



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Thainá Sanches Paixão

**Influência dos receptores de manose, dectina-1, TLR-2 e
TLR-4 na ativação de monócitos de pacientes com diabetes
mellitus do tipo 2 e infectados com o dermatófito
*Trichophyton rubrum***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. James Venturini

**Botucatu
2019**

Thainá Sanches Paixão

**Influência dos receptores de manose, dectina-1, TLR-2 e
TLR-4 na ativação de monócitos de pacientes com diabetes
mellitus do tipo 2 e infectados com o dermatófito
*Trichophyton rubrum***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof.Dr. James Venturini

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Paixão, Thainá Sanches.

Influência dos receptores de manose, dectina-1, TLR-2 e TLR-4 na ativação de monócitos de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 e infectados com o dermatófito *Trichophyton rubrum* / Thainá Sanches Paixão. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: James Venturini
Capes: 40101096

1. Diabetes Mellitus Tipo 2. *Trichophyton*. 3. Lectinas.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 2; Receptores de reconhecimento padrão; *Trichophyton rubrum*.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

(Martin Luther King)

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai (in memoriam), um homem de fé, um exemplo de ser humano e um pai maravilhoso que sempre acreditou que eu pudesse chegar até aqui. Eu te amo!



Agradecimientos

Agradecimentos

À minha mãe Rosana e ao meu pai Moacyr (in memoriam), por tudo o que fizeram por mim, sem vocês nada disso seria possível. Vocês sempre foram a minha base e o meu amor maior. Obrigada por lutarem por mim, todos os dias. Eu amo vocês!

À minha irmã Thauana por sempre estar ao meu lado. Por me ensinar sobre ser forte, sobre não ter medo e sobre ter coragem. Você foi o melhor presente que ganhei durante a vida. Com você aprendi sobre partilhar, amar e cuidar. Obrigada pelos conselhos, broncas, brigas, abraços, beijos e lágrimas. Eu te amo!

Ao meu noivo Neto, por permanecer ao meu lado nos melhores e nos piores momentos da minha vida. Por não me deixar cair, e se caso eu caísse, por me estender as mãos todas as vezes. Por compartilhar das minhas conquistas, por me incentivar e por acreditar em mim. Você me fez enxergar a vida de uma maneira nunca vista, me fez mudar coisas que eu jamais achei que fosse capaz. Eu te amo hoje e sempre!

À minha filha canina Sophie (in memoriam) por todo o amor que foi me dado, pelo companheirismo diário e pelos pulos de alegria quando eu chegava em casa. Você foi maravilhosa comigo durante esses anos e me ensinou sobre o amor de uma forma diferente. Um amor que não precisa ser expresso com palavras e que os gestos mais simples, são capazes de aquecer um coração. Você foi uma guerreira até o último dia, e eu sou eternamente grata por ter tido a oportunidade de cuidar de você e por permanecer ao seu lado. Você será insubstituível e o meu amor por você será eterno.

Ao meu orientador Dr. James Venturini pela confiança em mim depositada. Te desejo sucesso!

Às minhas melhores amigas Fernanda e Camila por permanecerem ao meu lado durante todos esses anos de amizade. Aprendi e cresci muito com cada uma. Obrigada pelos conselhos, conversas, risadas, lágrimas, abraços e amor. Tenham a certeza que cresci muito ao lado de vocês. Espero tê-las comigo durante toda a vida.

Aos meus companheiros do Lipe: Amanda Ribeiro, Angela Finato,

Rodolfo Ferreira, Barbara Mello, Angela Liberali, Víctor Resende, Luiz Gustavo, Vitória e Silas por estarem ao meu lado durante o decorrer do trabalho e por me proporcionarem dias felizes. Muito obrigada por todo o carinho e amizade.

A minha companheira e amiga Karoline Reis, por toda a ajuda me dada até aqui. Por me incentivar em todos os momentos, por me querer sempre bem e por me contagiar com sua alegria. Pelas broncas e conselhos, por me ouvir, chorar comigo e compartilhar dos meus momentos. Tenho muito orgulho de você, por toda a sua garra, determinação e por acreditar que tudo sempre dá certo. Aprendi muito com você e espero levar nossa amizade para a vida toda. Você sempre estará guardada em meu coração, benzinho!

A Babí Amorim pela amizade e carinho e por toda a ajuda científica nesse projeto. Obrigada por sempre estar ao meu lado, por todos os conselhos que foi me dado, sejam eles pessoais e profissionais. Obrigada por toda a preocupação e disponibilidade em fazer o trabalho dar certo. Torço muito por você e sei que você realizará todos os seus sonhos, pois você é merecedora disso. E eu estarei sempre aqui, para te aplaudir de pé.

A Débora Almeida por também estar ao meu lado durante o decorrer do trabalho. Mesmo quando longe, sempre me aconselhou nos experimentos. Você também foi fundamental para que este projeto acontecesse. Obrigada por todos os conselhos e conversas e por também me ajudar na parte científica do trabalho com seu olhar crítico. Admiro muito você, por toda a sua bondade, paciência e força de vontade. Te desejo um futuro maravilhoso e muita saúde para o Leonardo. Que ele venha alegrar ainda mais as nossas vidas.

A Adrielle pela amizade e carinho. Por todas as nossas conversas, choros, risos e por toda a preocupação comigo. Aprendi muito com você e te admiro cada dia mais. Obrigada por estar ao meu lado esses anos, você foi e é maravilhosa. Tenho muito orgulho de você, de sua determinação, força de vontade e fé. E tenho certeza que vou te ver brilhando muito por aí a fora. Estarei sempre aqui, torcendo por você.

Ao Jonatas Perico, pela amizade, carinho, companheirismo e por todas as risadas. Sua amizade foi essencial durante esses anos. Nossos momentos divertidos estarão para sempre guardados comigo. Obrigada por toda a ajuda até aqui, por permanecer ao meu lado e por

me ouvir nos melhores e piores momentos da minha vida.

*Às pesquisadoras do Instituto Lauro de Souza Lima. **María Renata e Vânia** por disponibilizar os laboratórios e por nos receberem de braços abertos. Por nos ajudarem com todo conhecimento científico teórico e prático.*

*À **Izilda Maria de Andrade**, do laboratório de Micologia do Instituto Lauro de Souza Lima, pela amizade, companheirismo e profissionalismo. Serei eternamente grata a tudo o que fez por mim no decorrer desses anos. Admiro muito você, como pessoa e como profissional.*

Aos funcionários do Instituto Lauro de Souza Lima por nos acolherem, ajudarem e nos ensinarem durante o decorrer do projeto. Minha eterna gratidão por vocês!

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação e à Bruna Quirino Jorgetto pela atenção a nós destinada.

Ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e a todos os funcionários da Faculdade de Medicina de Botucatu por toda atenção e ajuda quando necessário.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Resumo

Resumo

PAIXÃO, T. S. **Influência dos receptores de manose, dectina-1, TLR-2 e TLR-4 na ativação de monócitos de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 e infectados com o dermatófito *Trichophyton rubrum***. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

Dermatofitoses são infecções fúngicas causadas por fungos dermatofíticos que geralmente afetam a camada córnea da pele, cabelos e unhas, mas sob certas condições podem apresentar envolvimento invasivo. A espécie *Trichophyton rubrum* é o dermatófito mais frequentemente isolado em espécimes clínicos. Além disso, pacientes com diabetes mellitus tipo II (DM-II) são mais suscetíveis a esta infecção fúngica e a relação dermatófito-hospedeiro é pouco compreendida. Contudo, o perfil pró-inflamatório observado em pacientes com hiperglicemia é uma condição complicadora nessa relação. Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nos fagócitos, como os receptores de manose (MR), dectina-1, toll-like (TLR) -2 e -4, reconhecem estruturas fúngicas e são responsáveis por desencadear mecanismos de ativação e regulação celular durante o processo inflamatório. Assim, o presente estudo tem como objetivo determinar o papel desses receptores na ativação de monócitos de pacientes com DM-II e dermatofitoses por *T. rubrum*. Exoantígenos de *T. rubrum* foram obtidos de pacientes com diabetes e indivíduos normoglicêmicos. Os PRRs foram bloqueados em monócitos e monócitos THP-1 de pacientes com DM-II e indivíduos normoglicêmicos desafiados com Exo_Tr_NG e Exo_Tr_DM. Posteriormente, o TNF e MIP-1 α e IL-1 β foram dosados. A expressão desses receptores foi avaliada por citometria de fluxo. Nenhuma diferença estatística foi observada no ensaio de inibição de monócitos de pacientes diabéticos e indivíduos normoglicêmicos e na expressão do receptor. No entanto, nossos resultados sugerem que os receptores atuem no reconhecimento de exoantígenos de *T. rubrum* obtidos de pacientes diabéticos e normoglicêmicos com consequente liberação de mediadores inflamatórios que podem atuar amplificando o processo inflamatório desses pacientes.

Palavras-chave: receptores de reconhecimento padrão, Diabetes mellitus tipo 2, *Trichophyton rubrum*

Abstract

PAIXÃO, T. S. **Influence of mannose, dectin-1, TLR-2 and TLR-4 receptors on the activation of monocytes from patients with type 2 diabetes mellitus and infected with the dermatophyte *Trichophyton rubrum*.** 2019. Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

Dermatophytoses are fungal infections caused by dermatophytic fungi that usually affect the cornea layer of the skin, hair and nails, but under certain conditions may present invasive involvement. The species *Trichophyton rubrum* is the dermatophyte most often isolated in clinical specimens. In addition patients with type II diabetes mellitus (DM-II) are more susceptible to this fungal infection. The dermatophyte-host relationship is poorly understood; However, the pro-inflammatory profile observed in patients with hyperglycemia is a complicating condition in this relationship. The pattern recognition receptors (PRRs) present in phagocytes, such as the mannose (MR), dectin-1, toll-like (TLR) -2 and -4 receptor, recognize fungal structures and are responsible for triggering mechanisms of cellular activation and regulation during the inflammatory process, as well as influence on the polarization of the adaptive immune response. Thus, any interference in this process may impair the host to effectively and pathogenically eliminate pathogens. Thus, the present study aims to determine the role of these receptors in the activation of monocytes of patients with DM-II. Exoantigens of *T. rubrum* were obtained from patients with diabetes and normoglycemic individuals. PRRs were blocked in THP-1 monocytes and monocytes from DM-II patients and normoglycemic individuals challenged with Exo_Tr_NG and Exo_Tr_DM. Subsequently, TNF and MIP-1 α and IL-1 β were dosed. The expression of these receptors was evaluated by flow cytometry. No statistical difference were observed in the monocyte inhibition assay of diabetic patients and normoglycemic individuals and in receptor expression. However, our results suggest that the receptors act on the recognition of exoantigens of *T. rubrum* obtained from diabetic patients and normoglycemic individuals with consequent release of inflammatory mediators that may act by amplifying the inflammatory process of these patients.

Keywords: pattern recognition receptors, Diabetes mellitus type 2, *Trichophyton rubrum*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
<i>1.1 Infecção por fungos dermatófitos</i>	1
<i>1.2 Interação parasito-hospedeiro</i>	2
<i>1.3 Diabetes e suscetibilidade à dermatofitoses</i>	4
<i>1.4 Diabetes mellitus tipo II, Dermatofitose e Receptores de Reconhecimento Padrão</i>	6
<i>1.5 Justificativa</i>	8
2. OBJETIVOS	11
<i>2.1 Objetivo Geral</i>	11
<i>2.2 Objetivos Específicos</i>	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
4. MANUSCRITO I	18
6. CONCLUSÃO	48
7. ANEXOS	48



Introdução

1.INTRODUÇÃO

1.1 Infecção por fungos dermatófitos

As dermatofitoses são infecções causadas por fungos dermatófitos e restritas as camadas córneas da pele, cabelos, pêlo e unhas. Os dermatófitos são fungos filamentosos capazes de utilizar a queratina como fonte de nutrição e crescimento durante as infecções. As espécies de dermatófitos com maior prevalência e incidência pertencem aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* e são classificados de acordo com o nicho ecológico: antropofílicos (homem), geofílicos (solo) e zoofílicos (animais) (1,2).

A transmissão ocorre pelo contato direto ou indireto com humanos ou animais infectados e objetos contaminados. Após a inoculação e entrada do fungo na pele, o mesmo germina e invade as camadas superficiais da epiderme (3,4).

As espécies zoofílicas quando infectam o homem, causam infecções agudas com lesões inflamatórias, bem delimitadas, e de fácil tratamento, com consequente resolução da infecção e um grau de resistência a re-infecções. Já as espécies antropofílicas adaptaram-se aos humanos e tendem a apresentar infecções menos inflamatórias e mais crônicas, com baixa resposta à terapia antifúngica e com caso de recidiva muito frequente (5). São também responsável pela maioria dos casos de dermatofitoses superficiais e infecções de unha (onicomicoses) (2,6). Dentre as espécies antropofílicas, o *Trichophyton rubrum* é o dermatófito mais comumente isolado em infecções dermatofíticas e responsáveis por até 80% dos casos de dermatofitoses em determinadas populações (7).

Nas infecções de pele as lesões são circulares, eritematosas e pruriginosas, com descamação nas bordas e ocasionalmente formação de bolhas devido a ação direta do fungo ou de reações de hipersensibilidade ao patógeno e/ou produtos do seu metabolismo (4,8) . Nas onicomicoses pode surgir deslocação das bordas, espessamento, manchas brancas e distrofia total das unhas (4).

As formas clínicas das dermatofitoses são nomeadas de acordo com o sítio anatômico acometido: *tinea capitis* (couro cabeludo), *tinea corporis* (corpo), *tinea cruris* (virilha), *tinea pedis* (pé), *tinea manuum* (mãos), *tinea barbae* (barba dos homens), *tinea faciei* (rosto) e *tinea unguium* (unhas) (8).

A variabilidade das formas clínicas das dermatofitoses implica em vários fatores. As regiões mais propensas são aquelas que proporcionam condições apropriadas para o desenvolvimento do fungo. As áreas de dobra do corpo, como interdígitos, regiões inguinais e submamária, as unhas e o couro cabeludo, satisfazem essas condições e possibilitam um

contato prolongado entre o fungo e o hospedeiro promovendo a infecção (9,10).

