

**Márcio Sousa Jerônimo**

**Avaliação da ativação de células dendríticas murinas por isolados de  
*Paracoccidioides brasiliensis* diferindo em virulência**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientador(a): Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Co-orientador: Prof. Dr. Aldo Henrique Tavares

Brasília -2014

*Sheila*

*Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.*

1 Cor 13: 1-3

## Agradecimentos

A Deus, por me guiar nesse caminho. Toda honra e toda glória ao criador de tudo!

Aos meus pais Mirtor e Marcílio Jerônimo (*in memoriam*) e aos meus irmãos Marcelo, Marcílio Júnior e Mariana, todos estão tão distante e mesmo assim conheceram as dificuldades dessa jornada, muito obrigado.

A minha orientadora professora Anamélia Lorenzetti Bocca que pacientemente me instrui desde o mestrado nesse fabuloso mundo da imunologia e ao meu co-orientador, professor Aldo Tavares que brilhantemente esteve ao meu lado na bancada, muito obrigado.

À família da minha esposa, Sheila, pelos meus sogros Décio e Julieta abraço todos vocês que me acolheram carinhosamente no seio da tradicional família mineira, muito obrigado.

Aos colegas de laboratório Luiza Leonhardt, Karina Simom, Samyra Caxito e Yasmim Lima que tornavam os dias mais suaves quando eram duros. Destaque para Raffael Castro e Pedro Bürguel pela camaradagem e colaboração em vários experimentos. Obrigado a todos.

Aos colegas da BIOMOL, pela professora Ildinete, exemplo de gentileza, educação e atenção docente, abraço todos. Destaco Daniel e Caliandra que muito ajudaram no período de padronização do protocolo de diferenciação celular. Muito obrigado.

Aos amigos Ana Camila e Isaque Medeiros, esse espaço não cabe as tantas considerações que eu tenho a fazer aos dois. Muito obrigado por tudo.

Ao CNPQ e a CAPES pelo auxílio financeiro.

## Resumo

O *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é o agente etiológico da principal micose sistêmica da América Latina, a Paracoccidioidomicose (PCM). Desde a sua descrição, o Pb vinha sendo descrito como a única espécie, mesmo existindo uma grande diversidade em relação a sua virulência. A infecção se inicia pela inalação de propágulos presentes no ar derivados da forma miceliana do fungo. Após a inalação, os propágulos se alojam principalmente nos pulmões. A resposta imunológica observada pode estar relacionada à resposta Th1 ou Th2 e ultimamente tem se mostrado de grande importância para o hospedeiro a resposta Th17. Nosso trabalho objetiva apontar a resposta imunológica promovida contra dois isolados de virulência variável, o Pb265 (pouco virulento) e o Pb18 (muito virulento) em células dendríticas (DCs) e *in vivo*. DCs infectadas com Pb265 ou Pb18 tiveram seu mRNA extraído para análise em PCR *Array* para genes da resposta anti-fúngica e da imunidade inata. DCs de camundongos C57bl/6, com ou sem inibidores de receptores PRRs e de vias de sinalização e DCs de camundongos TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, Dectina-1<sup>-/-</sup> foram submetidas à infecção com os mesmos isolados, após 6 horas tiveram o sobrenadante coletado para dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , Il-12, Il-6, CCL-2, Il-10, Il-23. Um co-cultivo de DCs, esplenócitos totais e os dois isolados foi feito e depois de 5 dias o sobrenadante foi coletado para dosagem de Il-13, IFN- $\gamma$ , Il-17. Por último, camundongos WT e Dectina-1<sup>-/-</sup> foram infectados intra traquealmente e sacrificados depois de 45 dias seus pulmões coletados e analisada a expressão de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup> além de dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Il-10. A modulação positiva para o gene da Dectina-1 nas DCs infectadas com Pb265, associado a outros genes de moléculas adaptadoras dessa via (Card9, Malt1 e SyK) sugerem uma ativação clássica de reconhecimento e resposta a esse isolado do *P. brasiliensis*, corroborando com esse fato está a produção mais acentuada de Il-12 e IFN- $\gamma$  e uma maior produção de Il-10 e Il-17 pelo Pb18 sem a expressão do gene para Dectina-1 mas modulando positivamente o gene do CLR mincle e apontam para uma resposta Th17, diferente do isolado menos virulento. A análise *in vivo* apresentou diferença na produção de citocinas indicando que o processo inflamatório desenvolveu-se distintamente entre os camundongos infectados com os dois isolados com maior produção de Il-10 e Il-17 no camundongo infectado com o Pb18 e que a produção de citocinas e a migração celular é fortemente influenciada pelo reconhecimento pela Dectina-1. Esses dados nos fazem crer que o padrão de resposta imunológica Th1 para o Pb265 e Th17 para o Pb18 com maior produção de Il10 nesse segundo sejam os principais parâmetros para diferença imunológica entre esses isolados, abrindo assim novas perspectivas para o entendimento da imunopatologia da PCM.

## Abstract

The *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) is the main etiological agent of systemic mycosis in Latin America, Paracoccidioidemiasis (PCM). Since your description, the Pb was being appointed as a single species, although there are a great diversity in relation to virulence. The infection starts by inhalation of propagules in the air derived from the mycelial form of the fungus. After inhalation, the seedlings are housed mainly in the lungs. The immune response observed may be related to Th1 or Th2 response and has lately shown to be of great importance to the host Th17 response. Our work aims to point the immune response brought against two strains of variable virulence, the Pb265 (little virulent) and Pb18 (very virulent) in dendritic cells (DCs) and in vivo. Infected with Pb18 or Pb265 DCs had their mRNA extracted for analysis by PCR Array for genes of the anti-fungal response and innate immunity. DCs from C57BL/6 mice, with or without inhibitors and receptors PRR signaling pathways and DCs TLR2<sup>-/-</sup> mice, TLR4<sup>-/-</sup>, Dectin-1<sup>-/-</sup> were subjected to infection with the same isolated after 6 hours the supernatant were collected for measuring cytokine TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, CCL-2, IL-10, IL-23. A culture of DC, splenocytes and two isolates was made and after 5 days the supernatant was collected for determination of IL-13, IFN- $\gamma$ , IL-17. Finally, WT mice and Dectin-1<sup>-/-</sup> were infected intra-tracheally and sacrificed after 45 days your lungs were collected and analyzed the expression of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> and F4/80<sup>+</sup> to measurement of TNF cytokines  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10. The upregulation gene for Dectin-1 in DCs infected with Pb265, associated with other genes of adapter molecules of this pathway (Card9, MALT1 and Syk) suggest a classical activation of recognizing and responding to that isolated from *P. brasiliensis*, corroborating this fact is more pronounced IL-12 and IFN- $\gamma$  production and a higher IL-10 and IL-17 without the Pb18 gene expression Dectin-1 but positively for modulating gene CLR and suggest mincle Th17 response, other less virulent isolate. The in vivo analysis showed differences in cytokine production suggesting that inflammation has developed distinct from mice infected with two strains with increased production of IL-10 and IL-17 in mice infected with Pb18 and cytokine production and cell migration is strongly influenced by the recognition by the Dectin-1. These data lead us to believe that the pattern of immune response to Th1 and Th17 Pb265 for Pb18 with increased production of IL10 in the second is the key parameters for immunological differences between these isolates, thus opening new perspectives for the understanding of the immunopathology of PCM.

