinófilos não tem papel importante na depuração fúngica, visto que a carga de *C. albicans* nos tecidos dos camundongos $\Delta db/GATA1^{-/-}$ foram semelhantes a dos WT. Nossos dados corroboram com os de Malacco *et al.*, 2019 que mostram que embora o número de eosinófilos tenha aumentado após a infecção por *Aspergillus fumigatus*, essas células parecem desempenhar um papel secundário no processo de eliminação dos fungos, pois o número de UFC nos pulmões dos animais foram semelhantes entre os grupos WT e $\Delta db/GATA1^{-/-}$ (Malacco, *et al.*, 2019). Além disso, avaliamos o nível de algumas citocinas e quimiocinas e corroborando com o trabalho de Malacco, *et al.*, 2019, observamos que os níveis de CXCL-1 na língua, IFN- γ no soro e IL-1 β foram significativamente maiores em animais WT. A concentração desses mediadores também aumentou após a infecção sublingual de camundongos $\Delta db/GATA1^{-/-}$, mas o aumento foi de intensidade menor que a observada em camundongos WT. No entanto, não observamos diferença na produção de IL-17 entre WT e $\Delta db/GATA1^{-/-}$ como mostrado por Malacco *et al.*, 2019 na infecção pulmonar por *A. fumigatus*.

Os eosinófilos desempenham um papel imunorregulador e já foi demonstrado que eles podem secretar fatores ou desencadear a expressão de fatores com atividades ativadoras de macrófagos, como TGF- β , IL-1, IL-6, TN, proteína inflamatória de macrófagos-1 α , bem como ativadoras de neutrófilos (Jacobsen *et al.*, 2007). Portanto, isso sugere que os eosinófilos são capazes de alterar o perfil de resposta de outras células. Diante disso, nossos resultados mostraram que a medida indireta do recrutamento de macrófagos, NAG, foi significativamente maior na língua de animais Δ dblGATA1^{-/-} infectados com *C. albicans*. Isso sugere que os eosinófilos ao tentarem conter o estímulo fúngico podem causar lesão tecidual, bem como comprometer a atividade dos macrófagos em animais WT. Já na ausência de eosinófilos e de seus mediadores, animais Δ dblGATA1^{-/-}, os macrófagos podem ter seu perfil alterado e conseguir responder ao estímulo da forma correta, como com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e da fagocitose de leveduras. De fato, para elucidar tais mecanismos são necessários estudos mais profundos.

Ao avaliarmos as histologias inferimos que a lesão tecidual na língua de animais Δ dblGATA1^{-/-} são bem mais discretas, assim como a quantidade de células inflamatórias e fúngicas é menor em relação ao grupo WT. A perda de peso dos animais nos experimentos pode ser justificada, em parte, pela menor ingestão de comida, pois apesar de não termos utilizado gaiola metabólica fizemos uma estimativa da alimentação por meio da pesagem diária da ração e, de fato, os animais infectados ingeriram menos alimento (dados não mostrados). O score clínico dos animais Δ dblGATA1^{-/-} foi consideravelmente menor, indicando que na ausência de eosinófilos a resposta de defesa parece ser mais resolutiva e menos lesiva. Diante da relevância clínica da candidíase oral, esse resultado de score clínico denota o papel crucial dos eosinófilos na patogênese da candidíase tendo como agente etiológico a *C. albicans*. Portanto, nossos resultados são subsídios para que mais estudos sejam realizados a fim de compreender melhor o papel dos eosinófilos na infecção por *Candida albicans*, assim como seu potencial como alvo terapêutico.

8. CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho, foi possível compreender um pouco da relevância clínica da candidíase oral em contextos de imunossupressão e ainda percebemos a falta de modelos murinos que consigam mimetizar, de fato, a candidíase ocorrida em humanos. Além da construção de dois modelos, um utilizando DEX e o outro 5-FU, realçamos a importância dos eosinófilos na relação *C. albicans*/hospedeiro. O papel modulador dos eosinófilos ficou claro, visto que em animais Δ dblGATA1^{-/-}, na ausência de eosinófilos e de seus mediadores que podem causar lesão, observamos uma resposta inflamatória de macrófagos e de neutrófilos mais pontual e efetiva, e isso pôde ser comprovado pela melhora clínica e histopatológica desses animais. Muitas pesquisas e melhorias ainda são necessárias para elucidação dos diversos mecanismos envolvidos nesse processo, no entanto os resultados desse trabalho nos instiga a continuar buscando respostas.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 157/2018

Título do projeto: 1.2 O PAPEL DAS ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA NA IMUNOSSUPRESSÃO INDUZIDA POR SEPSE POLIMICROBIANA EM CAMUNDONGOS.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Danielle da Gloria de Souza

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 08/10/2018. Validade: 08/10/2018 à 07/10/2023

RECOMENDAÇÃO: Prezado pesquisador, o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.