É importante salientar que embora as dermatofitoses sejam restritas às regiões superficiais da pele, os fungos podem apresentar um comportamento invasivo. Em casos de pacientes imunocomprometidos, estes ocasionam uma infecção profunda e disseminada com aparição de granulomas específicos (11). As formas invasivas têm aumentado significativamente nos últimos anos; ainda assim, o diagnóstico é tardio e subestimado.

Além disso, alguns fatores como, a presença de uma doença de base ou procedimentos terapêuticos que atuem na redução das funções imunológicas, aumentam a suscetibilidade do indivíduo a infecções por dermatófitos. A exemplo desses fatores, temos o Diabetes Mellitus (12), a síndrome de Cushing (13), o uso corticosteroide (14,15), AIDS (16,17), e pacientes transplantados (18,19).

1.2. Interação parasito-hospedeiro

Durante o processo infeccioso, os dermatófitos precisam superar os mecanismos de defesa inatos do hospedeiro, tais como: pH ácido da pele, a existência de moléculas inibitórias como os ácidos graxos e peptídeos antimicrobianos, a atuação das células fagocíticas e o processo de queratinização realizado pelos queratinócitos, a fim de promover a descamação do epitélio e provável remoção do fungo (3,7,20,21). Além disso, fatores como: constituição química e física da pele, a frequente exposição à luz UV, a temperatura, a ausência de umidade e a presença da microbiota da pele, dificultam o progresso dos patógenos (22).

Para que a infecção se instale, os dermatófitos devem aderir à superfície do hospedeiro rapidamente, para que sua eliminação não aconteça (54). As adesinas são moléculas de superfície expressas na parede celular fúngica que permite rápido estabelecimento no tecido do hospedeiro e na matriz extracelular (23). A adesão de conídio de dermatófito no estrato córneo acontece dentro de 3 a 4 horas (22), e a germinação dos conídios ocorre em 24 horas. Após 3 dias, as hifas dos dermatófitos podem se espalhar pela pele (24).

Uma vez aderido no tecido do hospedeiro, o patógeno precisa encontrar nutrientes para sua sobrevivência e escapar das moléculas e células do sistema imune inato. Os fungos secretam uma variedade de enzimas que degradam células do hospedeiro, como as proteases, incluindo enzimas colagenolíticas e elastinolíticas, lipases, nucleotidasas e enzimas mucolíticas (25,26). Além disso, inúmeras vias metabólicas estão envolvidas na sobrevivência dos fungos sob situações de estresse. Essas vias possibilitam que o fungo utilize diferentes substratos para energia, de forma que possa superar o ambiente inóspito do hospedeiro e,

dessa forma, manter o processo de infecção (27).

A imunidade inata é de suma importância para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa mediada por células, que pode promover tanto o controle das infecções micóticas, como atuar na progressão da doença (28,29). A imunidade inata confere as células fagocíticas habilidade de ingestão e/ou inibição do crescimento fúngico, assim como, desencadeia uma reação inflamatória aguda e atua na apresentação de antígenos fúngicos para as células T. Além disso, secretam citocinas como TNF- α e IL-12, quimiocinas e outras moléculas capazes de modular a infecção (30).

As primeiras células encontradas pelos dermatófitos durante a infecção são os queratinócitos, que iniciam um relevante papel na defesa inata do hospedeiro (3). Os dermatófitos ou seus metabólitos induzem uma resposta imunológica inata por intermédio dos queratinócitos com consequente ativação dos mecanismos e mediadores da resposta imune (3), como os fatores de crescimento (bFGF – *basic fibroblast growth factor*, TGF- α – *transforming growth factor*; TGF- β ; TNF- α – *tumor necrosis factor*), interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-7 e IL-8) e fatores estimuladores de colônias (CSFS) (10). Segundo Tani et al., queratinócitos estimulados *in vitro* por 24 horas com a tricofitina (antígeno de *Trichophyton*), secretam elevados níveis de IL-8, uma citocina quimiotática para neutrófilos, recrutando-os até o local da infecção (31).

Neutrófilos e monócitos humanos também iniciam um importante papel na defesa do hospedeiro contra fungos. A fagocitose e o aumento do “burst” respiratório são os mecanismos principais utilizados por estas células com a finalidade de provocar a morte do fungo (32). Os neutrófilos são células altamente tóxicas para o *T. rubrum* após 2 horas de incubação a 37°C, esta citotoxicidade é mediada pelos ROS (reativos intermediários do oxigênio) derivados do “burst” respiratório. No entanto, longos períodos de incubação levam ao aumento da viabilidade fúngica. Já os monócitos exercem um efeito citotóxico menos acentuado (33).

A resposta imune adaptativa, mediada por células T é usualmente precedida pela resposta imune inata e desempenha papel importante na resistência do hospedeiro frente as infecções fúngicas. Estão associadas a reação de hipersensibilidade tardia com consequente ativação de linfócitos T e liberação de citocinas como o INF- γ . Diante disso, pacientes imunocomprometidos apresentam maior prevalência da forma crônica da doença (34,35,36).

Apesar da imunidade humoral ser pouco significativa nas infecções por dermatófitos, a produção de anticorpos é relatada nas formas crônicas da doença (37). Infecções crônicas ou recorrentes pelo *T. rubrum* em indivíduos imunocompetentes estão relacionadas com o

predomínio de IgE (imunoglobulina E) contra o fungo, bem como elevados níveis séricos de IgE e IgG4 (imunoglobulina G4) (38).

Alguns estudos propõem que o *T. rubrum* possa ter desenvolvido mecanismos de evasão ou supressão das respostas imune do hospedeiro (39,40). Campos et al. (39), demonstraram que a fagocitose de conídios de *T. rubrum* por macrófagos leva a aumento de TNF- α e IL-10 e diminuição de moléculas co-estimulatórias e MHC (Complexo Maior de Histocompatibilidade) de classe II. Além disso, os conídios podem germinar e se tornar hifas dentro dos macrófagos, o que leva a ruptura de sua membrana e conseqüentemente morte.

Ademais, os dermatófitos produzem substâncias que reduzem a resposta inflamatória e a proliferação celular. A manana, um elemento glicoproteico da parede celular do fungo, aparenta estar envolvida na supressão dessa resposta. Campos et al, avaliaram que os exoantígenos e mananas de *T. rubrum* inibiam a sua fagocitose pelos macrófagos (39). Além disso, em ensaios de linfoproliferação foi demonstrado que as mananas suprimem a resposta celular *in vitro* (41). Esse componente também inibe a proliferação de queratinócitos, o que permite que a infecção crônica se estabeleça (31).

1.3. Diabetes e suscetibilidade à dermatofitoses

O diabetes mellitus do tipo II (DM-II) é uma síndrome heterogênea resultante da deficiência da secreção e/ou ação da insulina, como a resistência insulínica e a falência das células beta do pâncreas (42,43).

O DM é uma patologia de alta prevalência e alta morbimortalidade. Em 2014, havia 387 milhões de casos de diabetes diagnosticados e 4,9 milhões de mortes em todo o mundo. Além do mais, cerca de 77% dos diabéticos vivem em regiões menos desenvolvidas. Em 2015, a Federação Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF) estimou que 8,8% da população mundial com 20 a 79 anos de idade (415 milhões de pessoas) vivia com diabetes. Se as direções atuais persistirem, o número de pessoas com diabetes poderá ser superior a 642 milhões em 2040 (44).

As moléstias de pele, usualmente negligenciadas e constantemente subdiagnosticadas em pacientes com diabetes, são implicações comuns e afetam tanto o diabético tipo I quanto o tipo II (45). Sabe-se que o aumento da incidência de infecções nesses pacientes apresenta curso clínico mais grave e são consideradas umas das complicações crônicas mais constantes durante a evolução da doença (46).

Várias desordens metabólicas e fisiológicas, como a doença vascular periférica, neuropatia diabética, obesidade, hipertrigliceridemia, alterações da resposta imunológica, hiperglicemia e os produtos finais de glicação avançada (AGEs) estão associadas a alta taxas de infecções em pacientes com DM (45,47).

Muitas teorias explicam como a hiperglicemia crônica acarreta danos celulares e teciduais no decorrer do DM. E dentro desse contexto, um dos fatores de grande importância é a formação dos AGEs (48). É sabido que os portadores de diabetes apresentam concentrações séricas de AGEs significativamente mais alta que os indivíduos não-diabéticos (49).

Os efeitos patológicos dos AGEs estão associados à habilidade destes compostos de alterar as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas, mediante produção de radicais livres, formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares. Com isso, promovem respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (50,51).

Os AGEs causam danos as células através de três mecanismos básicos, (i) atuam na modificação de estruturas intracelulares e aquelas envolvidas com a transcrição gênica, (ii) na interação de AGEs com proteínas da matriz celular que leva à modificações na sinalização entre as moléculas da matriz e da célula, e (iii) na modificação de proteínas ou lipídeos sanguíneos que podem ligar-se a receptores específicos e gerar a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento (48,51,52).

Dentre vários receptores de AGEs descritos na literatura, o receptor RAGE é provavelmente o mais bem caracterizado (40,41). Sua expressão está aumentada em macrófagos, monócitos, células musculares lisas, células endoteliais e astrócitos sob situações de excesso de AGEs (53,54). A interação AGE-RAGE ativa a transcrição do NF- κ B com subsequente liberação de IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), além do próprio RAGE (54).

Além dos AGEs, se faz necessário mencionar outro fator muito importante que pode favorecer o aumento das infecções em pacientes diabéticos; os níveis crônicos de hiperglicemia afetam a imunidade celular, debilitam o processo de fagocitose e a ação dos leucócitos polimorfonucleares (55), inibem a reprodução e migração de queratinócitos e a síntese proteica, induzem a apoptose de células endoteliais e diminuem a síntese de óxido nítrico (56,57).

1.4. Diabetes mellitus tipo II, Dermatofitose e Receptores de Reconhecimento Padrão

Embora a prevalência da morbidade do DM seja alta, dados específicos sobre complicações associadas a doenças de pele são restritos. A prevalência geral de distúrbios de pele em ambos os tipos de diabetes - DM-I e DM-II, varia entre 51,1 e 97% em diferentes regiões do mundo (58) e parte significativa dessas distúrbios são causadas por infecções fúngicas (59).

Avula et al (60) realizaram estudo observacional transversal em que avaliaram 200 pacientes diabéticos com manifestações cutâneas. Destes, 192 (96%) pacientes tinham DM-II e 8 (4%) tinham DM-I. As infecções cutâneas formaram o maior grupo de dermatoses (62%), entre as quais predominaram as infecções fúngicas (62%), seguida por infecções bacterianas (21%) e virais (4%). Além disso, sugere-se que pacientes diabéticos possuem um alto risco de desenvolver *tinea pedis* e onicomicose, e que estas podem contribuir para a síndrome do pé diabético (84).

Manzano-Gayosso (61) et al avaliaram a incidência de onicomicoses em 250 pacientes com DM-II. Noventa e três pacientes (37,2%) apresentavam distrofia nas unhas, destes, 75,3%, uma etiologia fúngica foi encontrada. Cinquenta e oito isolados fúngicos foram colhidos e 48,6% destes, eram dermatófitos, sendo o *Trichophyton rubrum* o mais prevalente (37,1%). Além disso, a correlação entre o tempo de evolução do DM-II e onicomicose foi significativa ($P < 0,01$).

Os mecanismos imunes inatos são utilizados pelo hospedeiro para responder a uma variedade de patógenos fúngicos de maneira rápida e conservada (62). Esses mecanismos são mediados por um conjunto limitado de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que são aptos para reconhecer estruturas conservadas de microrganismos, chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) Dentre as classes de PRRs, os receptores Toll-like (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs) e o receptor de manose (MR) estão bem descritos na literatura devido a sua importância no reconhecimento de diversas estruturas fúngicas e na imunidade antifúngica.

Os receptores toll-like (TLR) são proteínas transmembranas que exercem papel relevante na detecção, reconhecimento de patógenos e geração de sinais para a construção de proteínas e citocinas pró-inflamatórias (63,64). Estes receptores estão presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos e reconhecem os padrões moleculares associados à patógenos (PAMP's) presentes em agentes infecciosos, como bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus RNA e DNA, protozoários e fungos (63,65).

Entre os membros da família TLR, o TLR 2 e o TLR 4 têm demonstrado eficácia em reconhecer componentes bacterianos e fúngicos e mediar a produção de citocinas para o desenvolvimento de uma imunidade efetiva (66).

O TLR 2 reconhece os PAMP's de bactérias gram-positivas (lipoproteínas, lipopeptídeos e ácido lipoteicoico), peptidoglicano e *zymosan* (polissacarídeo derivado da parede celular de fungos) e atua para limitar o processo inflamatório e preservar a estrutura da epiderme. O TLR 4 reconhece lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas e mananas fúngicas (66,67).

Trabalhos demonstram que ambos - TLR 4 e TLR 2, estão associados à defesa do hospedeiro contra determinados fungos, como *Candida albicans* (67), *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* (68); e no reconhecimento do polissacarídeo presente no *Cryptococcus neoformans* (69).

Os receptores de lectina tipo C são primordiais para o reconhecimento de fungos, pois reconhecem as principais estruturas encontradas nas paredes de células fúngicas, como a β -glucana e manana, e atuam na indução das respostas imunes inatas e adaptativas. Além disso, indivíduos com deficiências genéticas em CLR's são suscetíveis a infecções fúngicas. A Dectina-1 e o receptor de manose (MR) fazem parte dos membros da família CLR's (70).

O receptor de manose (MR) está localizado no endossoma celular e está expresso nos macrófagos, células dendríticas (DCs) e em uma variedade de outros tipos celulares (71). É capaz de se ligar a manose, fucose, N-acetilglicosamina e glucose. Após o reconhecimento do carboidrato, este medeia a fagocitose do patógeno e conduz a morte celular (72). No entanto, é importante salientar que o receptor de manose não parece ter um papel crítico na resposta imune contra fungos. Em camungos, este receptor parece ser necessário apenas para a imunidade protetora a infecções por *C. neoformans* (73,74). Além disso, camungos *knockout* para este receptor não apresentam aumento significativo na suscetibilidade à infecção por patógenos fúngicos (75).