## Índice de figuras

Figura 1 - Modelo esquemático representando as diferentes respostas imunológicas observada em diferentes formas de PCM.

Figura 2 - Modelo esquemático representando as diferentes respostas imunológicas observada em diferentes formas de PCM.

Figura 3 - Diagrama de Venn representando expressão de genes relacionados à resposta imunológica de DCs desafiadas 6 horas com Pb265 ou Pb18.

Figura 4 - Perfil de citocinas produzidas pelas DCs desafiadas com Pb265 ou Pb18.

Figura 5 - Efeito do tratamento de inibidores relacionados ao TLR, CLR ou NF- $\kappa$ B em DCs desafiadas com isolados de *P. brasiliensis*.

Figura 6 - Avaliação de DCs de animais TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, Dectina-1<sup>-/-</sup> desafiadas com Pb265 ou Pb18.

Figura 7 - Perfil de resposta imunológica *in vitro* de esplenócitos totais contra o *P. brasiliensis*.

Figura 8 - Citocinas produzidas nos pulmões de camundongos WT ou Dectina-1<sup>-/-</sup> infectados com Pb265 ou Pb18 40 dias.

Figura 9 - Perfil de células imunológicas no pulmão de camundongos infectados com Pb265 ou Pb18.

## Abreviaturas

°C - Graus Célsius

CD - cluster de ligação

CLR - Receptores de lectina tipo C

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CR - Receptor complemento

DC - células dendrítica

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTH - Hipersensibilidade Tardia

ELISA - Ensaio de ligação imunoenzimático

FA - Forma Adulta

FJ - Forma Juvenil

g - Grama

Gp48 - Glicoproteína<sup>8</sup>

h - Horas

IFN- $\gamma$ - Interferon gama

Il - Interleucina

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

MEC - Matrix extracelular

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NO - Óxido nítrico

PAMPS - padrões moleculares associados aos patógenos

Pb - *Paracoccidioides brasiliensis*

PCM - Paracoccidiodomicose

PCR - Reação de polimerase em cadeia

PRR - receptores de reconhecimento de padrões

Th1 - T helper 1

Th17 - T helper 17

Th2 - T helper 2

TLR - Receptores do tipo Toll

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa

# Índice

Introdução	1
O gênero Paracoccidioides e a Paracoccidioidomicose	3
Resposta imunológica na Paracoccidioidomicose	5
Interação entre o <i>P. brasiliensis</i> com as células fagocíticas do hospedeiro	8
Reconhecimento do <i>P. brasiliensis</i> pelas células do sistema imunológico	12
Objetivo Geral	17
Objetivos específicos	17
Material e Método	19
Animais e coleta de células	19
Diferenciação Celular	19
Preparo do fungo <i>P.brasilienses</i>	20
Infecção das células dendríticas pelos fungos	20
Tratamento das células dendríticas infectadas com <i>P. brasiliensis</i>	21
Extração de RNA das células dendríticas infectadas com <i>P.brasiliensis</i>	21
Expressão gênica das células dendríticas por qRT-PCR <i>array</i>	22
Cultura das DCs infectadas com o <i>P.brasiliensis</i> e linfócitos	24
Infecção dos animais e preparo do material biológico	24
Quantificação das citocinas por ELISA	25
Citometria de fluxo	25
Resultados	27

	10
Análise do transcrito das DCs após infecção com Pb18 ou Pb265	27
Produção de citocinas pelas DCs infectadas com os dois isolados do <i>P. brasiliensis</i>	30
Perfil de citocinas produzidas pelos esplenócitos	34
Análise <i>in vivo</i>	34
Discussão	40
Conclusões	47

## *Introdução*

Os fungos são microrganismos heterotróficos e eucariotos tradicionalmente classificados conforme sua morfologia. Os fungos despertam grande interesse devido ao seu amplo espectro de hospedeiros, desde plantas até humanos. A compreensão dos mecanismos imunológicos desencadeados no hospedeiro durante as infecções fúngicas vem crescendo nas últimas três décadas. Apesar destes avanços, estas infecções estão associada a um alto índice de mortalidade, tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunossuprimidos (Romani, 2011).

A interação entre o patógeno e o fungo é crucial para determinar as consequências desta infecção (Bourgeois *et al*, 2010). O perfil do infiltrado inflamatório varia dependendo do sítio de infecção, do agente patológico, sua morfologia (hifa ou levedura) e/ou o *status* da resposta imunológica (RI) (Steele & Wormley Jr., 2012). Nesse contexto a RI inata atua como a primeira linha de defesa, reconhecendo determinantes antigênicos conservados e específicos da estrutura de microrganismos, conhecidos como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) através de receptores associados ao reconhecimento desses padrões, denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Existem diferentes classes de PRRs, sendo que os receptores do tipo Toll (TLRs) têm sido descritos como receptores importantes nas infecções fúngicas (revisado por Calich *et al.*, 2008). Outro receptor importante são os receptores do tipo C-lectinas (CTL). Ambas as classes de receptores possuem a habilidade de reconhecer produtos derivados desses patógenos e iniciar a sinalização levando a uma resposta inflamatória aguda, expressão de genes e produção de citocinas (Pasare & Medzhotov, 2004).

Dentre os fungos que têm despertado interesse quanto à sua interação com o patógeno, está o *Paracoccidioides brasiliensis*.

## 1. 2. O gênero *Paracoccidiodes* e Paracoccidioidomicose

O *Paracoccidioidis brasiliensis* (Pb), fungo termodimórfico encontrado na forma de micélio a 22°C e como levedura a 37°C, é o agente etiológico da principal micose sistêmica da América Latina, a Paracoccidioidomicose (PCM). Esta micose foi descrita pela primeira vez por Lutz (1908). O Pb pertence ao filo Ascomycota, subdivisão Euascomycetes, classe Plectromycetes, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae, gênero Paracoccidioides, espécie *Paracoccidioides brasiliensis*.

Desde a sua descrição, o Pb vinha sendo descrito como a única espécie do gênero *Paracoccidioides*, mesmo existindo uma grande diversidade em relação a sua estrutura genômica e virulência, entre diferentes isolados desse fungo (Singer-Vermes *et al*, 1989). Recentemente foi descrito que o gênero *P. brasiliensis* abriga quatro espécies crípticas, filogenéticas distintas: S1 (grupo parafilético formado por 38 isolados da Argentina, Brasil, Peru, Venezuela e Antártida), PS2 (contém 6 isolados, com 5 dos quais provenientes do Brasil e 1 da Venezuela) e PS3 (com 21 isolados da Colômbia) e PS4 (isolados clínicos da Venezuela), que se diferenciam por características evolutivas e distribuição geográfica (Matute *et al*, 2006). Neste processo de caracterização molecular dos diferentes isolados do *P. brasiliensis*, foi descrito um novo clado, composto por 17 isolados geneticamente similares. Estes isolados foram descritos como uma nova espécie, denominada *Paracoccidioides lutzii* (Teixeira *et al.*, 2009). O *P. Lutzii* é encontrada principalmente nas regiões centro-oeste do Brasil e Equador.

Apesar da alta incidência desta micose em humanos, o homem é um hospedeiro acidental desse fungo. Estima-se que em 2001 mais de 10 milhões de pessoas estavam infectadas por este micro-organismo (Restrepo *et al*, 2001). A infecção inicia-se pela inalação de propágulos presentes no ar, derivados da forma miceliana do fungo. Após a

inalação, os propágulos se alojam principalmente nos pulmões (Franco *et al.*, 1993; Restrepo *et al.*, 2001; Coutinho *et al.*, 2002) e assim, como para outras micoses sistêmicas, dependendo da interação do fungo com a resposta imunológica do hospedeiro, esta pode evoluir para a cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo causando uma doença inflamatória granulomatosa crônica (Palmeiro *et al.*, 2005).