Belo Horizonte, 08/10/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE P, CASADEVALL A. Quorum sensing in fungi--a review. **Med Mycol**, 2012.

ALMEIDA RS, BRUNKE S, ALBRECHT A, THEWES S, LAUE M, EDWARDS JE, *et al.* The hyphal associated adhesion and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. **PLoS Pathog**, 2008.

ALMEIDA RS, WILSON D, HUBE B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Res**, 2009.

AMULIC, B., CAZALET, C., HAYES, G. L., METZLER, K. D. & ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu. Rev. Immunol**, 2012. 30, 459–489.

BARMAN, ANANYA & GOHAIN, DIBAKAR & BORA, UTPAL & TAMULI, RANJAN. Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. **Microbiological Research**, 2018.

BERTINI, R *et al.* “Receptor binding mode and pharmacological characterization of a potent and selective dual CXCR1/CXCR2 non-competitive allosteric inhibitor”. **British journal of pharmacology**, 2012. vol. 165,2 436-54.

BÖTTCHER B, PÖLLATH C, STAIB P, HUBE B AND BRUNKE S. *Candida* species Rewired Hyphae Developmental Programs for Chlamydospore Formation. **Front. Microbiol.**, 2016; 7:1697.

BRANZK, N. *et al.* Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nat. Immunol.**, 2014. 5, 1017–1025.

BRENA S, CABEZAS-OLCOZ J, MORAGUES MD, FERNANDEZ DE LARRINOA I, DOMINGUEZ A, QUINDOS G, PONT_ON J. Fungicidal monoclonal antibody C7 interferes with iron acquisition in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother.**, 2011.

BROWN AJP, BROWN GD, NETEA MG, GOW NAR. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. **Trends Microbiol.** England; 2014;22: 614–622

BROWN AJP, HAYNES K, GOW NAR, QUINN J. Stress Responses in *Candida*. In: Calderone RA, Clancy CJ, ed. *Candida and Candidiasis: ASM Press*, 2012. Washington, DC, pp. 225-242.,

BROWN GC. Living too long: the current focus of medical research on increasing the quantity, rather than the quality, of life is damaging our health and harming the economy. **EMBO Rep.** 2014;16(2):137-41.

BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annu. Rev. Immunol.**, 2011.

BUSCH, R. A., JONKER, M. A., PIERRE, J. F., HENEGHAN, A. F., & KUDSK, K. A. Innate Mucosal Immune System Response of BALB/c vs C57BL/6 Mice to Injury in the Setting of Enteral and Parenteral Feeding. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2014. 40(2), 256–263.

CAMPOS, C. F. *et al.* Host Genetic Signatures of Susceptibility to Fungal Disease. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, [s.l.], p.1-27, 2018.

CANNOM, R. R. M., FRENCH, S. W., JOHNSTON, D., EDWARDS, JR., J. E., & FILLER, S. G. *Candida albicans* Stimulates Local Expression of Leukocyte Adhesion Molecules and Cytokines In Vivo. **The Journal of Infectious Diseases**, 2002.186(3), 389–396.

CARLISLE PL, *et al.* Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009;106:599–604.

CATO AC, NESTL A, AND MINK S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. **Sci STKE**, 2002.

CHADWICK M, ROGERS WI. The physiological disposition of 5-fluorouracil in mice bearing solid L1210 lymphocytic leukemia. **Cancer Res.** 1972;32:1045–56.

CHANG, C.-T., HO, T.-Y., LIN, H., LIANG, J.-A., HUANG, H.-C., LI, C.-C.,HSIANG, C.-Y. 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis via Nuclear Factor- κ B Activation by Transcriptomic Analysis and In Vivo Bioluminescence Imaging. **PLoS ONE**, 2012.7(3), e31808.