A Dectina-1 é um pequeno receptor transmembrana tipo II e reconhece β -glucanas como β -1,3 e β -1,6 e leveduras íntegras. É também capaz de mediar uma resposta celular a leveduras ou conídios a partir da indução de produção de citocinas pró-inflamatórias (76). Modelos experimentais em camundongos com infecção por *C. albicans* e *A. fumigatus*, a perda de Dectina-1 resultou na falha do sistema imune em montar respostas inflamatórias protetoras, como por exemplo, recrutamento de monócitos e neutrófilos defeituosos, desarranjo na produção de citocinas como IL-6 e fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF), e falha no controle do crescimento fúngico (76,77).

O papel dos PRRs em pacientes diabéticos na vigência de infecção dermatofítica não é conhecida. Em estudo experimental, nosso grupo verificou que camundongos diabéticos apresentam expressão aumentada de TLR-2 por monócitos periféricos e que, na vigência de infecção por *T. mentagrophytes* a expressão era ainda mais expressiva. Foi verificado também que camundongos diabéticos e *knockouts* para TLR-2 apresentam *clearance* fúngico mais rápido e uma resposta inflamatória mais regulada (78). Desse modo, os PRR's podem atuar tanto na eliminação do patógenos como na indução de efeitos deletérios, principalmente no contexto de hiperglicemia.

1.5. Justificativa

A incidência de dermatofitoses tem aumentado nos últimos anos, principalmente entre os indivíduos imunocomprometidos. Acompanhando esse crescimento, observa-se muitos casos de dermatofitose invasiva, cujo aspectos clínicos e imunológicos têm desafiado os pesquisadores, tanto pelo diagnóstico negligenciado e tardio, como pelo fato de pouco se conhecer sobre a relação dermatófito-hospedeiro.

Pacientes diabéticos são indivíduos que apresentam intensa atividade inflamatória desencadeada principalmente pelo excesso de glicose no sangue que induz a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) que, por sua vez, atuam na ativação de diversos leucócitos. No entanto, essa ativação imune não lhes confere proteção, visto que esses pacientes são mais susceptíveis à infecções, principalmente fúngicas e micobacterianas. Diante desse paradoxo, diversos estudos têm demonstrado uma associação entre a maior suscetibilidade e gravidade à essas infecções com uma resposta exacerbada e inadequada por fagócitos.

Uma exposição contínua de antígenos fúngicos dermatófitos poderia ser um fator importante na ativação de fagócitos e subsequente produção de mediadores inflamatórios que, amplificariam a resposta inflamatória desses pacientes. Considerando essa hipótese, inúmeras indagações tem sido levantadas: i) Dentre os receptores de reconhecimento padrão, quais estariam mais elevados em pacientes DM-II e com dermatofitose?; ii) Qual(is) receptor(es) estaria(m) envolvido(s) no reconhecimento de exoantígenos de fungos dermatófitos e subsequente ativação da resposta inflamatória?; iii) Bloqueando-se esses receptores, haveria diminuição da atividade pró-inflamatória de monócitos pelos pacientes com DM e infectados com dermatófito?

Assim, no presente estudo, buscamos investigar essas questões de modo a contribuir com

o conhecimento da relação dermatófito-hospedeiro, principalmente no contexto do DM-II, de modo a possibilitar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam interferir nesse mecanismo pode ser uma opção interessante na contenção de uma intensa resposta inflamatória.



Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar o papel dos receptores de manose, dectina-1, TLR-2, TLR-4 na ativação de monócitos de pacientes com DM-II e dermatofitose.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir e caracterizar exoantígenos de isolados de *T. rubrum* obtidos de pacientes com ou sem DM-II.
- Determinar a expressão dos receptores de manose, dectina-1, TLR-2 e TLR-4 em monócitos de pacientes com DM-II e grupo de indivíduos saudáveis.
- Inibir os receptores de manose, dectina-1, TLR-2 e TLR-4 e a via de sinalização NFκB de monócitos da linhagem THP-1; desafiar com *pool* de exoantígenos dos isolados de *T. rubrum*; e determinar a produção de IL-1β, TNF-α, MIP-1α.
- Validar os ensaios de inibição em células THP-1 utilizando monócitos de pacientes com DM-II e grupo de indivíduos saudáveis.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. White TC, Oliver BG, Gräser Y, Henn MR. Generating and Testing Molecular Hypotheses in the Dermatophytes. *Eukaryot Cell*. 2008;7(8):1238–45.
2. Weitzman I. RCS. the Dermatophytes. *Biol Rev*. 1995;8(2):240–59.
3. Teixeira N, Peres DA, Rossi A. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. 2010;85(5):657–67.
4. L B, Hainer M. Dermatophyte infections in Melbourne: Trends from 1961/64 to 2008/09. *Australas J Dermatol*. 2010;51(4):258–62.
5. Grappel SF, Bishop CT, Blank F. Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. *Bacteriol Rev* [Internet]. 1974;38(2):222–50.
6. Havlickova B, Czaika V a., Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2009;52(1):95.
7. Siqueira ER, Ferreira JC, Maffei CML, Candido RC. Occurrence of dermatophytes in samples of nails, feet and hands collected from college students. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(3):269–71.
8. Degreef H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia*. 2008;166(5-6):257–65.
9. Mendez-Tovar LJ. Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor. *Clin Dermatol*. Elsevier B.V.; 2010;28(2):185–9.
10. Wagner DK, Sohnle G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(3):317–35.
11. Rodwel G, Bayles C, Towersey L, Aly R. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. *Int J Dermatol*. 2008;47(4):339–43.
12. Mendel E. Tinea circinata and onychomycoses (*Trichophyton purpureum*): resistance to griseofulvin during uncontrolled diabetes. *Arch Dermatol*. 1960;82:1027.
13. Findling J, Tyrrell J, Aron D, Fitzgerald P, Young C, Sohnle P. Fungal infections in Cushing's syndrome. *Ann Intern Med*. 1981;95(3):392.
14. Blatt SP, Hendrix CW, Butzin C a., Freeman TM, Ward WW, Hensley RE, et al. Delayed-type hypersensitivity skin testing predicts progression to AIDS in HIV-infected patients. *Ann Intern Med*. 1993;119(3):177–84.

15. Jacobs JA, Kolbach DN, Vermeulen AHM, Smeets MHMG, Neuman HAM. Tinea Incognito Due to *Trichophyton rubrum* after Local Steroid Therapy . Clin Infect Dis. 2002;33(12):e142–4.
16. Lowinger-Seoane M, Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Aregall-Fusté S, Saballs P. Extensive dermatophytoses caused by *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis* in a patient with AIDS. Mycopathologia. 1992;120(3):143–6.
17. Tsang P, Hopkins T, Jimenez-Lucho V. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in a patient with AIDS. J Am Acad Dermatol. 1996;34(6):1090–1.
18. Novick NL, Tapia L, Bottone EJ. Invasive *trichophyton rubrum* infection in an immunocompromised host. Case report and review of the literature. Am J Med. 1987;82(2):321–5.
19. Squeo RF, Beer R, Silvers D, Weitzman I, Grossman M. Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host. J Am Acad Dermatol. 2005;39(2):379–80.
20. Ogawa H, RC S, Clemons K, Koga T, YP R, Rashid A, et al. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. Med Mycol. 1998;36:166–73.
21. Martinez-Rossi N, Persinoti G, Peres N, Rossi A. Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. Mycoses. 2012;55(5):381–7.
22. Zurita J, Hay R. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes in vitro. J Invest Dermatol. 1987;89(5):529–34.
23. Esquenazi D, Alviano CS, De Souza W, Rozental S. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Res Microbiol. 2004;155(3):144–53.
24. Duek L, Kaufman G, Ulman Y, Berdicevsky I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. J Infect. 2004;48(2):175–80.
25. Brasch J, Zaldua M. Enzyme patterns of dermatophytes. Mycoses. 1994;37(1-2):11–6.
26. Monod M. Secreted proteases from dermatophytes. Mycopathologia. 2008;166(5-6):285–94.
27. Brock M. Fungal metabolism in host niches. Curr Opin Microbiol. 2009;12(4):371–6.
28. Romani L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. J Leukoc Biol [Internet]. 2000;68(2):175–9.
29. Romani L. Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. Curr Opin Microbiol. 1999;2(4):363–7.
30. Almeida S. Immunology of dermatophytosis. Mycopathologia. 2008;166(5-6):277–83.

31. Tani K, Adachi M, Nakamura Y, Kano R, Makimura K, Hasegawa A, et al. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2007;299(8):381–7.
32. Szepes E, Magyarlaki M, Schneider I. Immunohistological characterization of the cellular infiltrate in dermatophytosis. 1993;206:203–6.
33. Calderon R a, Hay RJ. Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi, *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum*. *Immunology.* 1987;61(3):289–95.
34. Akiba H, Motoki Y, Satoh M, Iwatsuki K, Kaneko F. Recalcitrant trichophytic granuloma associated with NK-cell deficiency in a SLE patient treated with corticosteroid. *Eur J Dermatol.* 2001;11(1):58–62.
35. Jones HE. Immune response and host resistance of humans to dermatophyte infection. *J Am Acad Dermatol. American Academy of Dermatology, Inc.;* 1993;28(5):S12–8.
36. Dahl M. Dermatophytosis and the immune response. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31:34–41.
37. Leibovici L, Evron R, Axelrod O, Westerman M, Shalit M, Barak V, et al. Imbalance of immune responses in patients with chronic and widespread fungal skin infection. *Clin Exp Dermatol.* 1995;20(5):390–4.
38. Mignon B, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Vermout S. Immunization and dermatophytes. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21(2):134–40.
39. Campos MRM, Russo M, Gomes E, Almeida SR. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect.* 2006;8(2):372–9.
40. Diacovich L, Gorvel JP. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group;* 2010;8(2):117–28.
41. Blake J, Dahl M, Herron M, Nelson R. An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol.* 1991;96(5):657–61.
42. Ferrannini E. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev.* 1998;19(4):477–90.
43. Butler A, Janson J, S B-W, R R, Rizza E, Bulter P. β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in human with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003;52:102–10.
44. Federation I. IDF diabetes atlas. Brussels Int Diabetes Fed. 2013;6th ed.
45. Wang YR, Margolis D. The prevalence of diagnosed cutaneous manifestations during ambulatory diabetes visits in the United States, 1998-2002. *Dermatology.* 2006;212(3):229–34.

46. Shah BR, Hux JE. Quantifying the Risk of Infectious diseases in patients with DM. *Diabetes Care*. 2003;26(2):510–3.
47. Cathcart S, Cantrell W, Elewski B. Onychomycosis and diabetes. *J if Eur Acad Dermatology Venereol*. 2009;23(10):1119–22.
48. Sander B, Thornit DN, Colmorn L, Strøm C, Girach A, Hubbard LD, et al. Biology of Diabetic Complications. *Ayu [Internet]*. 2017;414(2):3–12.
49. Sharp PS, Rainbow S, Mukherjee S. Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabet Med*. 2003;20(7):575–9.
50. Jakuš V, Rietbrock N. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiol Res*. 2004;53(2):131–42.
51. Bierhaus A, Hofmann M a., Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*. 1998;37(3):586–600.
52. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615–25.
53. Lin L. RAGE on the Toll Road? *Cell Mol Immunol*. 2006;3(5):351–8.
54. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Watanabe T, Yamamoto H. Roles of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Diabetes-Induced Vascular Injury. *J Pharmacol Sci*. 2005;97(3):305–11.
55. Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M, Goff M Le, Allannic H, Genetet B. Impaired Leucocyte Functions in. *Diabet Med*. 1997;14(September 1996):29–34.
56. Blakytyn R, Jude EB. Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*. 2009;8(2):95–104.
57. Behm B, Schreml S, Landthaler M, Babilas P. Skin signs in diabetes mellitus. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2012;26(10):1203–11.
58. De Macedo GMC, Nunes S, Barreto T. Skin disorders in diabetes mellitus: An epidemiology and physiopathology review. *Diabetol Metab Syndr. BioMed Central*; 2016;8(1):1–8.
59. Perez M, Kohn S. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus. *J Am Acad Dermatol*. 1995;4:143–114.
60. Avula S, Masthansahib D, ML. M. Cutaneous Manifestation of Diabetes Mellitus: A Cross-Sectional Study in a Tertiary Care Hospital. *IJMAS*. 2014;2(3):261–6.
61. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, Palacios-Morales Y, Córdova-Martínez E, Bazán-Mora E, et al. Onychomycosis incidence in type 2 diabetes mellitus patients. *Mycopathologia*. 2008;166(1):41–5.

62. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2011;11(4):275–88.
63. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2010;11(5):373–84.
64. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: Focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med*. 2007;261(6):511–28.
65. Bowie a. G. Translational mini-review series on Toll-like receptors: Recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(2):217–26.
66. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*. 2003;300(5625):1524–5.
67. Roeder A, Kirschning CJ, Rupec R a., Schaller M, Korting HC. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol*. 2004;12(1):44–9.
68. Meier a., Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol*. 2003;5(8):561–70.
69. Shoham S, Huang C, Chen J-M, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-Like Receptor 4 Mediates Intracellular Signaling Without TNF- α Release in Response to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide Capsule. *J Immunol*. 2001;166(7):4620–6.
70. Brown GD. Innate antifungal immunity : the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol*. 2012;(3):1–21.
71. Sallusto BF, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class II Compartment: Downregulation by Cytokines and Bacterial Products. *J Exp Med*. 1995;182(August):389–400.
72. Hollmig ST, Ariizumi K, Cruz PD. Recognition of non-self-polysaccharides by C-type lectin receptors dectin-1 and dectin-2. *Glycobiology*. 2009;19(6):568–75.
73. Dan JM, Kelly RM, Lee CK, Levitz SM. Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*. 2008;76(6):2362–7.
74. Lee SJ, Zheng N, Clavijo M, Nussenzweig MC, Al LEEET, Mmun INI. Normal Host Defense during Systemic *Candidiasis* in Mannose Receptor-Deficient Mice. 2003;71(1):437–45.
75. Swain SD, Lee SJ, Nussenzweig MC, Harmsen AG. Absence of the Macrophage Mannose Receptor in Mice Does Not Increase Susceptibility to *Pneumocystis carinii* Infection In Vivo. *Infect Immun*. 2003;71(11):6213–21.