A doença causada pelo *Pb*, a paracoccidiodomicose, (PCM) possui um amplo espectro de manifestações clínicas e pode ser dividida em três tipos clínicos distintos: infecção assintomática (IA), observada em indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas e apresentam teste de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) positivo; e duas formas clínicas da doença, denominadas forma juvenil (FJ) e forma adulta (FA). A FJ afeta igualmente pacientes de ambos os sexos e é caracterizada pelo envolvimento sistêmico de linfonodos, hepatoesplenomegalia e disfunção da medula óssea. A FA apresenta maior incidência em homens adultos e sua apresentação clínica é muito heterogênea variando desde lesões isoladas no trato respiratório a forma disseminada da doença (Blotta *et al.*, 2005).

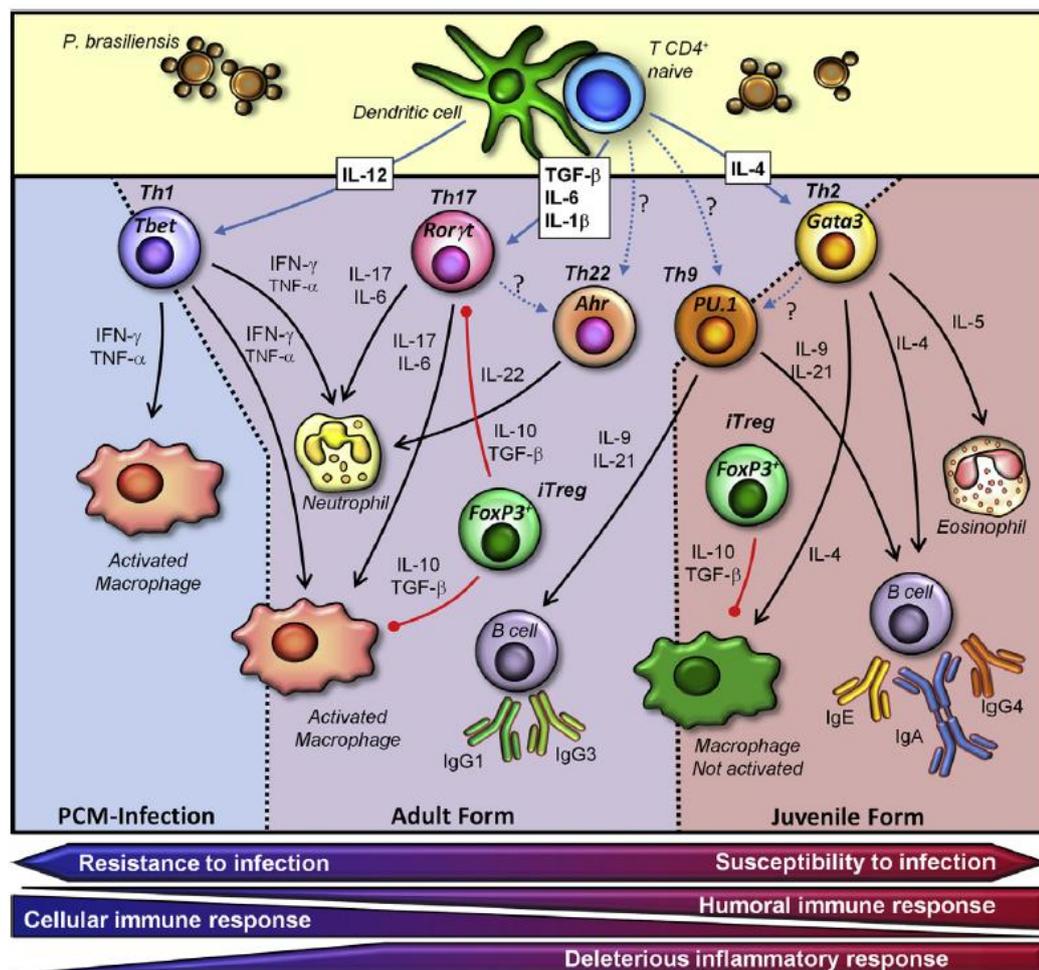
Outro aspecto que interfere no desenvolvimento da PCM é a produção hormonal dos indivíduos infectados com o *P. brasiliensis*. Já foi demonstrado que o estrógeno é capaz de inibir a transformação do micélio ou conídio em leveduras, explicando a diferença de infecção em relação ao sexo (Salazar *et al.*, 1988; Clemons *et al.*, 1989; Shankar *et al.*, 2001; Pinzan *et al.*, 2010). O cultivo do fungo em meio que contém estradiol leva a uma modificação na sua parede celular durante a fase de transformação micélio-hifa, indicando que, ainda na forma miceliana, ocorre uma modulação transcricional promovida pelo hormônio na parede celular, que acarretaria com uma supressão da atividade das proteínas Fks1 e AGS, fundamentais na síntese da  $\beta$ -1-3 glicana sintase (Clemons *et al.*, 1989, revisado por Tavares *et al.*, 2014).

## 1. 2. Resposta imunológica na paracoccidioidomicose

Existe uma forte associação entre as formas clínicas da PCM e o perfil imunológico observado após a infecção. A resposta imunológica observada pode estar relacionado à resposta Th1 ou Th2 do hospedeiro (figura 1). Existem evidências que a resistência ao Pb é observada quando ocorre predominantemente uma resposta do tipo Th1, onde o Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) propicia o desenvolvimento de um importante mecanismo efetor, com ativação de macrófagos, ativação de linfócitos T citotóxicos e destruição do microrganismo (Calvin *et al*, 2003). Dados de pacientes com a IA mostram uma vigorosa produção de citocinas do perfil Th1 como IFN- $\gamma$  e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) além de proliferação celular preservada quando estimulados por antígenos do fungo (Oliveira *et al*, 2002). Já pacientes da FJ apresentam um predomínio da resposta Th2, com aumento da produção de citocinas como Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL-5), Interleucina-10 (IL-10) e Fator Transformador de Crescimento beta (TGF- $\beta$ ), seguido da transcrição do fator GATA-3 além da baixa produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Pacientes com a FA caracterizam-se por um amplo espectro de resposta, com produção de citocinas tipo Th-1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-2) pelos pacientes do polo hiperérgico, e citocinas do tipo Th-2 (IL-10 e IL-4) nos pacientes do polo anérgico (Castro *et al*, 2013). Como em outras micoses sistêmicas, trabalhos recentes vêm demonstrando a importância da resposta do perfil Th17 na PCM (Loures *et al*, 2009; Loures *et al*, 2011; Loures *et al*, 2014). A presença de um grande número de células características do perfil Th17 na forma juvenil desta doença pode explicar certas características clínicas que não seriam explicadas apenas pelo balanço Th1 ou Th2. Linfócitos do sangue periférico de indivíduos com a forma juvenil produziram uma grande quantidade de IL-12p40, mas não de IFN- $\gamma$  quando estimuladas *in vitro*. Esse resultado deve ser reflexo da presença de IL-23. A citocina IL-23, assim

como a IL-12, é produzida primariamente por células apresentadoras de antígenos e foi inicialmente identificada como responsável por induzir à produção de outras citocinas, em particular a IL-17 (Castro *et al.*, 2013).