CHENG SC, VAN DE VEERDONK F, SMEEKENS S, JOOSTEN LA, VAN DER MEER JW, KULLBERG BJ, NETEA MG. *Candida albicans* dampens host defense by downregulating IL-17 production. **J Immunol**, 2010.

CHENG, S. C. *et al.* Complement plays a central role in *Candida albicans*-induced cytokine production by human PBMCs. **Eur. J. Immunol.**, 2012. 42, 993–1004.

CHUNG Y, CHANG SH, MARTINEZ GJ, YANG XO, NURIEVA R, KANG HS, MA L, WATOWICH SS, JETTEN AM, TIAN Q, *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. **Immunity**, 2009.

CONTI HR, SHEN F, NAYYAR N, *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **J Exp. Med.**, 2009;206(2):299–311.

CONTI, H. R. *et al.* Oral-resident natural Th17 cells and $\gamma\delta$ T cells control opportunistic *Candida albicans* infections. **J. Exp. Med.**, 2014. 211, 2075–2084.

CONTI, HEATHER R *et al.* “IL-17 Receptor Signaling in Oral Epithelial Cells Is Critical for Protection against Oropharyngeal Candidiasis” **Cell host & microbe**, 2016: vol. 20,5 606–617.

COOL, J. C., J. L. DYER, *et al.* Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Growth Horm IGF Res**, 2005. v.15, n.1, Feb, p.72-82.

COUTINHO AE AND CHAPMAN KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Mol Cell Endocrinol**, 2011. 335:2–13.

CRAIK, V. B *et al.* “Sensitivity of White and Opaque *Candida albicans* Cells to Antifungal Drugs”. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2017 ;vol. 61,8 e00166-17.

DADAR, M., TIWARI, R., KARTHIK, K., CHAKRABORTY, S., SHAHALI, Y., & DHAMA, K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. **Microbial Pathogenesis**, 2018. 117, 128–138.

DAVIS DA. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. **Curr Opin Microbiol**, 2009.

DAVIS, S. E. *et al.* Masking of $\beta(1-3)$ -glucan in the cellwall of *Candida albicans* from detection by innate immune cells depends on phosphatidylserine. **Infect. Immun.**, 2014. 82, 4405–4413.

DE LUCA A, ZELANTE T, D'ANGELO C, ZAGARELLA S, FALLARINO F, SPRECA A, IANNITTI RG, BONIFAZI P, RENAULD JC, BISTONI F, *et al.* IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. **Mucosal Immunol**, 2010.

DE OLIVEIRA SANTOS GC, VASCONCELOS CC, LOPES AJO, DE SOUSA CARTÁGENES MDS, FILHO AKDB, DO NASCIMENTO FRF, RAMOS RM, PIRES ERB, DE ANDRADE MS, ROCHA FMG AND DE ANDRADE MONTEIRO C. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Front. Microbiol.**, 2018.

DEL FRESNO, C. *et al.* Interferon- β production via Dectin-1–Syk– IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. **Immunity**, 2013. 38, 1176–1186.

DENG FS, LIN CH. Identification and characterization of ORF19.1725, a novel gene contributing to the white cell pheromone response and virulence-associated functions in *Candida albicans*. **Virulence.**, 2018;9(1):866-878.

DIASIO RB, HARRIS BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. **Clinical Pharmacokinetics**, 1989; 16: 215-37.

DIEHL, R., FERRARA, F., MÜLLER, C., DREYER, A. Y., MCLEOD, D. D., FRICKE, S., & BOLTZE, J. Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. **Cellular & Molecular Immunology**, 2016. 14(2), 146–179.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, 2011. 117, 3720–3732

DOI AM, PIGNATARI ACC, EDMOND MB, MARRA AR, CAMARGO LFA, *et al.* Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLOS ONE**, 2016; 11(1): e0146909.

ENEIV, MATTHEWB. LOHSE, ADRIANV. VLADU, JOACHIM MORSCHHÄUSER, ALEXANDER D. JOHNSON, RICHARD J. BENNETT. Phenotypic Profiling Reveals that *Candida albicans* Opaque Cells Represent a Metabolically Specialized Cell State Compared to Default White Cells. **mBio** Nov, 2016.

ENE I V., Adya AK, Wehmeier S, Brand AC, Maccallum DM, Gow NAR, *et al.* Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. **Cell Microbiol.**,2012;14: 1319–1335.