76. Werner JL, Metz AE, Horn D, Schoeb TR, Hewitt MM, Schwiebert LM, et al. Requisite role for the Dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus* 1. 2012;182(8):4938–46.
77. Taylor PR, Tsoni SV, Willment J a, Dennehy KM, Findon H, Haynes K, et al. Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Immunity*. 2007;8(1):31–8.
78. Almeida DDF, Fraga-Silva TFDC, Santos AR, Finato AC, Marchetti CM, Golim MDA, et al. TLR2^{-/-} Mice Display Increased Clearance of Dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* in the Setting of Hyperglycemia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(January):1–12.

Manuscrito I

Influence of mannose, dectin-1, TLR-2 and TLR-4 receptors on the activation of monocytes from patients with type 2 diabetes mellitus and infected with the dermatophyte *Trichophyton rubrum*

Thainá Sanches Paixão^{1,2}, Débora de Fátima Almeida^{1,2}, Barbara Casella Amorim^{1,2}, Maria Izilda de Andrade³, Vânia Nieto Brito^{2,3}, Camila de Oliveira Rodini⁴, James Venturini^{5*}

¹ Faculdade de Ciências, UNESP – Univ Estadual Paulista, Av. Eng. Luiz Edmundo C. Coube 14-01, Bauru, SP, Brazil.

² Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP, Brazil.

³ Instituto Lauro de Souza Lima, s/n, Bauru, SP, Brazil.

⁴ Universidade de São Paulo, USP – Faculdade de Odontologia de Bauru, Av. Alameda Doutor Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Bauru - SP, Brasil

⁵ Faculdade de Medicina, UFMS – Univ Federal do Mato Grosso do Sul, Cidade universitária, s/n, Campo Grande, MS, Brazil.

***Reprints or correspondence:** Dr. James Venturini, Faculdade de Ciências, UNESP – Univ Estadual Paulista, Av. Eng. Luiz Edmundo C. Coube 14-01, 17033-360, Bauru, SP, Brazil. +55(14) 31036078 (james@fc.unesp.br)

Key Words: Diabetes mellitus type 2, pattern recognition receptors, *Trichophyton rubrum*

ABSTRACT

Dermatophytoses are fungal infections caused by dermatophytic fungi that usually affect the cornea layer of the skin, hair and nails, but under certain conditions may present invasive involvement. The species *Trichophyton rubrum* is the dermatophyte most often isolated in clinical specimens. In addition patients with type II diabetes mellitus (DM-II) are more susceptible to this fungal infection. The dermatophyte-host relationship is poorly understood. However, the pro-inflammatory profile observed in patients with hyperglycemia is a complicating condition in this relationship. The pattern recognition receptors (PRRs) present in phagocytes, such as the mannose (MR), dectin-1, toll-like (TLR) -2 and -4 receptor, recognize fungal structures and are responsible for triggering mechanisms of cellular activation and regulation during the inflammatory process, as well as influence on the polarization of the adaptive immune response. Thus, any interference in this process may impair the host to effectively and pathogenically eliminate pathogens. Thus, the present study aims to determine the role of these receptors in the activation of monocytes of patients with DM-II. Exoantigens of *T. rubrum* were obtained from patients with diabetes and normoglycemic individuals. PRRs were blocked in THP-1 monocytes and monocytes from DM-II patients and normoglycemic individuals challenged with Exo_Tr_NG and Exo_Tr_DM. Subsequently, TNF and MIP-1 α and IL-1 β were dosed. The expression of these receptors was evaluated by flow cytometry. No statistical difference were observed in the monocyte inhibition assay of diabetic patients and normoglycemic individuals and in receptor expression. However, our results suggest that the receptors act on the recognition of exoantigens of *T. rubrum* obtained from diabetic patients and normoglycemic individuals with consequent release of inflammatory mediators that may act by amplifying the inflammatory process of these patients.

INTRODUCTION

Dermatophytoses are fungal infections that usually affects skin, hair, hair, and nails. A group of fungi called dermatophytes cause this disease and belongs to the genera *Trichophyton*, *Microsporum*, and *Epidermophyton* (1,2). Among the dermatophytes, the species *T. rubrum* is the most common etiological agent in humans and is responsible for up to 80% of cases of dermatophytosis (3). A mild local inflammatory response and chronicity characterize the dermatophytosis caused by *T. rubrum*. Also, the infection presents a low response to antifungal therapy, and frequent relapses are observed (4,5).

Skin diseases are usually neglected and constantly underdiagnosed in patients with both types I and II of Diabetes Mellitus (DM) (6-7). Metabolic and physiological disorders, including peripheral vascular disease, diabetic neuropathy, obesity, hypertriglyceridemia, impaired immune response, hyperglycemia, and advanced glycation end products (AGEs), are associated with high infection rates in patients with DM (6,8). Therefore, chronic hyperglycemia affects the cellular immunity, macrophage activity, functions of polymorphonuclear cells (9), proliferation and migration of keratinocyte, and viability of endothelial cell apoptosis (10,11).

The immune mechanisms are used by the host to respond to a variety of fungal pathogens in a rapid and conserved manner (12). These mechanisms are mediated by a limited set of pattern recognition receptors (PRRs), which are able to recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (13).

Although the importance of recognizing various fungal structures and antifungal immunity of PRRs is well described in the literature, the role of PRRs in diabetic patients in the presence of dermatophytic infection is not known. In an experimental study, our group verified that diabetic mice presented increased expression of TLR-2 by

peripheral monocytes and that, during the period of infection by *T. mentagrophytes*, the expression was even more expressive. It was also observed that diabetic mice and TRL-2 knockouts show faster fungal clearance and a more regulated inflammatory response (14) . Thus, pattern recognition receptors can act both in the elimination of pathogens and in the induction of deleterious effects, especially in the context of hyperglycemia. In addition, continuous exposure to dermatophyte fungal antigens could be an important factor in phagocyte activation and subsequent production of inflammatory mediators that would amplify the inflammatory response of these patients. Thus, in the present study we sought to investigate the influence of these receptors in order to contribute to the knowledge of the dermatophyte-host relationship, especially in the context of DM-II.

MATERIALS AND METHODS

Patients. The sample of this study included 10 unrelated patients seen at the Dermatology Outpatient Clinic of the Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, SP. The cases that were diagnosed with DM-II, confirmed by clinical and laboratory tests, after signing the Informed Consent Form were included. Exclusion criteria were history of other chronic infections and inflammatory and / or autoimmune diseases.

Group control. The control group consisted of 7 subjects who, after clinical evaluation, are characterized as non-ill. Exclusion criteria were history of chronic infections and inflammatory and / or autoimmune diseases. These individuals were selected from patients treated at the same hospital, but did not have the diseases diagnosed after signing the consent form. These individuals were selected from patients treated at the

same hospital, but did not have the diseases diagnosed after signing the consent form. Information on age, ethnicity and gender of controls was taken from all cases and controls. Ethnic classification was made according to parental ethnicity and morphological characteristics of the individual. The following ethnic classes were adopted: black, white and brown (Table 1).

Fungi. Ten isolates of *T. rubrum* from lesions of skin and nails of DM (n=5) and normoglycemic (n=5) patients. Enrolled patients were recruited at Instituto Lauro de Souza Lima – ILSL, Bauru, SP, Brazil. The isolates were confirmed by morphological evaluation in the microculture technique and maintained in solid medium containing Sabouraud at 37° C.

Exoantigen production. Total exoantigen was produced according to Venturini et al. (15) with modifications. Briefly, the fresh cultures of *Trichophyton rubrum* (maximum of three passages), were subcultured to several tubes Sabouraud containing 2% of dextrose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and maintained at 25°C, for 16 days. The fungi were cultivated in supplemented Sabouraud broth for seven days shaking at 50 rpm at 37°C. The fungi were killed by the addition of sodium Merthiolate (0.2 g/L) for 24 hours at 4°C and filtered in Whatman™ filter paper #1. The filtrate was dialysate against distilled water with several exchanges during 24 hours at 4°C. The dialysate was then filtered and concentrated by centrifugation with Amicon® Ultra 15 Filter (Millipore, Billerica, MA, USA) at 4000 rpm, for 30 minutes, at 4°C. The protein concentration was determined by Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Exoantigens were pooled according to the origin of the isolates: *T. rubrum* exoantigens from DM patients (Exo-Tr-DM) and *T. rubrum* exoantigens from normoglycemic patients (Exo-Tr-NG).

THP-1 culture. THP-1 cell line was maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ 95% air atmosphere in RPMI (Sigma-Aldrich), containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich) in culture flasks (Greiner BioOne, Frickenhausen, BW, GER).

Obtaining peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Peripheral blood was obtained by venipuncture and 30 mL were placed in sterile tubes containing 20 U / mL heparin. Mononuclear cells were washed with 0.1 M phosphate buffer saline pH 7.2 (PBS) and 0.01 M EDTA (4 ° C) and recovered by Ficoll-Hypaque gradient separation for 30 min at 1500 RPM. The cloud containing the mononuclear cells was collected and then centrifuged for 10 min at 1500 RPM. Subsequently, the supernatant was discarded and the cells were resuspended in 1 mL RPMI 1640 culture medium (Gibco) supplemented with 2.0 mM L-glutamine, 40 mg / mL gentamicin and 10% fetal bovine serum (RPMI medium). complete). Counting and cell viability were performed with 0.1% Trypan Blue. Cell concentration was adjusted to 10⁷ cells / mL and frozen in -80 ° C freezer. After adjustment, the total of 10⁷ cells / ml was transferred to a cryotube and centrifuged at 400g, 5 minutes at 18 ° C. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in freezing medium (60% RPMI + 30% fetal bovine soto + 10% DMSO). Subsequently, the cryotubes were kept in a cooler for 24 hours at -80 ° C and then stored.

Inhibition assays. THP-1 cells were grown in 24-well plates (2x10⁵ cells / well). Anti-TLR2 (10ul/well), anti-TLR-4 (10ul/well), anti-MR (10ul/well), and anti-Dectina-1 (10ul/well) monoclonal antibodies were added in the cultures for one hour. Subsequently, the cells were challenged with Exo-Tr-DM and Exo-Tr-NG at concentrations of 1.0, 10, and 50ug/ml. After 24 hours, cell-free supernatants were collected and stored at -80°C. To validate the inhibition assay performed on THP-1

monocytes, monocytes from normoglycemic individuals and diabetic patients were challenged with Ex-Tr_DM and Ex-Tr_NG at an intermediate concentration of 10ug/ml.

Immunophenotyping. PBMC cell suspensions were washed in 5% PBS-SBF solution at 4 ° C, blocked with blocking buffer (2% mouse serum) for 20 minutes on ice. They were then centrifuged at 5 minutes for 1500 RPM at 4 ° C and incubated with conjugated antibodies (anti-CD14-PercP (MACS), dectin-1-PE (eBioscience - Thermo Fisher Scientific), MR-PE (eBioscience - Thermo Fisher Scientific) , TLR-2-FITC (eBioscience - Thermo Fisher Scientific) and TLR-4-APC (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 4 ° C. After Staining buffer (BD) washing, samples were fixed with FVS450 (BD). Biosciences) and acquisition was performed on FACS Aria Fusion™ (BD Biosciences) and data analyzed in FlowJo 7.5.5 software (Tree Star, Inc).

Dosages of TNF, IL-1 β e MIP-1 α . Levels of these mediators were performed using the kit Duo-Set Kit (R&D Systems, Minneapolis, MI, USA), according to the manufacturer's instructions. The results were expressed in pg/mL, and determined from standard curves established for each assay.

Statistical analyses. The two matched groups were compared using the paired t-test. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software. Inc., San Diego, California, USA) at a significance level of 5 % ($p < 0.05$).

RESULTS

TLR-2, TLR-4, Dectin-1 and Manose receptor expression in monocytes of DM-II patients and normoglycemic subjects

There was no statistical difference between receptor expressions in patients with DM-II and normoglycemic subjects (Fig. 1).

Inhibition of TLR-2, TLR-4, Dectin-1 and Mannose receptors in the monocytes of normoglycemic individuals and diabetic patients

First, it was necessary to evaluate the results of unstimulated cells with cells stimulated by both exoantigens. When analyzing the data, we observed that there was a statistical difference between unstimulated cells and cells stimulated with Ex_Tr_NG and Ex_Tr_DM.

Monocytes from Ex_Tr_NG-stimulated diabetic patients show a significant increase in TNF, IL-1 β , and MIP-1 α when compared to unstimulated culture. Monocytes from normoglycemic individuals showed a significant increase in MIP-1 α levels by both exoantigens.

Monocytes from diabetic patients and normoglycemic subjects did not show significant reductions in TNF, IL-1 β and MIP-1 α levels after receptor inhibition. Interestingly, after receptor inhibition, increased levels of these mediators were observed mainly in the monocytes of both normoglycemic individuals challenged with Ex_Tr_NG and Ex_Tr_DM. But, this increase was not significant.

However, even though there was no statistical difference in inhibitions, we observed that after inhibition of TLR-2 monocytes from diabetic patients challenged

with Ex_Tr_NG showed a decrease in IL-1 β and MIP-1 α levels (Fig. 2C and 2E). And monocytes from diabetic patients challenged with Ex_Tr_DM showed a reduction in MIP-1 α levels. (Fig. 2F).

TLR-4 inhibition also showed reduced TNF levels in cells of Ex_Tr_NG-stimulated diabetic and normoglycemic patients (Fig. 3A). Monocytes from diabetic patients challenged with Ex_Tr_DM also showed a reduction in MIP-1 α levels (Fig. 3F).