A estimulação *in vitro* de linfócitos obtidos de indivíduos com a forma juvenil levou a uma alta produção de IL-12p40, mas não de IFN- $\gamma$ . Apesar de parecer contraditório, este resultado pode ser reflexo da presença de IL-23, que é uma citocina produzida primariamente por células apresentadoras de antígenos e foi inicialmente identificada como responsável por induzir à produção de outras citocinas, em particular a IL-17 (Castro *et al.*, 2013). O perfil de citocinas produzido em cada uma das formas clínicas da PCM está representado na figura 1



**Figura 1.** Modelo esquemático representando as diferentes respostas imunológicas observada em diferentes formas de PCM (adaptado de Castro *et al.*, 2013).

A produção de citocinas na PCM também é influenciada pela produção hormonal. Fêmeas infectadas com o Pb apresentaram uma maior produção de IL-12, IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$  enquanto que os animais machos infectados apresentaram maior produção de IL-10, citocina responsável por iniciar um mecanismo imunossupressor e uma maior sobrevivência do parasita no hospedeiro. Estrógenos são capazes de estimular a produção de IL-12 (Karpuzoglu *et al*, 2009), IFN- $\gamma$  (Fox *et al*, 1991) e TNF- $\alpha$  (Chao *et al*, 1995); e a testosterona aumenta síntese de IL-10 na PCM (revisada em Calich *et al*, 1998).

Costa *et al*. (2013) após infectar camundongos deficientes na produção de IL-10 com Pb demonstraram claramente que a ausência dessa citocina melhora o quadro de infecção pulmonar, uma vez que ocorreu um efeito benéfico sem agravamento do quadro infeccioso naquele órgão e nem uma significativa destruição tecidual causada pela presença de citocinas pró-inflamatórias. Por sua vez, a IL-12 pode induzir a produção de outras citocinas como o IFN- $\gamma$  por células NK (natural killer) além é claro, dessa citocina ser apresentada como principal citocina no combate contra a PCM (Arruda *et al*, 2002). Assim, uma produção aumentada de IL-12 funciona na PCM como mecanismo de escape por inibir o recrutamento de macrófagos, sua viabilidade, morfologia, expressão do complexo de histocompatibilidade principal e produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por fagócitos (Moreira *et al*, 2010).

As manifestações clínicas e imunológicas também podem variar de acordo com o isolado do fungo (Calvi *et al*, 2003; Toledo *et al*, 2010; Pigosso *et al*, 2013), indicando que os diferentes isolados apresentam graus de virulência variados (Kashino *et al*, 1985; Kashino *et al*, 1987); alguns mais virulentos e outros menos virulentos que *in vivo* pode ser delineada pela evolução da inflamação, sobrevivência do hospedeiro e recuperação da carga fúngica, além é claro, do processo granulomatoso A estimulação *in vitro* de

Infócitos obtidos de indivíduos com a forma juvenil levou a uma alta produção de Il-12p40, mas não de IFN- $\gamma$ . Apesar de parecer contraditório, este resultado pode ser reflexo da presença de Il-23, que é uma citocina produzida primariamente por células apresentadoras de antígenos e foi inicialmente identificada como responsável por induzir à produção de outras citocinas, em particular a Il-17 (Castro *et al.*, 2013). O perfil de citocinas produzido em cada uma das formas clínicas da PCM está representado na figura 1

Alguns isolados são conhecidamente mais virulentos (Pb18) e outros menos virulentos (Pb 265 ou Pb339) quando testados em modelos experimentais (Singer-Vermes *et al.*, 1998).

### 1. 3 - Interação entre o *P. brasiliensis* com as células fagocíticas do hospedeiro

A interação entre o fungo e o hospedeiro começa pelo processo de adesão, sendo identificado como um passo crítico no processo de infecção. Utilizando dois isolados do *P. brasiliensis* que diferem em virulência, observou-se que o Pb18 apresentou uma maior adesão quando comparado ao Pb265 (Hanna *et al.* 2000). A principal adesina neste processo é a glicoproteína 48 (gp48). Verificou-se que as proteínas da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro se ligam de maneira qualitativamente distinta aos diferentes isolados deste fungo. A perda de virulência do Pb, após sucessivos ciclos de crescimento em meio de cultura, reduziu a sua capacidade de adesão à MEC. A recuperação da virulência reestabeleceu esta interação, demonstrando que a capacidade de adesão e disseminação no organismo do hospedeiro está associado à virulência do fungo (Andreotti *et al.*, 2005). A laminina foi apontada como um dos principais elementos na interação fungo/tecido do hospedeiro quando relacionada com a virulência

do Pb. Outras moléculas importantes na adesão também foram identificadas, como o colágeno tipo I, colágeno tipo IV e a fibronectina (Mendes-Gianini *et al.*, 2006).

Após a adesão e infecção, o fungo entra em contato com as populações celulares residentes destes tecidos. Dentre as células que importantes neste reconhecimento e consequente apresentação de antígenos na resposta imune inata está as células dendríticas (DCs) (Banchereau & Steinman, 1998). O reconhecimento dos microorganismos pela DCs pode ser realizado por diferentes PRRs, como receptor de complemento três (CR3), receptor de manose (MR), receptores do tipo toll (TLR) e dectina-1 (Netea *et al.*, 2006; Dennehy & Brown, 2007; Calich *et al.*, 2008).

As DCs podem ser de origem mielóide (mDCs) ou plasmocitóide (pDCs). As pDCs estão envolvidas na imunidade anti-viral, expressam TLR7 e TLR9 e produzem grandes quantidades de IFN do tipo I (Sabatte *et. al.*, 2007; Liu, 2005; Blasius *et. al.*, 2006). Em humanos, DCs mielóides podem ser produzidas *in vitro* a partir de monócitos CD14+ do sangue periférico que representam 10% dos leucócitos circulantes (Auffray *et. al.*, 2009). Os monócitos são células imunes efectoras equipadas com receptores para quimiocinas, e que possuem a capacidade de migrar do sangue periférico para os tecidos durante os processos infecciosos. Estas células fagocíticas produzem citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL8, IL-6), anti-inflamatórias (IL-10), se diferenciam em macrófagos e DCs, durante os processos inflamatórios e são fundamentais na resposta imune inata a microrganismos patogênicos (Geissmann *et. al.*, 2010; Auffray *et. al.*, 2009).

A migração das DC imaturas para os órgãos linfoides secundários é o primeiro passo para iniciar a resposta imune adaptativa. Durante o processo de migração, as DCs se tornam maduras, aumentando sua capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos T (Segura *et al.*, 2009). A capacidade das DCs em migrar para as zonas de

células T dos órgãos linfoides secundários foi evidenciado na infecção experimental causada pelo Pb, quando observou-se a migração para os linfonodos de drenagem e consequente ativação das células T CD4<sup>+</sup> (Silvana Santos *et al.*, 2011). Durante a resposta imune inata, o Pb também interage com os neutrófilos, sendo que a susceptibilidade do hospedeiro depende do padrão de ativação destas células. (Rodrigues *et. al.*, 2007; Bonfim *et. al.*, 2009; Balderramas *et.al.* 2014).