ENE I V., CHENG SC, NETEA MG, BROWN AJP. Growth of *Candida albicans* cells on the physiologically relevant carbon source lactate affects their recognition and phagocytosis by immune cells. **Infect Immun.**, 2013;81: 238–248

FERWERDA, B. *et al.* Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. **N. Engl. J. Med.**, 2009. 361, 1760–1767

FERWERDA, G., MEYER-WENTRUP, F., KULLBERG, B. J., NETEA, M. G. & ADEMA, G. J. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. **Cell. Microbiol.**,2008. 10, 2058–2066.

FIGUEIREDO, R. T., & NEVES, J. S. Eosinophils in fungal diseases: An overview. **Journal of Leukocyte Biology**, 2018. 104(1), 49–60.

FINKEL JS, MITCHELL AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nat Rev Microbio**,2011.

FULKERSON PC, ROTHENBERG ME. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. **Nat Rev Drug Discov**; 2013. 12(2):117-129.

GAZENDAM, R. P. *et al.* Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. **Blood**, 2014. 124, 590–597.

GIACOMAZZI, J., BAETHGEN, L., CARNEIRO, L. C., MILLINGTON, M. A., DENNING, D. W., COLOMBO, A. L. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, 2015. 59(3), 145–150.

GOODRIDGE, H. S. *et al.* Activation of the innate immunoreceptor Dectin-1 upon formation of a ‘phagocytosisynapse’. **Nature**, 2011. 472, 471–475.

GOW, N. A., VAN DE VEERDONK, F. L., BROWN, A. J. & NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nat. Rev. Microbiol.**, 2011. 10, 112–122.

GUABIRABA, R., A. G. BESNARD, *et al.* IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunol.**, 2014.v.7, n.5, Sep, p.1079-93.

HALL RA, TURNER KJ, CHALOUPKA J, COTTIER F, DE SORDI L, SANGLARD D, *et al.* The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, 2011.

HELLSTEIN, John W.; MAREK, Cindy L.. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head And Neck Pathology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.25-32, 29 jan. 2019.

HÖFS, Sarah; MOGAVERO, Selene; HUBE, Bernhard. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal Of Microbiology**, 2016; v. 54, n. 3, p.149-169.

HOGAN S. P., ROSENBERG H. F., MOQBEL R., PHIPPS S., FOSTER P. S., LACY P., *et al.* Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin. Exp. Allergy**, 2008; 38, 709–750.

HOGAN S. P., ROSENBERG H. F., MOQBEL R., PHIPPS S., FOSTER P. S., LACY P., *et al.* Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin. Exp. Allergy**, 2008. 38, 709–750.

HOOD MI, SKAAR EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. **Nat Rev Microbiol**, 2012.

HOPKE A, NICKE N, HIDU EE, DEGANI G, POPOLO L, WHEELER RT. Neutrophil Attack Triggers Extracellular Trap-Dependent *Candida* Cell Wall Remodeling and Altered Immune Recognition. **PLoS Pathog.** 2016.

HOYER LL & COTA E. *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. **Front. Microbiol.** 2016; 7:280.

HOYER, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**,2001. 9, 176–180.

ITAI S, SUGA Y, HARA Y, *et al.* Co-administration of dexamethasone increases severity and accelerates onset day of neutropenia in bladder cancer patients on methotrexate, vinblastine, adriamycin and cisplatin chemotherapy: a retrospective cohort study. **J Pharm Health Care Sci.** 2017;3:3.

IFRIM, D. C. *et al.* Role of Dectin-2 for host defense against systemic infection with *Candida glabrata*. **Infect. Immun.** 2014. 82, 1064–1073.]

JACOBSEN, E. A. *et al.* Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation?. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, [s.l.], v. 119, n. 6, p.1313-1320, jun. 2007

JOHNSTON, I. N., E. D. MILLIGAN, *et al.* A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. **J Neurosci**, 2004.v.24, n.33, p.7353-65.

JOLY, S. *et al.* Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. **J. Immunol.**2009. 183, 3578–3581.

JONATHAN P RICHARDSON & DAVID L MOYES. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. **Virulence**, 2015.6:4, 327-337

KAHLENBERG, J. M. & KAPLAN, M. J. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. **J. Immunol.** 191, 4895–4901 (2013).

KAMAI , Y. , M. KUBOTA , Y. KAMAI , T. HOSOKAWA , T. FUKUOKA , AND S. FILLER. New model of oropharyngeal candidiasis in mice. **Antimicrob. Agents Chemo.**2001 45: 3195– 319.