Regarding Dectin-1, after its inhibition we observed a reduction in IL-1 β , MIP-1 α and TNF levels in monocytes of Ex_Tr_NG-stimulated diabetic patients (Fig. 4A, 4C and 4E). And a reduction in MIP-1 α levels in monocytes from Ex_Tr_DM-stimulated diabetic patients (Fig. 4F).

Inhibition of the mannose receptor showed a reduction in TNF levels in monocytes from Ex_Tr_NG stimulated normoglycemic subjects. Ex_Tr_NG-stimulated diabetic monocytes also showed a reduction in TNF and IL-1 β levels (Fig. 5A and 5B). Monocytes from diabetic patients stimulated with Ex_Tr_DM showed a reduction in MIP-1 α levels (Fig. 5F).

Inhibition of receptors TLR-2, TLR-4, Dectin-1 and Manose in the TPH-1

Cells of the THP-1 line were challenged with exoantigens of *T. rubrum* obtained from normoglycemic subjects and diabetic patients. Cultures challenged with both exoantigens without inhibitor showed a high production of TNF and MIP-1 α . The exoantigens obtained from diabetic patients induced higher levels of TNF- α , at concentration 50 ug/ml, than exoantigens of the fungi isolated from normoglycemic individuals (Fig. 6). On the other hand, exoantigens obtained from normoglycemic

individuals induced high production of MIP-1 α at concentration 50ug /ml (Fig. 7). Next, we evaluated the role of three PPRs in the activation of THP-1 monocytes challenged with different exoantigens.

The inhibition of TLR-2 increased at lower levels of TNF at concentrations of 1 and 10ug ml of Exo_Tr_NG-stimulated cells and at 1ug / ml concentration of Exo_Tr_DM-stimulated cells (Fig. 8A). We also observed a decrease in MIP-1 α levels by Exo_Tr_DM-stimulated cells and Exo_Tr_NG-stimulates cells at a concentration of 1ug/ml. On the other hand, the inhibition of TLR-2 induced high production of MIP-1 α by Exo_Tr_DM-stimulated cells at concentration of 50ug/ml (Fig. 8B).

Inhibition of TLR-4 did not result in statistically significant differences in TNF production (Fig. 9A). On the other hand, a decrease in MIP-1 α levels was observed in Exo_Tr_DM-stimulated cells and Exo_Tr_NG-stimulated cells at concentration of 1ug/ml (Fig. 9B).

The inhibition of Dectin-1 receptor increased levels of TNF at concentrations of 10ug/ml in Exo_Tr_DM-stimulated cells and Exo-Tr-NG-stimulated cells and at a concentration of 50ug/ml of Exo_Tr_DM (Fig. 10A). On the other hand, higher TNF levels were observed Ex_Tr_DM-stimulates cell and Ex_Tr_NG-stimulates cell at a concentration of 1ug/ml. Moreover, the inhibition of Dectin-1 triggered lower production of MIP-1 α by Exo_Tr_DM-stimulated cells and by Exo_Tr_NG-stimulated cells at concentrations of 1 and 50ug/ml (Fig. 10B).

The inhibition of MR increased in high TNF production by Exo_Tr_DM-stimulated cells and lower TNF production by Exo-Tr-NG-stimulated cells at concentrations of 1, 10 and 50ug/ml (Fig. 11A). On the other hand, lower production of MIP-1 α by Exo_Tr_NG-stimulated cells and Exo_Tr_DM-stimulated cells at concentrations of 1 and 50ug/ml were observed (Fig. 11B).

IL-1 β levels could not be detected in the THP-1 inhibition assay.

DISCUSSION

Our study is the first to use and compare exoantigens obtained from normoglycemic individuals and diabetic patients to assess their recognition through PRRs and their subsequent influence on monocyte activation in patients with DM-II.

Both the inhibition assay and the evaluation of receptor expression in monocytes of diabetic patients and normoglycemic subjects showed no statistical differences. We believe that the reduced number of participants may have been a bias towards the non-significance in the results. In addition, our work had an extensive exclusion criterion which led to the exclusion of some participants during the research.

However, although statistical tests have not shown significance, we can suggest that the TLR-2, TLR-4, Dectin 1 and mannose receptor are involved in the recognition of these exoantigens.

Both Exo_Tr_DM and Exo_Tr_NG were able to stimulate the release of inflammatory mediators in both THP-1 monocytes and monocytes obtained from diabetic patients and normoglycemic individuals. Furthermore, we observed that after inhibition of receptors on THP-1 cells there was a significant reduction in TNF and MIP-1 α levels, indicating their participation in exoantigen recognition.

TLRs are abundantly expressed in monocytes and play an important role in activation and regulation of the innate immune system and in inflammation (16). Bellochio et al (17), in an experimental work, showed that TLR-2 and TLR-4 have different functions in activating the innate immune response against *C. albicans* and *A.*

fumigatus, and that these can activate NF- κ B and induce the expression of inflammatory cytokines and costimulatory molecules.

However, activation of the innate immune system via TLRs is implicated in the pathogenesis of insulin resistance, diabetes and atherosclerosis (18,19). For example, activation of TLR-4 by microbial components such as LPS and free fatty acids causes an increase in the serum level of various proinflammatory cytokines and consequent insulin resistance. In addition, studies have shown that activation of the MyD88 pathway is increased in monocytes exposed to high glucose levels and in patients with DM-I (16,20,21).

In the hyperglycemic context and dermatophytic infections, Almeida et al (14), in an experimental study with diabetic mice infected with *T. mentagrophytes* dermatophyte observed that the absence of TLR-2 led to a regulated immune response, with Treg expansion, increased H₂O₂ and IL-10 production by adherent peritoneal cells, and decreased TNF production. Corroborating these findings, Devajari et al (22) in an experimental study also observed an attenuation in the pro-inflammatory response in

Dectin-1 is a crucial PRR involved in dermatophytosis immunology. The CARD9 mutation, a key molecule in the type C lectin receptor (CLR) signaling pathway, has been reported to be associated with the evolution of deep dermatophytosis (23). Yoshikawa et al (24) observed that mice without Dectin-1 and / or Dectin-2 showed an inadequate production of proinflammatory cytokines in response to *T. rubrum* infection, impairing their resolution. On the other hand, dectin-1 is involved in several cellular responses that play a relevant role in chronic inflammatory conditions such as autoimmunity, inflammatory bowel disease and diabetes (25). In addition, dectin-1 may be a key factor in the evolution of inflammation associated with insulin resistance and obesity.

The receptor mannose, also known as CD206 plays an important role in the early stage of fungal inflammation (26). This receptor has been characterized as a mediator of phagocytosis and death of pathogenic microorganisms (27); however, its role in fungal infections has not been fully clarified. Several antifungal activities related to MR have been demonstrated, including the production of IL-17 from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with *C. albicans* mannan (28) and phagocytosis of yeast *C. albicans* by dendritic cells (DCs) (29). Despite these roles in antifungal immunity, MR appears to be redundant (30), except for *C. neoformans* infection, in which MR^{-/-} mice were highly susceptible due to inadequate CD4 T cell response (31).

Many studies demonstrate that the hyperglycemic context can influence the expression of pattern recognition receptors in immune system cells. Therefore, we evaluated the expression of these receptors in normoglycemic individuals and diabetic patients. However, we believe that due to the small number of participants, it was also not possible to detect significant differences between the groups. But, when looking at the results we suggest that diabetic patients showed an increase in TLR-2 expression when compared to normoglycemic individuals and a small decrease in TLR-4, dectin-1 and mannose receptor expression.

Devaraj et al (20) observed that TLR-2 and TLR-4 were significantly increased in monocytes of patients with DM-I compared to controls. In another study, Dasu et al (21) also observed increased expression of TLR-2 and TLR-4 in monocytes of patients with DM-II, which resulted in increased NF-kB-mediated inflammation elevating inflammation systemic.

The expression of dectin-1 in the hyperglycemic context has yet to be clarified. However, Espinosa-Cortez et al (32), found an increase in dectin-1 expression in

monocytes of patients with DM-II.

The role of the mannose receptor is not well understood in the hyperglycemic context. However, Al Dubayee et al (33) demonstrated an increase in the expression of this receptor in PBMCs of patients with DM-II, but studies need to be conducted in order to clarify the influence of this receptor in the context of diabetes.

Although our results with patient cells did not give significant statistical differences, the inhibition results on THP-1 monocytes confirm the hypothesis that receptors are involved in the recognition of these exoantigens and that they are capable of stimulating the production of mediators which would amplify the inflammatory process in diabetic patients. However, we believe that studies using a larger number of patients could indeed clarify the role of these receptors in cells of diabetic patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for T.S.P. Master Scholarship.

Table 1. Clinical conditions and comorbidities of patients.

Patient identification	Ethnicity	Sex	Years	Clinical condition	Comorbidities
P01	Brown	Male	22 years	Normoglicemic	Acne
P02	Brown	Male	55 years	Normoglicemic	None
P03	Brown	Male	58 years	Normoglicemic	None
P04	White	Female	47 years	Normoglicemic	None
P05	Brown	Feminino	37 years	Normoglicemic	None
P06	Brown	Female	34 years	Normoglicemic	None
P07	Brown	Male	43 years	Normoglicemic	None
P08	Brown	Male	59 years	Diabetic	DM-II Hypertension
P09	White	Female	62 years	Diabetic	DM-II Hypertension Dyslipidemia
P10	Pardo	Male	67 years	Diabetic	DM-II Hypertension
P11	White	Male	38 years	Diabético	DM-II Hypertension
P12	Brown	Male	67 years	Diabetic	DM-II Hypertension
P13	White	Female	64 years	Diabetic	DM-II Hypertension
P14	White	Female	41 years	Diabetic	DM-II
P15	White	Female	63 years	Diabetic	DM-II Hypertension
P16	Brown	Male	41 years	Diabetic	DM-II Hypertension
P17	White	Female	54 years	Diabetic	DM-II

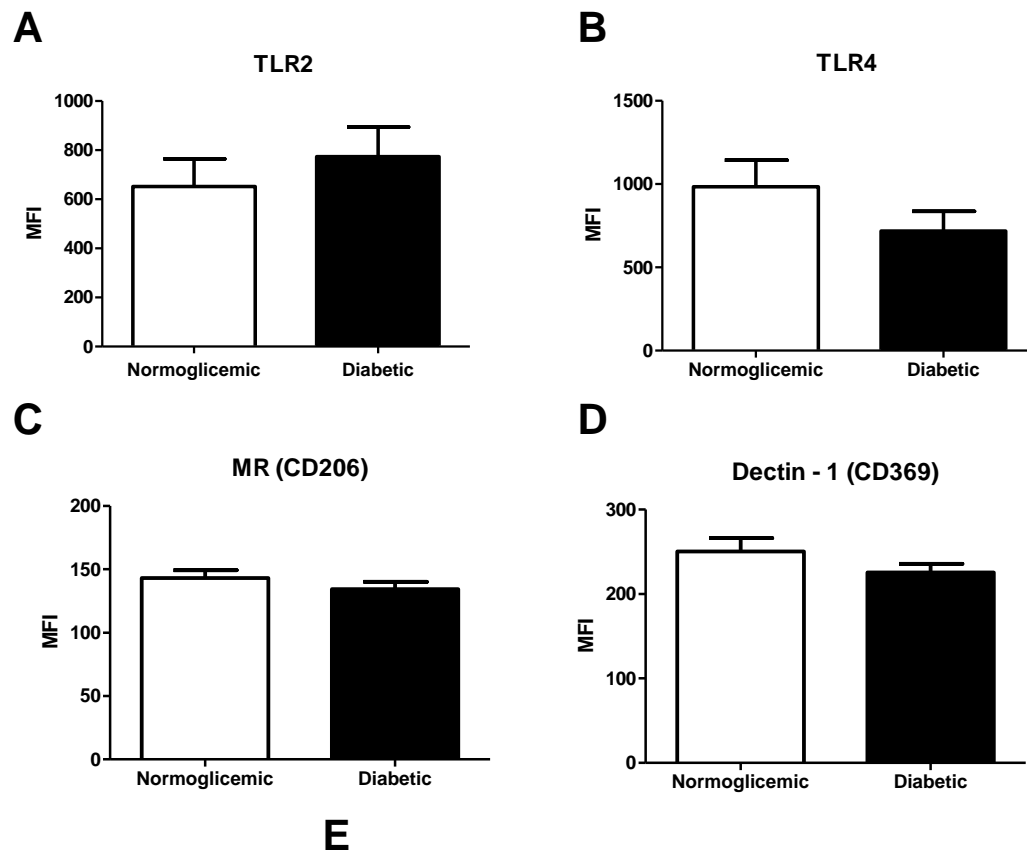


Figure 1. Expression of receptors in monocytes normoglycemic individuals and diabetic.