A maturação completa das DCs é necessária para que haja a indução da resposta imune, com ativação de linfócitos T *naive*. A maturação completa destas células pode ser induzida por meio dos TLRs, LPS, citocinas inflamatórias, RNA viral, ou CD40L. Em média o processo de maturação de DCs é rápido (18 a 20 horas, com a estimulação pelo LPS), antes da sua morte por apoptose (Repnik *et. al.*, 2008).

A expressão de PRRs varia conforme o isolado do Pb, sendo que o Pb18 e o Pb265 induziram uma maior expressão de TLR 4 e TLR-2/dectina 1 nos neutrófilos, respectivamente (Bonfim *et al.*, 2009). Em um experimento semelhante, Balderramas *et al.* (2014) observaram que o isolado menos virulento apresentou maior produção de IL-12 quando comparado ao isolado mais virulento. O oposto foi observado em relação a IL-10, onde o isolado mais virulento produziu maior quantidade dessa citocina que o Pb265.

Muitos dos acontecimentos que levam à expressão de IL-10 são específicos de células do sistema imunológico. Macrófagos e células dendríticas (DCs) podem expressar essa citocina *in vitro* após ativação específica de PRRs ou receptores independentes de TLRs (Saraiva & O'Garra 2010). Costa *et al.* (2013) após infectar camundongos deficientes na produção de IL-10 com Pb demonstraram claramente que a ausência dessa citocina melhora o quadro de infecção pulmonar, uma vez que ocorreu um efeito benéfico sem agravamento do quadro infeccioso naquele órgão e nem uma

significativa destruição tecidual causada pela presença de citocinas pró-inflamatórias. Por sua vez, a IL-12 pode induzir a produção de outras citocinas como o IFN- $\gamma$  por células NK (natural killer) além é claro, de já ser aceitável na literatura a IL-12 como principal citocina no combate contra a PCM (Arruda *et al*, 2002). Dessa forma uma produção aumentada dessa citocina do padrão Th2 funciona para o *P. brasiliensis* como mecanismo de escape por inibir o recrutamento de macrófagos, sua viabilidade, morfologia, expressão do complexo de histocompatibilidade principal e produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por fagócitos (Moreira *et al*, 2010).

Em outra análise comparativa feita entre os isolados do *P. brasiliensis* (Bordon-Graciani *et al.* (2012) os autores demonstraram uma diferença na expressão do transcrito da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), cujo transcrito estaria associada a uma maior morte do fungo no hospedeiro. Nesse trabalho foi encontrado uma maior expressão de transcrito desta enzima no isolado Pb 265. Analisando a fungicida do macrófago, observou-se uma maior sobrevivência do Pb 18, sem no entanto que houvesse uma maior produção de óxido nítrico (NO). Na PCM o NO está relacionado tanto com o mecanismo de defesa do hospedeiro e como na modulação da lesão granulomatosa (Bocca *et al*, 1998; Livonesi *et al*, 2009; Bernadino *et al*, 2013,. A produção aumentada de NO pelo Pb265, quando comparada com o Pb18 foi descrito, estando associado a uma maior expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II quando os animais foram infectados com o Pb265 (Bocca *et al.*, 1999).

A patogenicidade também está intimamente associada à transição dimórfica do fungo, uma vez que isolados de *P. brasiliensis* incapazes de se diferenciar em levedura são consideradas avirulentos (San-Blas *et al*, 2000), sendo que alguns genes envolvidos

com esse fenômeno em outros fungos, como o *pacC*, *Phr1p* e *Phr2P* também foram encontrados no *Pb*, o que reforça essa hipótese (revisado por Tavares *et al.*, 2005).

Semelhante a outros fungos patogênicos, o *Paracoccidioides* pode infectar diversos nichos e, portanto, apresenta plasticidade metabólica suficiente para sobreviver em ambientes com oscilações na disponibilidade e fonte de carbono (Brown *et al.*, 2007; Kumamoto, 2008; Brock, 2009; Fleck *et al.*, 2011; Ene *et al.*, 2012).

Outro fator de virulência, que interfere na relação entre o *P. brasiliensis* e o hospedeiro, é a sua capacidade de sintetizar melanina, tanto na sua forma de hifa como na de levedura, *in vivo* e *in vitro* (Gómez *et al.*, 2001). Esse achado protege o fungo quando internalizado pelas células fagocíticas, verificada pela menor atividade fungicida dos fagócitos e aumento da resistência do microrganismo a drogas (da Silva *et al.*, 2006).

#### 1.4. Reconhecimento do *Paracoccidioides brasiliensis* pelas células do sistema imunológico

Carboidratos de superfície (quitina,  $\beta$ -glicanas e mananas) e proteínas constitutivas da parede celular dos fungos são os principais alvos de reconhecimento pelas células do sistema imunológico (Bourgeois *et al.*, 2010). O *P. brasiliensis* compartilha desta estrutura com outros fungos (Figura 2).

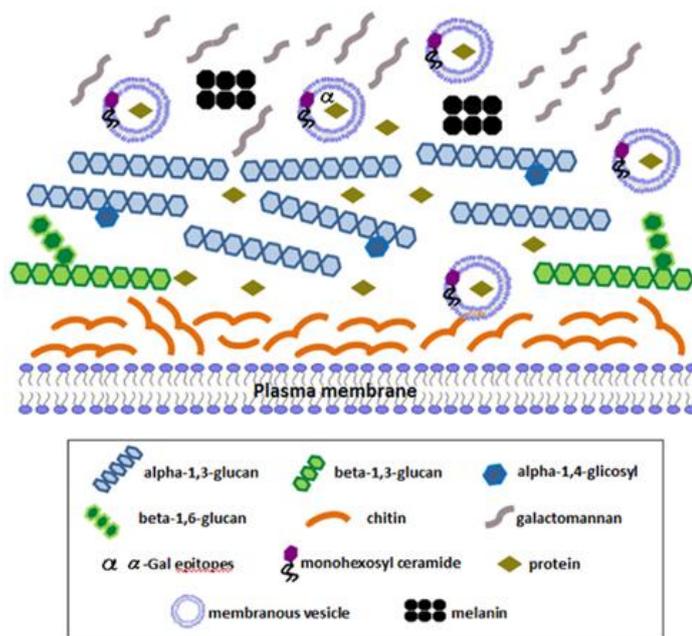


Figura 2 – Modelo esquemático da parede celular do *Paracoccidioides brasiliensis*. (adaptado de Puccia et al., 2011)

Analisando a composição da parede celular do Pb,  $\alpha$ -glicana, além da  $\beta$ -glicana, está presente na parede celular da levedura, enquanto que o micélio contém maiores quantidades de  $\beta$ -glicana (Kanetsuna *et al*, 1970; San-Blas *et al*, 1984). Vários autores mostraram que o isolado menos virulento (Pb265), é capaz de ativar os macrófagos para produzir níveis elevados de TNF- $\alpha$  e uma maior quimiotaxia para neutrófilo comparado com o isolado mais virulento (Pb18). Esta diferença foi atribuída pelos autores a uma expressão de  $\beta$ -1,3-glicanas diferenciada entre eles (Alves *et al.*, 1987; Figueiredo *et al*, 1993; Silva *et al*, 1994).