KATAGIRI, H., FUKUI, K., NAKAMURA, K., & TANAKA, A. Systemic hematogenous dissemination of mouse oral candidiasis is induced by oral mucositis. **Odontology**, 2018.

KULLBERG, B. J., VAN 'T WOUT, J. W. & VAN FURTH, R. Role of granulocytes in increased host resistance to *Candida albicans* induced by recombinant interleukin-1. **Infect. Immun.** 1990.58, 3319–3324.

LEE S, KIM H, SONG I, YOUM J, DIZON LA, JEONG S *et al.* Glucocorticoids and their receptors: insights into specific roles in mitochondria. **Prog Biophys Mol Biol** 2013; 112: 44–54.

- LEWIS, M. A. O.; WILLIAMS, D. W.. Diagnosis and management of oral candidosis. **Bdj**, [s.l.], v. 223, n. 9, p.675-681, 10 nov. 2017.
- LI XS, REDDY MS, BAEV D, EDGERTON M. *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. **J Biol Chem**, 2003.
- LI XS, SUN JN, OKAMOTO-SHIBAYAMA K, EDGERTON M. *Candida albicans* cell wall ssa proteins bind and facilitate import of salivary histatin 5 required for toxicity. **J Biol Chem**, 2006.
- LI, F. & PALECEK, S. P. Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell–cell and cell– substrate interactions. **Microbiology**, 2008 154, 1193–1203.
- LI, X., DUBOIS, D. C., SONG, D., ALMON, R. R., JUSKO, W. J., & CHEN, X. Modeling Combined Immunosuppressive and Anti-inflammatory Effects of Dexamethasone and Naproxen in Rats Predicts the Steroid-Sparing Potential of Naproxen. **Drug Metabolism and Disposition**, 2017. 45(7), 834–845
- LIMA, M. T. *et al.* Microbiota is an essential element for mice to initiate a protective immunity against *Vaccinia* virus. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], p.1-7, 25 nov. 2015. Oxford University Press (OUP).
- LOGAN, R. M., R. J. GIBSON, *et al.* Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral Oncol*, v.43, n.4, Apr, p.395-401. 2007.
- LONGLEY, D. B., HARKIN, D. P., & JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, 2003. 3(5), 330–338.
- KABIR A., MOHAMMAD ASIF HUSSAIN, AND ZULFIQAR AHMAD, “*Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens,” **ISRN Microbiology**, 2012.
- MAGILL SS, EDWARDS JR, BAMBERG W, BELDAVS ZG, DUMYATI G, KAINER MA, *et al.* Emerging infections program healthcare-associated infections and antimicrobial use prevalence survey team. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014; 370(13):1198–208.

MALACCO NLSO, RACHID MA, GURGEL ILDS, et al. Eosinophil-Associated Innate IL-17 Response Promotes *Aspergillus fumigatus* Lung Pathology. **Front Cell Infect Microbiol.** 2019;8:453.

MARTCHENKO M, ALARCO AM, HARCUS D, WHITEWAY M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. **Mol Biol Cell**, 2004.

MAVOR AL, THEWES S, HUBE B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. **Curr Drug Targets**, 2005.

MAY RC, CASADEVALL A. In Fungal Intracellular Pathogenesis, Form Determines Fate. **MBio.** 2018;9(5):e02092-18.

MAYER FL, WILSON D, JACOBSEN ID, MIRAMÓN P, GROBE K, HUBE B. The novel *Candida albicans* transporter Dur31 Is a multi-stage pathogenicity factor. **PLoS Pathog**, 2012a

MAYER FL, WILSON D, JACOBSEN ID, MIRAMÓN P, SLESIONA S, BOHOVYCH IM, et al. Small but crucial: the novel small heat shock protein Hsp21 mediates stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. **PLoS One**, 2012b.

MAYER, F. L., WILSON, D., AND HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, 2013.

MENEGAZZI, R., DECLEVA, E. & DRI, P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? **Blood**, 2012.119, 1214–1216.

MENEZES-GARCIA, Z. Papel da microbiota no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico fluorouracil. **Tese (Doutorado em microbiologia)** - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2015.

MIRAMÓN, P., & LORENZ, M. C. A feast for *Candida*: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. **PLoS pathogens**, 2017 13(2), e1006144.