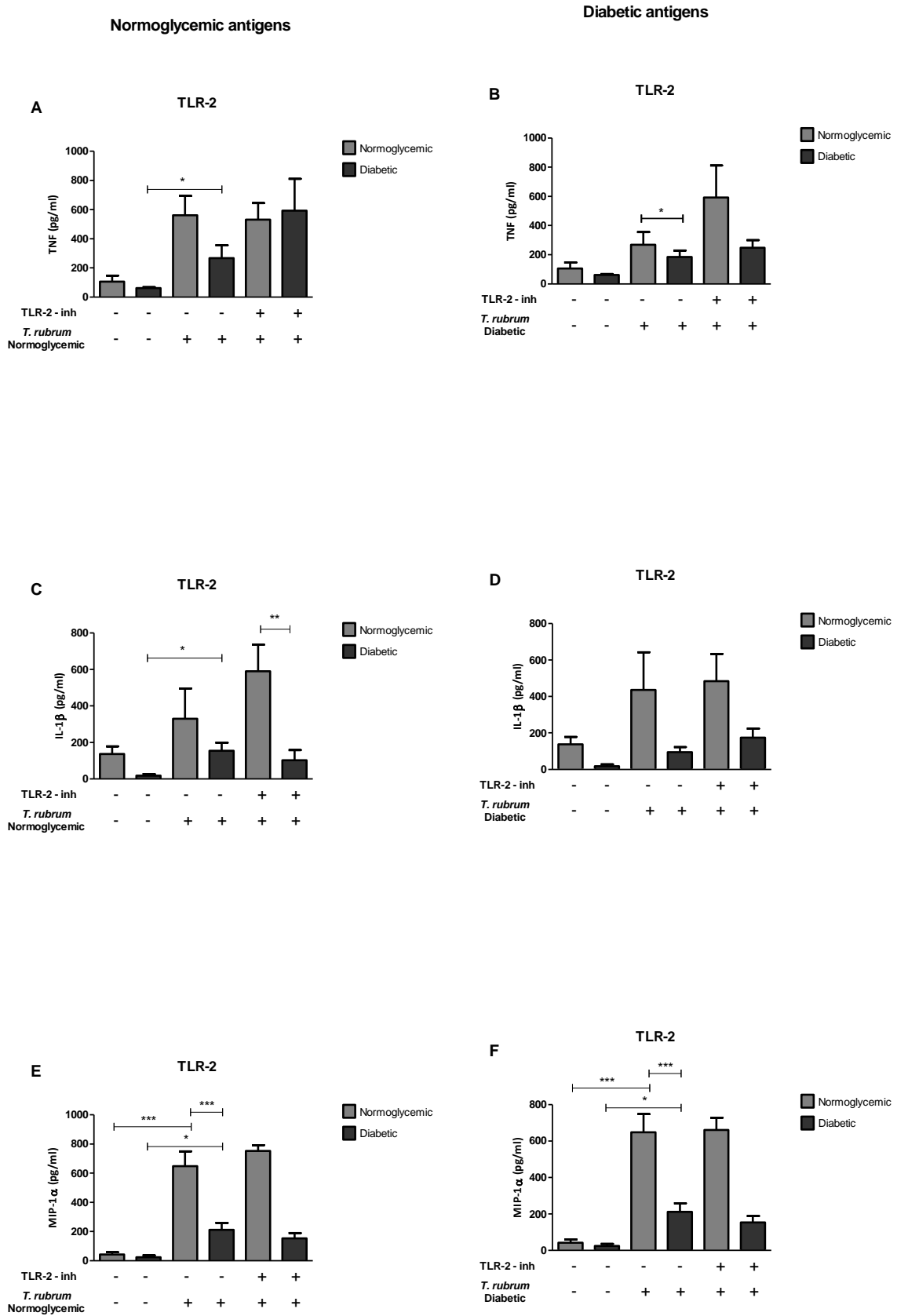


Figure 2. TLR-2 Inhibition in monocytes of diabetic patients and individuals normoglycemic. Results are expressed as mean \pm SEM. (Unpaired t-test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

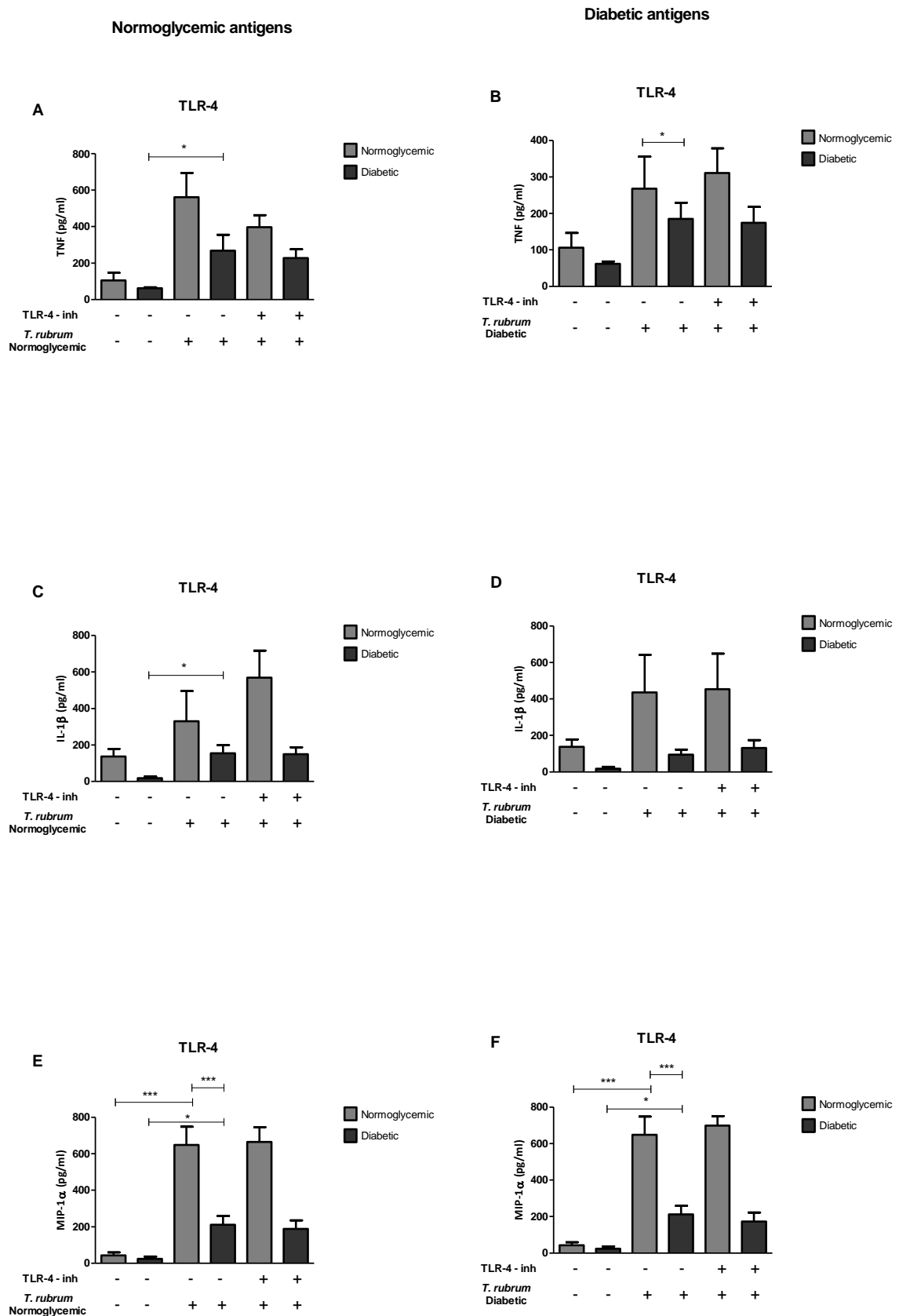


Figure 3. TLR-4 Inhibition in monocytes of diabetic patients and individuals normoglycemic. Results are expressed as mean \pm SEM. (Unpaired t-test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

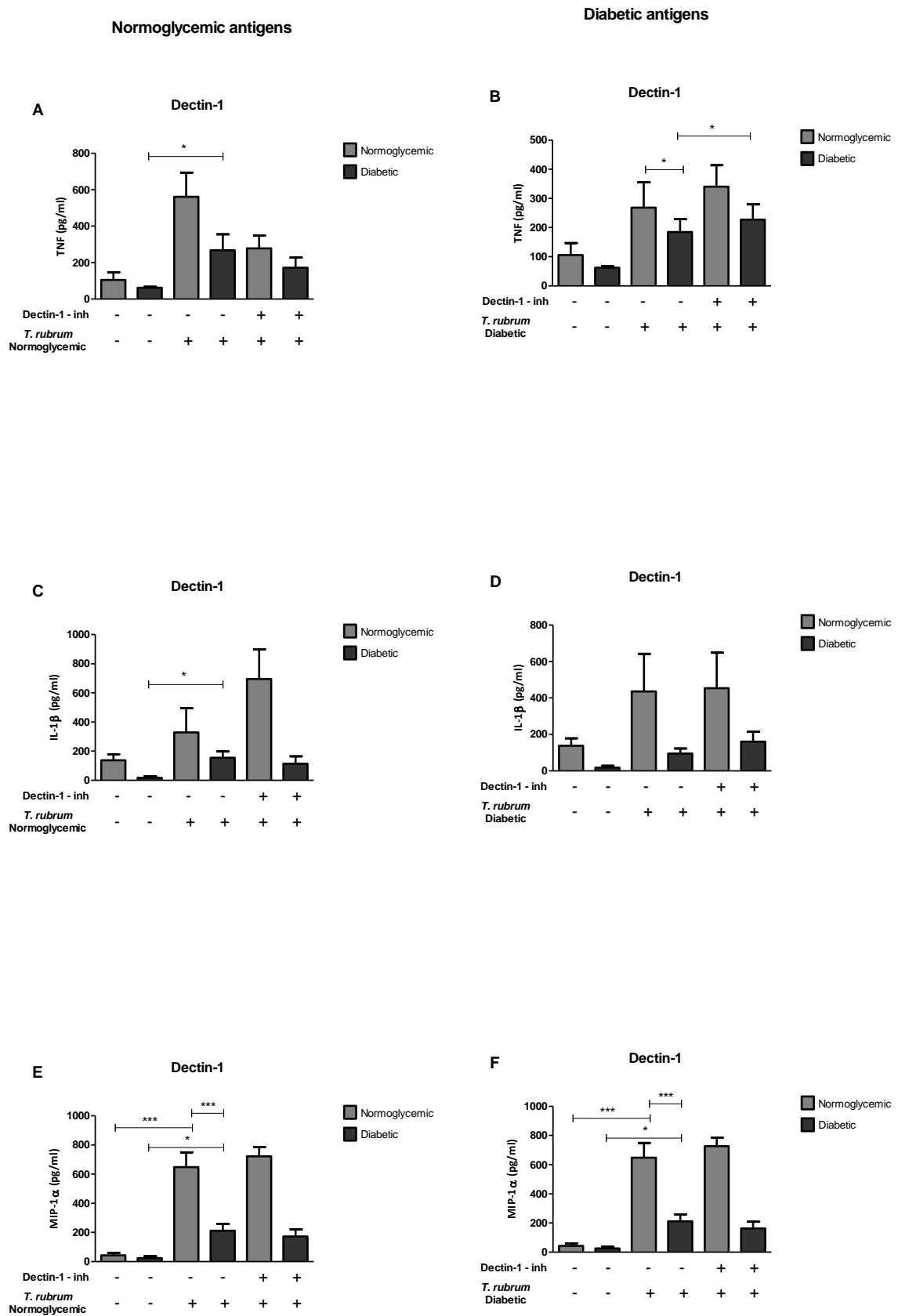


Figure 4. Dectin-1 Inhibition in monocytes of diabetic patients and individuals normoglycemic. Results are expressed as mean \pm SEM. (Unpaired t-test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

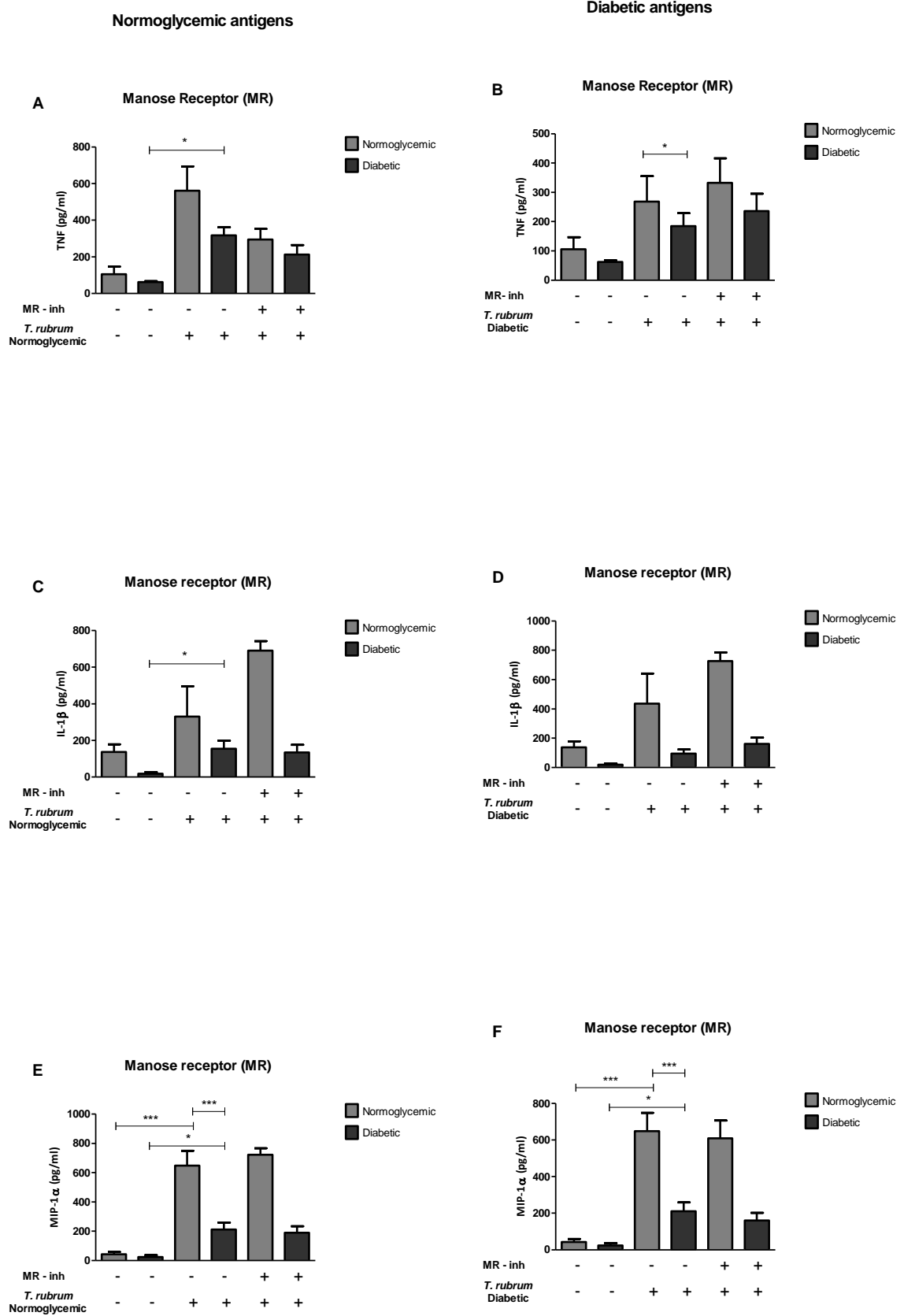


Figure 5. Manose receptor Inhibition in monocytes of diabetic patients and individuals normoglycemic. Results are expressed as mean \pm SEM. (Unpaired t-test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