As glicanas, representadas por uma classe diversa de polímeros de glicose que compreende até a celulose ( $\beta$ -1,4-glicanas), são reconhecidas pelo sistema imune inato. As moléculas purificadas podem variar de dímeros de glicose a grandes partículas insolúveis (Goodridge *et al*, 2009) que são reconhecidas pelos PRRs, como os receptores do tipo Toll (TLRs); receptores de lectina do tipo C (CLRs) e o receptor de complemento 3 (CR3; um heterodímero do CD11b e CD18), (Romani, 2011). Estes

receptores quando ativados induzem a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e de citocinas (Underhill *et al.*, 1999). Estudos estabeleceram que tanto a dectina-1, como o TLR-2 são receptores capazes de interagir com a  $\beta$ -glicana, (Brown *et al.*, 2002). Tavares *et al.* (2012) ao analisar o perfil transcricional de DCs infectadas com o isolado 18 do *P. brasiliensis* observaram que houve um aumento da expressão de dectina-1 e receptores de manose.

A Dectina-1 atua sinergicamente com TLR2 para induzir o TNF- $\alpha$  e IL-12, pode promover a síntese de IL-2 e IL-10 e desencadeia a ativação do fator nuclear de ativação de células T (NFAT) em macrófagos e células dendríticas (Goodridge *et al.*, 2007).

Células dendríticas deficientes para a proteína syk (*Syk*<sup>-/-</sup>) foram incapazes de produzir IL-10 ou IL-2 após estimulação com  $\beta$ -glicana presente na superfície de leveduras, porém foram capazes de produzir IL-12, indicando que as vias Dectin-1/Syk, Dectin-1/TLR2 podem funcionar de forma independente (Rogers *et al.*, 2005). Tavares *et al.* (2013) demonstraram que DCs murinas, quando infectadas com o Pb18, são capazes de ativar o complexo do inflamassoma. Esta ativação é dependente da ativação da dectina-1 (dados não publicados), da ativação do Syk bem como do efluxo de cálcio e da produção de espécies reativas de oxigênio. A ativação do inflamassoma leva a produção de IL-1  $\beta$ , Dois sinais são necessários para a produção de IL-1 $\beta$ , um sinal dependente de NF- $\kappa$ B que induz a síntese de pró-IL1 $\beta$  (p35) e um segundo sinal que desencadeia o processamento proteolítico da pró- IL-1 $\beta$  produzindo IL-1 $\beta$ , sendo que o conjunto desse mecanismo que envolve a via syk/Card9 é fundamental para combater as infecções fúngicas (Gross *et al.*, 2009).

O receptor de dectina-1 é capaz de ativar uma via não canônica, independente de syk para ativação das subunidades p65 e c-Rel do NF- $\kappa$ B, com a participação da

subunidade RelB. Esta via não-canônica é dependente de RAF-1, (Gringhuis *et al.* 2009)

Loures *et al.* (2014) verificaram que a infecção experimental pelo *P. brasiliensis* (Pb18) em camundongos KO para a dectina-1 induziu um fenótipo M2 (anti-inflamatório) aos macrófagos. Esta característica foi confirmada com a diminuição da capacidade fungicida, da baixa produção de óxido nítrico, e síntese elevada de interleucina IL-10 em comparação aos macrófagos obtidos dos camundongos selvagens. Os animais deficientes para a dectina-1 apresentaram uma taxa de colonização maior e mortalidade mais elevada do que os selvagens.

Considerando os dados apresentados acima, tanto o reconhecimento como o processo de ativação das células participantes da resposta imune inata são etapas fundamentais na modulação da patogenicidade desta doença.

## *Objetivos*

## 2.1. Objetivo Geral

Apresentar as diferenças existentes na resposta imunológica promovida contra dois isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*.

## 2.2. Objetivos específicos

1 - Mostrar quais receptores de reconhecimento são os mais importantes no reconhecimento do Pb18 e Pb265.

2 – Mostrar as diferenças entre as vias da resposta imunológica de DCs infectadas com isolados de *P. brasiliensis* que diferem em virulência;

3 – Mostrar o padrão de proteínas secretadas, suas diferenças e consequências na resposta contra o fungo;

4 – Confrontar os dados *in vitro* com experimento *in vivo*

## *Materiais e Métodos*

### 3. Material e Método

#### 3. 1. Animais e coleta de células

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com idade entre 6 – 12 semanas, oriundos do biotério da Faculdade de Medicina – Universidade de Brasília e animais know out (KO) para os genes TLR2, TLR4 e *Clec7a*<sup>-/-</sup> (Dectina), oriundos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP, Campus Ribeirão Preto/SP. Os mesmos foram eutanasiados por exposição prolongada ao CO<sub>2</sub> em câmara fechada, tiveram suas tíbias e fíbulas retiradas e colocadas em etanol 70% por 5 minutos para desinfecção e seguiram novamente para o meio RPMI-1640 Sigma-Aldric<sup>®</sup> por igual período a fim de se retirada o excesso de álcool. Logo depois, foi realizado um lavado na medula desses ossos com aproximadamente 1 ml de RPMI-1640 para coleta de células da medula óssea partindo-se as extremidades dos ossos e com uma seringa de 1 ml e agulha de 0,45 mm lavou-se a medula dos mesmo (LUTZ *et al*, 1998). Essa solução de células passou por um processo de filtragem em cell streiner BD<sup>®</sup> com rede de 45µm e seguiram para diferenciação em célula dendrítica (DC). CEUA/UnB n° 62941/2010.

#### 3. 2. Diferenciação Celular

As células do lavado da medula óssea foram plaqueadas em placa de petri de plástico com 100 mm de diâmetro. Essas placas receberam no dia 0 (Zero) 2 x 10<sup>6</sup> células em um volume de 10 ml de RPMI-1640 suplementado (2g de bicarbonato de sódio, 5,95g de HEPES, 2g de glicose, 625 µl de Gentamicina 80mg/ml, 3,5 µl de β-mercaptoetanol, 10% de Soro Bovino Fetal GIBCO<sup>®</sup> e 20ng/ml de GM-CSF) e encubadas em estufa a 36°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

No dia 3, após início da diferenciação, foi adicionado 10 ml do meio RPMI-1640 suplementado. No dia 6, foram retirados 10 ml do meio e centrifugado (300g, 8 minutos e 25 °C com aceleração e desaceleração 8) para não haver perda das células em diferenciação que estavam fracamente aderidas, ressuspensas no mesmo volume de meio suplementado voltando, em seguida para estufa nas mesmas condições anteriormente descrita.

No dia 8, as células dendríticas, já diferenciadas que estavam fracamente aderidas na placa e as que estavam soltas foram lavadas e prosseguiu-se ao experimento com infecção com os fungos.

### 3. 3. Preparo do fungo *P.brasilienses*

Dois isolados de *P. brasilienses* foram usados no modelo experimental, Pb 18 e Pb 265. Os fungos foram cultivados em meio Fava-Neto durante os 7 dias anteriores ao experimento em estufa a 37°C. Após esse período, eles foram contados em hemocitômetro para alcançar a proporção de 1 fungo para cada célula dendrítica.

### 3. 4. Infecção das células dendríticas pelos fungos.

Foi realizado o co-cultivo das células dendríticas e dos fungos em placa de 6 poços na proporção de 1:1 com  $2 \times 10^6$  células dendríticas. Depois de 6 horas de incubação em estufa a 36 °C e 5% CO<sub>2</sub> foi coletado o sobrenadante para dosagem de citocinas por ELISA e realizada a extração de RNA para avaliação dos genes ligados a via TLR por qRT-PCR.