MORAN GP, COLEMAN DC, SULLIVAN DJ. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic? **Int J Microbiol**, 2012.

MOYES DL, RUNGLALL M, MURCIANO C, SHEN C, NAYAR D, THAVARAJ S, KOHLI A, ISLAM A, MORA-MONTES H, CHALLACOMBE SJ et al.: A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. **Cell Host Microbe**, 2010, 8:225-235.

MOYES DL, WILSON D, RICHARDSON JP, MOGAVERO S, TANG SX, WERNECKE J, HOF S, GRATACAP RL, ROBBINS J, RUNGLALL M *et al.*: Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, 2016; 532:64-68.

MOYES, D. L. *et al.* *Candida albicans* yeast and hyphae are discriminated by MAPK signaling in vaginal epithelial cells. **PLoS ONE**, 2011. 6, e26580 .

NAGLIK JR, CHALLACOMBE SJ, HUBE B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 2003;67(3):400–428.

NAGLIK JR, FIDEL PL JR., ODDS FC. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Microbiol Lett**, 2008. 283: 129–139.

NAGLIK JR, MOYES DL, WÄCHTLER B, HUBE B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes Infect**, 2011.

NAGLIK, JULIAN & KÖNIG, ANNIKA & HUBE, BERNHARD & GAFFEN, SARAH. *Candida albicans*-epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. **Current opinion in microbiology**, 2017. 40. 104-112

NETEA MG, JOOSTEN LA, VAN DER MEER JW, KULLBERG BJ, VAN DE VEERDONK FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nat Rev Immunol**. 2015;

NETEA, M. G. *et al.* Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. **Blood**, 2009. 113, 2324–2335.

NETEA, M. G. *et al.* Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. **Eur. J. Immunol.**,2003. 33, 3409–3417.

NETEA, M. G. *et al.* Human dendritic cells are less potent at killing *Candida albicans* than both monocytes and macrophages. **Microb. Infect.**,2004. 6, 985–989.

- NETEA, M. G., BROWN, G. D., KULLBERG, B. J. & GOW, N. A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nat. Rev. Microbiol.**, 2008. 6, 67–78.
- NETEA, M. G., VAN DE VEERDONK, F. L., VAN DER MEER, J. W., DINARELLO, C. A. & JOOSTEN, L. A. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. **Annu. Rev. Immunol.**, 2014. 33, 49–77.
- NICHOLLS S, MACCALLUM DM, KAFFARNIK FA, SELWAY L, PECK SC, BROWN AJ. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Fungal Genet Biol**, 2011.
- NOBLE SM, GIANETTI BA, WITCHLEY JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nat Rev Microbiol.** 2016;15(2):96-108.
- O'DEA E. M., AMARSAIKHAN N., LI H., DOWNEY J., STEELE E., VAN DYKEN S. J., et al. Eosinophils are recruited in response to chitin exposure and enhance th2-mediated immune pathology in *Aspergillus fumigatus* infection. **Infect. Immun.**, 2014.82, 3199–3205.
- OLIVEIRA, M. C., TAVARES, L. P., VAGO, J. P., BATISTA, N. V., QUEIROZ-JUNIOR, C. M., VIEIRA, A. T., FERREIRA, A. V. M.. Tumor Necrosis Factor, but Not Neutrophils, Alters the Metabolic Profile in Acute Experimental Arthritis. **PLOS ONE**, 2016. 11(1), e0146403.
- OSTANIN, D. V., J. BAO, *et al.* T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.296, n.2, Feb, p.G135-46. 2009.
- PADOVAN A. C., CHAVES G. M., COLOMBO A. L., BRIONES M. R. A novel allele of HWP1, isolated from a clinical strain of *Candida albicans* with defective hyphal growth and biofilm formation, has deletions of Gln/Pro and Ser/Thr repeats involved in cellular adhesion. **Med. Mycol.**, 2009. 47, 824–835.
- PALIGE K, LINDE J, MARTIN R, BÖTTCHER B, CITIULO F, *et al.* Global Transcriptome Sequencing Identifies Chlamydospore Specific Markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **PLOS ONE**, 2013; 8(4): e61940.
- PANKHURST CL. Candidiasis (oropharyngeal). **BMJ Clin Evid.** 2009.

PAPPAS, Peter G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 4, p.1-20, 11 maio 2018.