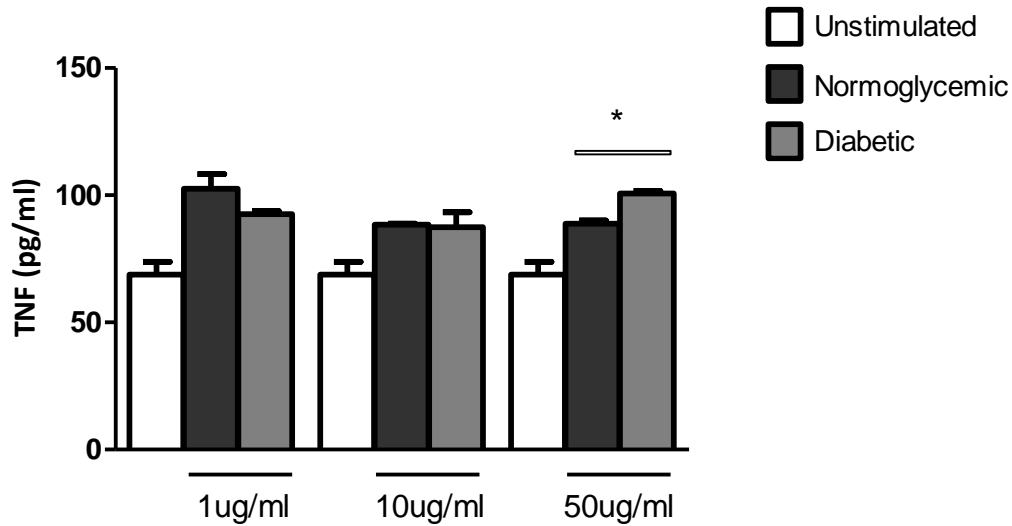


Figure 6. Comparison of the TNF production by 24-hour challenged THP-1 monocytes with exoantigens obtained from normoglycemic individuals and diabetic patients. Results are expressed as mean \pm SEM. (Paired t-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

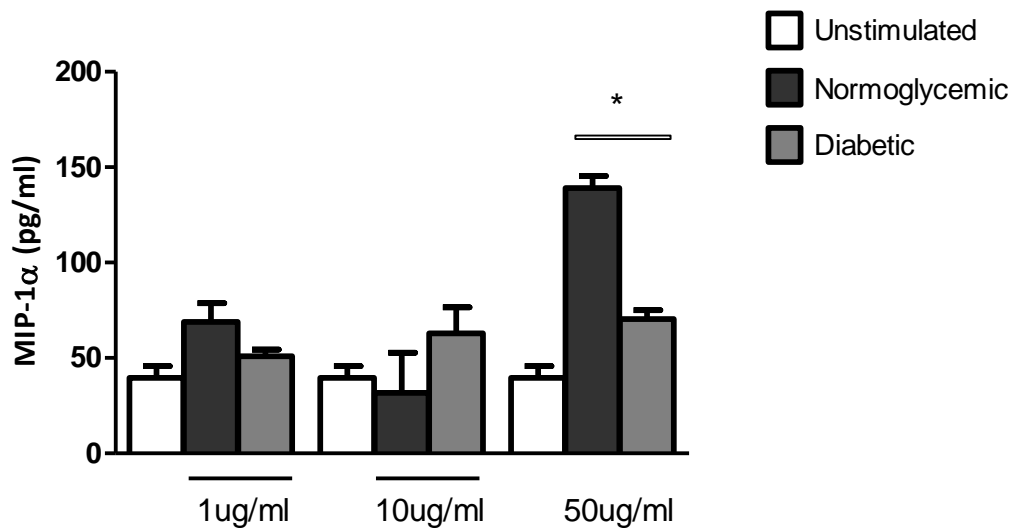


Figure 7. Comparison of the MIP-1 α production by 24-hour challenged THP-1 monocytes with exoantigens obtained from normoglycemic individuals and diabetic patients. Results are expressed as mean \pm SEM. (Paired t-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

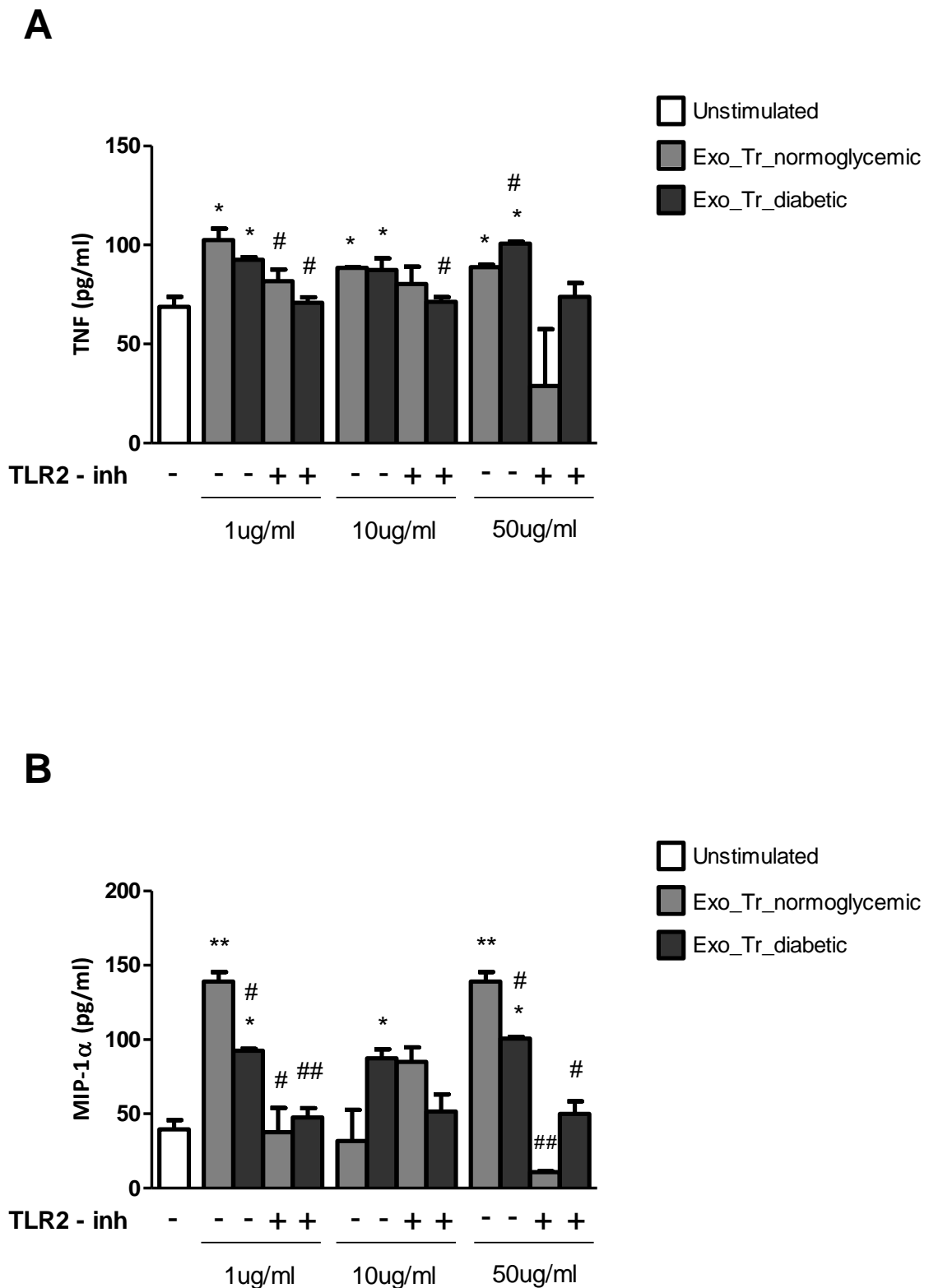


Figure 8. TLR-2 Inhibition in the THP-1 monocytes. Results are expressed as mean \pm SEM. (Paired t-test; *p 0.05, ***p<0.01, ****p<0.001); #p <0.05, ##p<0.01, ###p<0.001).

*compared to unstimulated cells

#compared to Exo_Tr_NG-stimulated cells

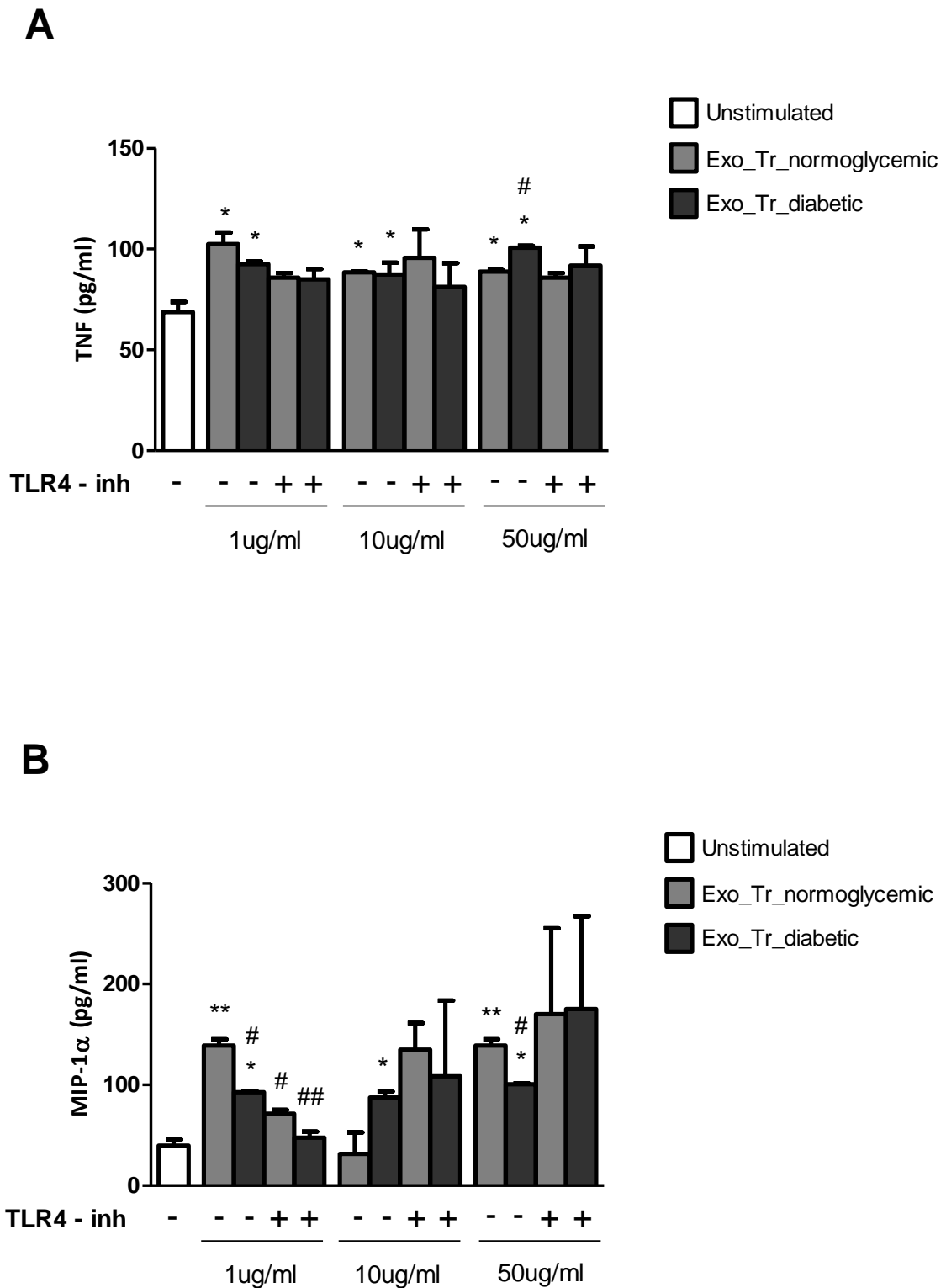


Figure 9. TLR-4 Inhibition in the THP-1 monocytes. Results are expressed as mean \pm SEM. (Paired t-test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