### 3. 5. Tratamento das células dendríticas infectadas com *P. brasiliensis*

Alguns tratamentos, inibidores e agonistas, foram utilizados para se avaliar receptores e vias a partir dos transcritos obtidos com a qRT-PCR das células infectadas com os dois isolados de *P. brasiliensis*, quais sejam: Zymosan depletado (agonista de Dectina-1) 100µg/ml Invivogen®, Pam2CSK4 (agonista TLR-2/6) 100ng/ml Invivogen®, Pepinh-MYD (inibidor da sinalização mediada por MyD88) 50µM Invivogen®, Celastrol (inibidor de NF-κB) 5µM Invivogen®, PMA (ativador de NF-κB) 500nM Invivogen®, Picetanol (inibidor de SYK) 50/100 µM Sigma®, Anti-TLR2 (anticorpo neutralizante de TLR2) 10µg/ml Invivogen®, Cloroquina (inibidor de acidificação de endossomo e sinalização TLRs intracelulares) 50µM Invivogen®, GW5074 (inibidor de RAF1) 5µM CalBiochem®, Anti-Dectina-1 (anticorpo neutralizante de TLR2) 10µg/ml Invivogen®.

O tratamento com os inibidores e/ou agonistas seguiu a recomendação dos fabricantes sendo os inibidores adicionados ao meio de cultura com as DCs 1 hora antes das infecções ou administração dos agonistas.

### 3. 6. Extração de RNA das células dendríticas infectadas com *P. brasiliensis*

A extração do RNA das células infectadas com o fungo foi realizada com o kit RNeasy da Qiagen® de acordo com o protocolo do fabricante: (1) lise das células com tampão RLT diretamente na placa (600 µl), (2) adição de um volume de etanol 70% ao lisado, (3) transferência (700 µl) da solução para coluna de separação e centrifugação (15 segundos a 8.000g em temperatura ambiente), (3) adição (350 µl) do tampão RW1 na coluna e centrifugação nas condições descritas acima, (4) Adição de DNase

(80  $\mu$ l ) diretamente na membrana da coluna e aguardar 15 minutos a temperatura ambiente, (5) adição do tampão RW1 (350  $\mu$ l) e centrifugação nas mesmas condições, (6) Adição do tampão RPE (500  $\mu$ l) e centrifugação nas mesmas condições, (7) mudar o tubo da coluna para ependorff RNase free de 1,5 ml e adicionar 30-50  $\mu$ l de água milli-Q, centrifugar por 1 minuto a 8.000g.

O RNA foi quantificado e analisado para verificação de sua integridade e concentração para síntese do cDNA.

Para síntese do cDNA foi o kit Genomic DNA Elimination Mixture de acordo com o protocolo do fabricante: (1) 1  $\mu$ g de RNA, (2) 2  $\mu$ l de gDNA Eliminator Buffer, (3)  gua Milli-Q RNase free para completar 10 $\mu$ l. Seguir para o ciclo 1 (45  $^{\circ}$ C/5min) e (4  $^{\circ}$ C/5min). Depois do primeiro ciclo para síntese do cDNA adicionar 10  $\mu$ l de GE DNA e seguir para o segundo ciclo (42  $^{\circ}$ C/15min) (95 $^{\circ}$ C/5min). Adicionar 91 $\mu$ l de  gua Milli-Q. Estocar -20  $^{\circ}$ C.

### 3.7. Expressão gênica das células dendríticas por qRT-PCR *array*

RNA total de DCs do grupo controle (não infectado) e grupos experimentais (DCs infectadas pelos isolados de *P. brasiliensis* Pb265 e Pb18) foram extraídos empregando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Tratamento com DNase durante a extração foi realizado a fim de assegurar que o produto final fosse livre de contaminação pelo DNA genômico. Após avaliação quantitativa e qualitativa do RNA, 1 $\mu$ g foi transcrito de forma reversa para cDNA usando o *RT<sup>2</sup> First Strand Kit* (SABiosciences) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. Posteriormente as amostras de cDNA foram marcadas com o *RT<sup>2</sup> Real Time SYBR Green PCR Master Mix* (SA Biosciences) e adicionado a placas

de 96 poços do *Mouse Antifungal Response e Toll-Like Receptor (TLR) Signaling Pathway RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array* (PAMM-00147 e PAMM-0018, SABiosciences).

Esses *arrays* combinados permite a avaliação, ao mesmo tempo, do nível de transcrito de um total de 131 genes que codificam PRRs, proteínas adaptadoras e associadas a sinalização desses PRRs, fatores de transcrição e proteínas relacionadas, citocinas, quimiocinas, marcadoras de maturação de DCs entre outros. Além disso, 5 genes de expressão constitutiva (*Gusb*, *Hprt1*, *Hsp90ab1*, *Gadph* and *Actb*) para a normalização dos resultados do PCR e controles para contaminação de DNA genômico, eficácia da transcrição reversa e reprodutibilidade da são incluídos em cada array. Nas nossas condições de trabalho dois desses genes constitutivos (*Hprt1* e *Actb*) tiveram níveis de RNA constante entre os grupos experimentais e controle, sendo utilizados para normalização dos dados. A amplificação dos produtos, aquisição dos dados (na forma de valores de Ct ou *threshold cycle*) e curvas de dissociação foram realizados no aparelho ABI 7500 qRT-PCR system (Applied Biosystems, software Version 2.0.3).

As diferenças dos níveis de transcritos ou *fold change* (FC) entre os grupos experimentais e controle foram determinadas empregando o método de comparação do ciclo limiar (Ct) ou *crossing threshold*, baseado no algoritmo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak *et al.*, 2001). Genes foram determinados significativamente modulados (induzidos ou reprimidos) baseado em dois critérios: (i) a diferença do FC na média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi maior que 3 ou menor que -3 e (ii) a diferença da replicata nos valores de  $2^{-\Delta Ct}$  para cada gene no grupo controle e experimental foi estatisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) utilizando o teste t de Student.

Os dados foram analisados pelo RT<sup>2</sup> profile PCR Array Data Analyses version 3.5  
on  
<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php?target=upload>.  
line

### 3.8. Cultura das DCs infectadas com o *P.brasiliensis* e linfócitos

Células dendríticas foram infectadas com os dois isolados (Pb18 e Pb265) do fungo e cocultivadas com esplenócitos totais de camundongos C57bl/6 (1:1:5) em meio RPMI-1640 suplementado (10% de soro bovino fetal, 25 mg/l de gentamicina, 1% de aminoácidos não essenciais, 1mM de piruvato de sódio, 2mM de L-glutamina, 50mM de 2  $\beta$ -mercaptoetanol, 50 $\mu$ l de ciprofloxacina a 0,2%). O baço dos animais foi retirado e dividido com pinças de rato, posteriormente as células foram separadas dos debris com cell strainer 40 $\mu$ m BD®, as hemácias foram lisadas com Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma®) conforme especificação do fabricante e coradas com azul tripam a fim de se ter sua viabilidade (> 80%), analisadas e contadas em hemocitômetro.

As células, DCs, leveduras de Pb e Linfócitos, foram cocultivadas em estufa a 36 °C e 5% CO<sub>2</sub> durante 5 dias, após esse período o sobrenadante foi coletado e o perfil de produção de citocinas analisado por ELISA.