PARAMYTHIOTOU, E., FRANTZESKAKI, F., FLEVARI, A., ARMAGANIDIS, A., AND DIMOPOULOS, G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules** , 2014.

PFALLER, M. A., ANDES, D. R., DIEKEMA, D. J., HORN, D. L., REBOLI, A. C., ROTSTEIN, C., et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004–2008. **PLoS One**, 2014.

PIETRELLA, D. *et al.* Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. **Eur. J. Immunol.**,2013. 43, 679–692.

RAVIN K. A., LOY M. The eosinophil in infection. **Clin. Rev. Allergy Immunol.** 2015. 50, 214–227.

RAZZAGHI-ABYANEH, M., SADEGHI, G., ZEINALI, E., ALIREZAEI, M., GHAFAROKHI, M. S., AMANI, A., *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. **J. Mycol. Med**, 2014.

REPENTIGNY, LOUIS *et al.* Immunopathogenesis of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, 2004, 17:729-759.

RIBEIRO, R.A., WANDERLEY, C.W.S., WONG, D.V.T. *et al.* **Cancer Chemother Pharmacol**, 2016; 78: 881.

RICHARDSON, Jonathan P; MOYES, David L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. **Virulence**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.327-337, 21 jan. 2015.

RICHTER K, HASLBECK M, BUCHNER J. The heat shock response: life on the verge of death. **Mol Cell**, 2010.

ROBBINS N, UPPULURI P, NETT J, RAJENDRAN R, RAMAGE G, LOPEZ-RIBOT JL, *et al.* Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. **PLoS Pathog**, 2011.

- ROMANI L, BISTONI F, PUC CETTI P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Curr Opin Microbiol.** 2003; 6:338–43.
- ROUTH MM, CHAUHAN NM, KARUPPYIL SM. Cancer drugs inhibit morphogenesis in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. **Braz J Microbiol.** 2013;44(3):855–9.
- SAAG KG, KOEHNKE R, CALDWELL JR, BRASINGTON R, BURMEISTER LF, ZIMMERMAN B, KOHER JA, AND FURST DE .Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events. **Am J Med,** 1994. 96:115–123
- SAIJO, S. *et al.* Dectin-2 recognition of α -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. **Immunity,**2010. 32, 681–691.
- SAMARANAYAKE YH & SAMARANAYAKE LP .Experimental oral candidiasis in animal models.**Clin Microbiol Rev,** 2001. 14: 398–429.
- SASSE C, HASENBERG M, WEYLER M, GUNZER M, MORSCHHÄUSER J. White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. **Eukaryot Cell.** 2013;12(1):50-8.
- SCULLY C, SONIS S, DIZ PD. Oral mucositis. **Oral Dis,** 2006; 12:229-41.
- SHAMRI R., XENAKIS J. J., SPENCER L. A. (2011). Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 343, 57–83
- SHARMA, J.; ROSIANA, S.; RAZZAQ, I.; SHAPIRO, R.S. Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens. **J. Fungi** 2019, 5, 17.
- SHERRINGTON SL, SORSBY E, MAHTEY N, KUMWENDA P, LENARDON MD, *et al.* Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. **PLOS Pathogens** 13(5), 2017.
- SIDRIM JJC., ROCHA MFG. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan S. A.**, 2004.
- SMEEKENS, S. P., VAN DE VEERDONK, F. L., KULLBERG, B. J. & NETEA, M. G. Genetic susceptibility to *Candida* infections. **EMBO Mol. Med.**, 2013. 5, 805–813

SMELTZ RB, CHEN J, EHRHARDT R, SHEVACHEM. Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression. **J Immunol**, 2002.

SONIS ST . The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**, 2004; 4: 277–284.

SONIS ST, ELTING LS, KEEFE D, PETERSON DE, SCHUBERT M, *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, 2004;100:1995–2025

SONIS ST, OSTER G, FUCHS H, BELLM L, BRADFORD WZ, *et al.* Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. **J Clin Oncol**, 2001. 19: 2201–2205

SORENSEN, O. E. *et al.* Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. **Blood**, 2001 97, 3951–3959.

SUDBERY PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nat Rev Microbiol**, 2011.

SUN JN, LI W, JANG WS, NAYYAR N, SUTTON MD, EDGERTON M. Uptake of the antifungal cationic peptide Histatin 5 by *Candida albicans* Ssa2p requires binding to non-conventional sites within the ATPase domain. **Mol Microbiol**, 2008.