*compared to unstimulated cells

#compared to Exo_Tr_NG-stimulated cells

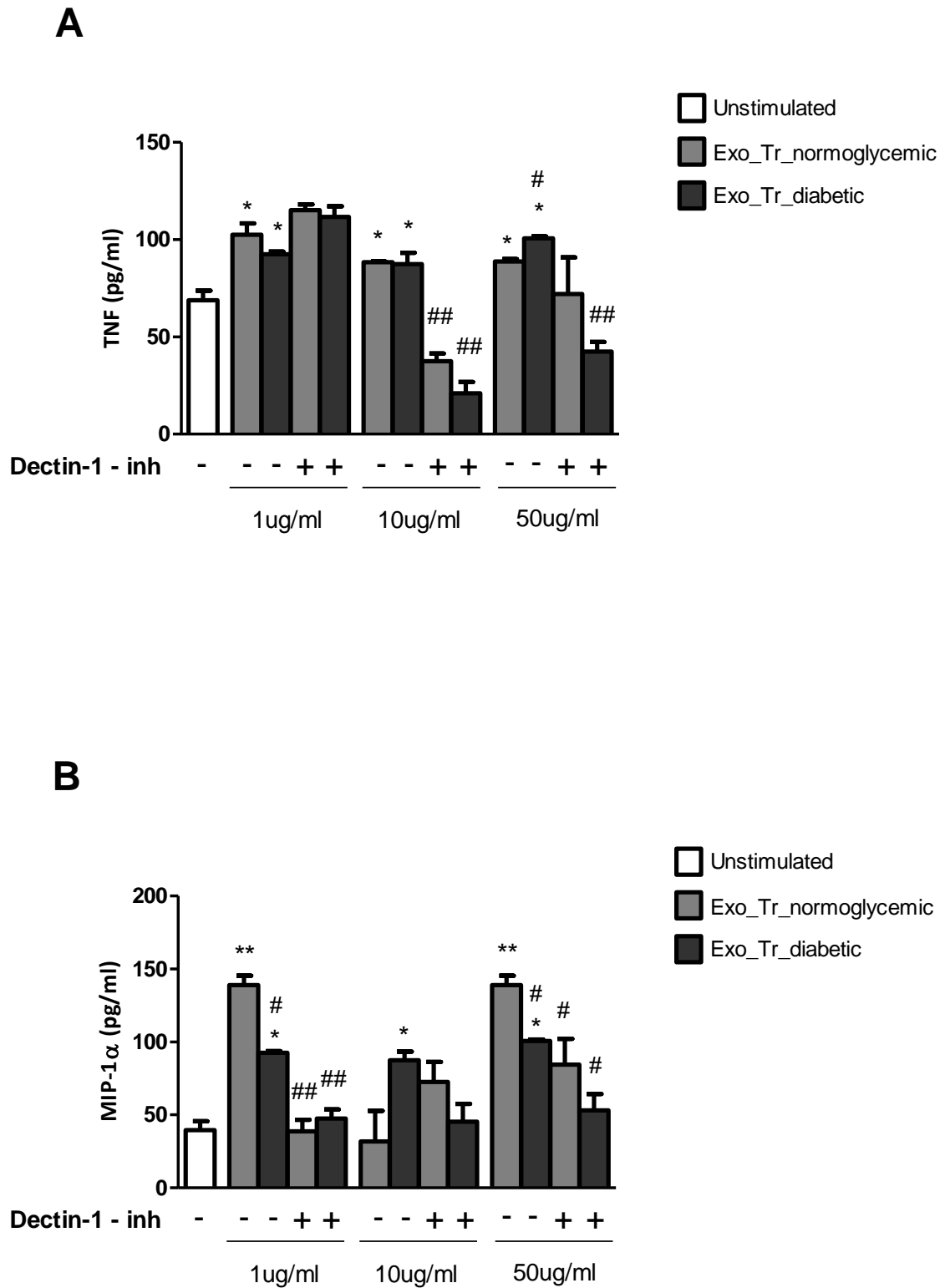


Figure 10. Dectin-1 Inhibition in the THP-1 monocytes. Results are expressed as mean \pm SEM. (Paired t-test; *p 0.05, **p<0.01, ***p<0.001); #p <0.05, ##p<0.01, ###p<0.001).

*compared to unstimulated cells

#compared to Exo_Tr_NG-stimulated cells

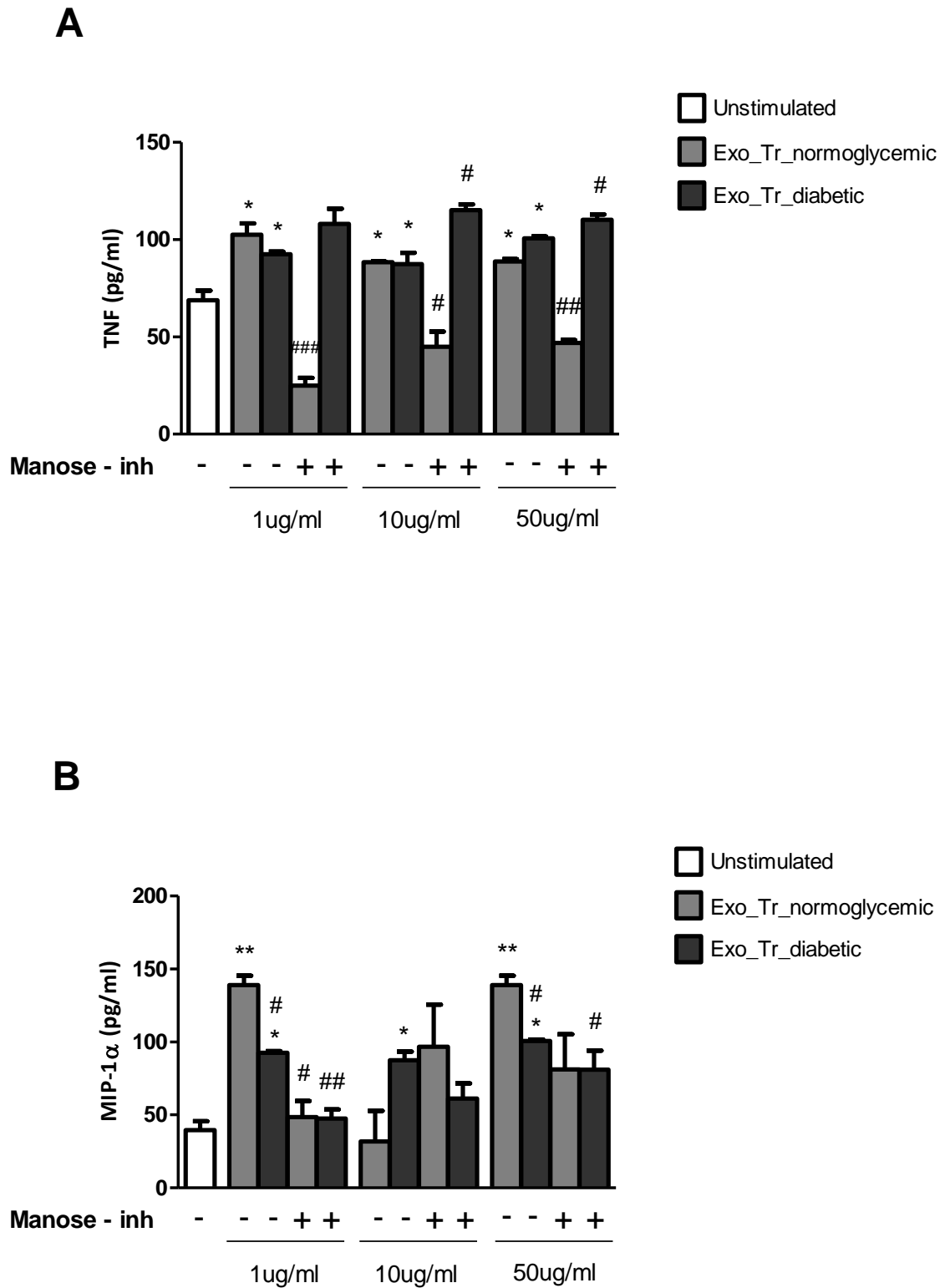


Figure 11. Manose receptor Inhibition in the THP-1 monocytes. Results are expressed as mean \pm SEM. (Paired t-test; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001); #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001).

*compared to unstimulated cells

#compared to Exo_Tr_NG-stimulated cells

REFERENCES

1. White TC, Oliver BG, Gräser Y, Henn MR. Generating and Testing Molecular Hypotheses in the Dermatophytes. *Eukaryot Cell*. 2008;7(8):1238–45.
2. Weitzman I. RCS. the Dermatophytes. *Biol Rev*. 1995;8(2):240–59.
3. Siqueira ER, Ferreira JC, Maffei CML, Candido RC. Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(3):269–71.
4. Grappel SF, Bishop CT, Blank F. Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. *Bacteriol Rev* [Internet]. 1974;38(2):222–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Hay RJ. Failure of treatment in chronic dermatophyte infections. *Postgrad Med J*. 1979;55(647):608–10.
6. Wang YR, Margolis D. The prevalence of diagnosed cutaneous manifestations during ambulatory diabetes visits in the United States, 1998-2002. *Dermatology*. 2006;212(3):229–34.
7. Shah BR, Hux JE. Quantifying the Risk of Infectious diseases in patients with DM. *Diabetes Care*. 2003;26(2):510–3.
8. Cathcart S, Cantrell W, Elewski B. Onychomycosis and diabetes. *J if Eur Acad Dermatology Venereol*. 2009;23(10):1119–22.
9. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Goff M Le, Allannic H, Genetet B. Impaired Leucocyte Functions in. *Diabet Med*. 1997;14(September 1996):29–34.
10. Blakytyn R, Jude EB. Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*. 2009;8(2):95–104.
11. Behm B, Schreml S, Landthaler M, Babilas P. Skin signs in diabetes mellitus. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2012;26(10):1203–11.
12. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;11(4):275–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394104>
13. Van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow N a., Netea MG. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(4):305–12.
14. Almeida DDF, Fraga-Silva TFDC, Santos AR, Finato AC, Marchetti CM, Golim MDA, et al. TLR2^{-/-} Mice Display Increased Clearance of Dermatophyte

- Trichophyton mentagrophytes in the Setting of Hyperglycemia. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(January):1–12.
15. Venturini J, Rossi-Ferreira R, Arruda M. Production of *Trichophyton mentagrophytes* antigens and their characterization in mice. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2010;14(3):409–22.
 16. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-Like Receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335–76.
 17. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, et al. The Contribution of the Toll-Like/IL-1 Receptor Superfamily to Innate and Adaptive Immunity to Fungal Pathogens In Vivo. *J Immunol.* 2004;172(5):3059–69.
 18. Shi H, Yin H, Flier JS, Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance Find the latest version : TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(11):3015–25.
 19. Curtiss LK, Tobias PS. Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2009;50(Supplement):S340–5.
 20. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: Further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(2):578–83.
 21. Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes Mechanism of activation. *Diabetes.* 2008;57(11):3090–8.
 22. Devaraj S, Tobias P, Kasinath B, Ramsamooj R, Afify A, Jialal I. Knockout of toll-like receptor-2 attenuates both the proinflammatory state of diabetes and incipient diabetic nephropathy. *ArteriosclerThrombVascBiol.* 2011;31:1796–804.
 23. Lanternier F, Pathan S, Vincent QB, Liu L, Cypowyj S, Prando C, et al. Deep Dermatophytosis and Inherited CARD9 Deficiency. *N Engl J Med.* 2013;369(18):1704–14.
 24. Yoshikawa FSY, Yabe R, Iwakura Y, De Almeida SR, Saijo S. Dectin-1 and Dectin-2 promote control of the fungal pathogen *Trichophyton rubrum* independently of IL-17 and adaptive immunity in experimental deep dermatophytosis. *Innate Immun.* 2016;22(5):316–24.
 25. Che CY, Li C, Gao a, Lin J, Zhang LL, Xu Q, et al. Dectin-1 expression at early period of *Aspergillus fumigatus* infection in rat's corneal epithelium. *Int J Ophthalmol [Internet].* 2013;6(1):30–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23447102>

26. Dan JM, Kelly RM, Lee CK, Levitz SM. Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*. 2008;76(6):2362–7.
27. Linehan S a., Martínez-Pomares L, Gordon S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect*. 2000;2(3):279–88.
28. Perez M, Konh S. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus. *J Am Acad Dermatol*. 1995;4:114–43.
29. Zhao G, Hochwalt PC, Usui ML, Underwood R a., Singh PK, James G a., et al. Delayed wound healing in diabetic (db/db) mice with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm challenge: A model for the study of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 2010;18(5):467–77.
30. Worek M, Kwiatkowska A, Ciesielska A, Jaworski A, Kaplan J, Miedziak B, et al. Identification of dermatophyte species using genomic in situ hybridization (GISH). *J Microbiol Methods* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;100(1):32–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.02.012>
31. Rewers M, Norris JM, Eisenbarth GS, Erlich H a., Beaty B, Klingensmith G, et al. Beta-cell autoantibodies in infants and toddlers without IDDM relatives: Diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *J Autoimmun*. 1996;9(3):405–10.
32. Cortez-Espinosa N, García-Hernández MH, Reynaga-Hernández E, Cortés-García JD, Corral-Fernández NE, Rodríguez-Rivera JG, et al. Abnormal expression and function of Dectin-1 receptor in type 2 diabetes mellitus patients with poor glycemic control (HbA1c > 8%). *Metabolism*. Elsevier Inc.; 2012;61(11):1538–46.
33. Al Dubayee MS, Alayed H, Almansour R, Alqaoud N, Alnamlah R, Obeid D, et al. Differential expression of human peripheral mononuclear cells phenotype markers in type 2 diabetic patients and type 2 diabetic patients on metformin. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(OCT):1–10.

Conclusão

4. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que os receptores TLR-2, TLR-4, manose e dectina-1 atuam no reconhecimento de exoantígenos de *T. rubrum* obtidos de pacientes diabéticos e o reconhecimento por esses receptores leva a liberação de importantes mediadores inflamatórios na patogênese do diabetes mellitus amplificando a resposta inflamatória desses pacientes.

Anexos

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
RESOLUÇÃO 468/2012**

CONVIDO, o Senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado " *Influência dos receptores de manose, dectina-1 e TLR-2 e TLR-4 na ativação de monócitos de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 e infectados pelo dermatófito *Trichophyton rubrum**", que será desenvolvido por mim Thainá Sanches Paixão, Biomédica, aluna de mestrado pela Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP com orientação do profissional Biólogo e Professor (a) Dr. James Venturini da da Faculdade de Ciências UNESP- Bauru e Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS.

Estou estudando as micoses em pessoas com diabetes mellitus do tipo II, uma doença que causa um aumento do açúcar no sangue. Para que eu possa ter um resultado nesse momento, preciso coletar 30ml do seu sangue. O risco com a coleta de sangue será apenas a picada da agulha e uma pequena mancha roxa que desaparecerá bem rapidamente.

Solicito também sua autorização para consultar seu prontuário médico para coletar outras informações lá contidas como exames laboratoriais de rotina realizados em consultas anteriores pelo (a) Senhor (a).

Seu benefício em participar será contribuir para o entendimento das micoses em pacientes com diabetes mellitus do tipo II incluindo novos tratamentos, além de beneficiar outros pacientes.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias iguais, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável ou o professor orientador do projeto. Os dados de localização estão abaixo descrito.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão preservados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Bauru, ____ / ____ / ____

Pesquisador

Participante da Pesquisa