SUN JN, SOLIS NV, PHAN QT, BAJWA JS, KASHLEVA H, THOMPSON A, *et al.* Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. **PLoS Pathog**, 2010.

SUN Y, CAO C, JIA W, TAO L, GUAN G, HUANG G. pH Regulates White-Opaque Switching and Sexual Mating in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**. 2015.

SWIDERGALL, Marc; FILLER, Scott G.. Oropharyngeal Candidiasis: Fungal Invasion and Epithelial Cell Responses. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-7, 12 jan. 2017.

TAGHAVI, Mehdi *et al.* Role of pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) in immune responses to fungal infections. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 808, p.8-13, ago. 2017.

TAKAKURA, N., SATO, Y., ISHIBASHI, H., OSHIMA, H., UCHIDA, K., YAMAGUCHI, H., & ABE, S. A Novel Murine Model of Oral Candidiasis with Local Symptoms Characteristic of Oral Thrush. **Microbiology and Immunology**, 2003. 47(5), 321–326.

TANABE S, GOTO T, INAGAKI J, KIMURA K. Septicemia in patients with solid cancers in a Japanese cancer hospital—the significance of candidemia for patients. *Jpn J Clin Oncol*. 1991;21:52–8.

TASAKI, SONOKO *et al.* “Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis”. **FEMS yeast research** vol. 18,3 (2018): foy018.

TERÇAS, A. L. G., MARQUES, S. G., MOFFA, E. B., ALVES, M. B., DE AZEVEDO, C. M. P. S., SIQUEIRA, W. L., *et al.* . Antifungal drug susceptibility of *Candida* species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. **Front. Microbiol**, 2017.

TRAVERS, J., & ROTHENBERG, M. E.). Eosinophils in mucosal immune responses. **Mucosal Immunology**, 2015 .8(3), 464–475.

USSELMANN, B., M. NEWBOLD, *et al.* Deficiency of colonic telomerase in ulcerative colitis. **Am J Gastroenterol**, v.96, n.4, Apr, p.1106-12. 2001.

VALLABHANENI, S., MODY, R. K., WALKER, T., AND CHILLER, T. The global burden of fungal diseases. **Infect. Dis. Clin. North Am**, 2016.

VAN BRUGGEN, R. *et al.* Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for β -glucan-bearing particles. **Mol. Immunol.** 47, 575–581, 2009.

VAN DE VEERDONK, F. L. *et al.* Bypassing pathogen-induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1 β production by the fungal pathogen *Candida albicans*. **J. Infect. Dis.** 2009. 199, 1087–1096.

VAN DE VEERDONK, F. L. *et al.* Differential effects of IL-17 pathway in disseminated candidiasis and zymosan-induced multiple organ failure. **Shock.**, 2010. 34, 407–411. .

VAN VLIET MJ, HARMSSEN HJM, DE BONT ESJM, TISSING WJE. The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. **PLoS Pathog**, 2010. 6(5): e1000879.

- VIEIRA *et al.* Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **Am J Pathol.** 2009;175(6):2382-2391.
- VLIET, MICHEL J. VAN *et al.* The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. **PLOS Pathogens**, v.6, n.5, 2010.
- VOIGT, J. *et al.* Human natural killer cells acting as phagocytes against *Candida albicans* and mounting an inflammatory response that modulates neutrophil antifungal activity. **J. Infect. Dis.** 2014. 209, 616–626.
- VYLKOVA S, LORENZ MC. Modulation of Phagosomal pH by *Candida albicans* Promotes Hyphal Morphogenesis and Requires Stp2p, a Regulator of Amino Acid Transport. **PLoS Pathog.** 2014;10.
- WACHTLER B, CITIULO F, JABLONOWSKI N, FÖRSTER S, DALLE F, SCHALLER M, *et al.* *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. **PLoS One**, 2012.
- WILSON D, NAGLIK JR, HUBE B: The missing link between *Candida albicans* hyphal morphogenesis and host cell damage. **PLoS Pathog** 2016, 12:e1005867.
- ZHANG, X. *et al.* Dual functions of the human antimicrobial peptide LL-37-target membrane perturbation and host cell cargo delivery. **Biochim. Biophys. Acta**, 2010. 1798, 2201–2208.
- ZIELINSKI, C. E. *et al.* Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL- β . **Nature**, 2012. 484, 514–5.