### 3.9. Infecção dos animais e preparo do material biológico

Animais machos C57bl/6 e KO para TLR2, TLR4 e *Clec7a* (Dectina) foram anestesiados infectados com  $1 \times 10^6$  células (Loures *et al*, 2010). Após o período de 45 dias de infecção foram eutanasiados conforme descrito previamente, tiveram seus pulmões retirados e divididos em três partes, a primeira foi tratada para coleta de leucócitos a fim de se realizar a caracterização dos mesmos por citometria de fluxo - após sua retirada as partes dos órgãos foram lavados com PBS, digeridos

enzimaticamente por 1 hora em 15 ml de tampão de digestão [RPMI-1640 com 5% de soro bovino fetal, 1 mg/ml de colagenase e 30 µg/ml de DNase (Sigma)] em seguida tiveram as hemácias lisadas com tampão de lise Sigma®. A segunda foi macerada com homogenizador de tecidos Quigen® conforme especificação do fabricante em meio contendo inibidor de protease cOmplete, Mini, EDTA-Free; Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Applied Science® para análise de citocinas.

### 3.10. Quantificação das citocinas por ELISA

As citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, CCL-2, IL-10, IL-23, IL-13, IFN- $\gamma$ , IL-17) secretas pelas células dendríticas dos animais WT estimuladas com os inibidores ou agonistas previamente descritos e dos animais KO para os genes TLR2, TLR4 e Dectina posteriormente desafiadas com os dois tipos de isolados do *P. brasiliensis* (Pb265 ou Pb18) foram dosadas a partir do sobrenadante da cultura de células ou do macerado do pulmão dos camundongos infectados conforme descrito previamente pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) R&DSYSTEMS® conforme protocolo do fabricante.

### 3.11. Citometria de fluxo

Após a separação das células do pulmão dos animais pelo método enzimático descrito anteriormente as mesmas foram coradas com azul tripan (Sigma®) para avaliação de sua viabilidade, que foi maior que 80%, e contadas em um hemocítômetro. As marcações com os anticorpos (anti-mouse CD3 PE, anti-mouse CD8 FITC, anti-mouse CD4 FITC, anti-mouse F4/80 FITC, anti-mouse CD11b FITC, anti-mouse MHCII PE, anti-mouse Ly6G FITC, anti-mouse CD19 FITC) eBioscience® seguiu a recomendação do fabricante. Para aquisição, mínimo de 10.000 eventos, das células

marcadas foi utilizado o citômetro BD FACSVerse® e a análise feita com o programa FlowJo®.

## *Resultados*

## 4. Resultados

Células dendríticas obtidas da medula óssea de camundongos C57Bl/6, TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> ou Dectina-1<sup>-/-</sup> foram infectadas com Pb265 ou Pb18. Após 6 horas de cultivo foi isolado mRNA das DCs dos animais WT para os ensaios de PCR *Array* e sobrenadante de cultura para dosagem de citocinas. As células dendríticas infectadas também foram co-cultivadas com esplenócitos totais dos camundongos C57Bl/6 e depois de 5 dias também tiveram seu sobrenadante coletado para dosagem de citocinas. Por fim, para testar a influência dos PRRs analisados *in vitro*, camundongos C57Bl/6 e Dectina<sup>-/-</sup> foram infectados com Pb265 e Pb18 para análise do processo inflamatório e citocinas no tecido pulmonar.

### 4.1. Análise do transcrito das DCs após infecção com Pb18 ou Pb265

Para análise dos genes relacionados com a resposta imune inata, o mRNA obtido das DCs após a infecção com o Pb18 ou Pb265 foi avaliado pelo PCRarray. Do total de 131 genes analisados, 58 (44%) tiveram seus níveis de transcritos significativamente elevados pelo isolado de baixa virulência, Pb265, sendo que destes, 26 foram modulados exclusivamente por ele. Por outro lado o isolado de maior virulência, Pb18, induziu 34 (25%) genes no total e apenas 2 destes genes de forma exclusiva (Figura 3). Poucos genes tiveram sua expressão reprimida, 2 (1,5%) pelo isolado Pb265 e 14 (10%) pelo Pb18. Além disso, 32 genes foram induzidos positivamente por ambos isolados e apenas 1 induzido negativamente (Figura 3).

**Tabela 1** – Genes relacionados aos Receptores de Reconhecimento Padrão, suprimidos ou ativados de Células Dendríticas infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) infectadas por 6 horas e analisados por PCR Array.

Símbolo oficial do gene (Símbolo/nome alternativo)	Nome	DC+Pb265 vs. DC	DC+Pb18 vs. DC
<b>Receptores de reconhecimento padrão (PRRs)</b>			
<b>TLRs</b>			
<b>TLR1</b>	Toll-like receptor 1	3.81	1.14
<b>TLR2</b>	Toll-like receptor 2	1.68	-1.94
<b>TLR3</b>	Toll-like receptor 3	5.23	<b>4.85</b>
<b>TLR4</b>	Toll-like receptor 4	-1.39	-3.37
<b>TLR5</b>	Toll-like receptor 5	-3.23	-2.23
<b>TLR6</b>	Toll-like receptor 6	4.55	1.40
<b>TLR7</b>	Toll-like receptor 7	8.41	3.62
<b>TLR8</b>	Toll-like receptor 8	-1.63	-3.17
<b>TLR9</b>	Toll-like receptor 9	1.24	-4.47
<b>CLRs</b>			
<b>Clec4n (Dectin-2)</b>	C-type lectin domain family 4, member n	-1.74	-3.28
<b>Clec7a (Dectin-1)</b>	C-type lectin domain family 7, member a	<b>3.62</b>	-1.33
<b>Clec4e (Mincle)</b>	C-type lectin domain family 4, member e	<b>7.12</b>	<b>5.56</b>
<b>Cd209a (DC-SIGN)</b>	CD209a antigen	1.06	<b>3.83</b>
<b>Mrc1 (MR)</b>	Mannose receptor, C type 1	1.24	-2.30
<b>NLRs</b>			
<b>Nlrp3</b>	NLR family, pyrin domain containing 3	<b>8.58</b>	<b>6.96</b>
<b>Solúveis</b>			
<b>Ptx3</b>	Pentraxin related gene	<b>6.48</b>	<b>5.75</b>

Apenas genes em negrito tiveram seus níveis de transcrito modulado positivamente considerando os critérios  $FC > 3$  ou  $< -3$  e  $p\text{-value} < 0,05$ . \*Representa genes de DCs modulados por ambos isolados de *P. brasiliensis*, porém sendo significativamente ( $FC > 3$  e  $p < 0,05$ ) mais induzido pelo Pb265 quando comparado com o Pb18.

**Tabela 2** – Genes relacionados Transdução de sinal de PRRs suprimidos ou ativados de Células Dendríticas infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) infectadas por 6 horas e analisados por PCR Array.

Símbolo oficial do gene (Símbolo/nome alternativo)	Nome	DC+Pb265 vs. DC	DC+Pb18 vs. DC
<b>Transdução de sinal de PRRs (proteínas adaptadoras e efectoras)</b>			
<b>TLRs</b>			
<b>Btk</b>	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	-1.18	<b>-5.65</b>
<b>Casp8</b>	Caspase 8	2.53	1.28
<b>Fadd</b>	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	1.80	-2.08
<b>Irak1</b>	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	-1.43	-1.69
<b>Irak2</b>	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	2.20	-1.40
<b>Irak4</b>	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4	-1.54	<b>-10.92</b>
<b>Map3k1</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	-2.34	<b>-7.69</b>
<b>Map3k7 (Tak1)</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	-1.48	2.56
<b>Mapk8ip3</b>	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	1.12	-2.66
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88	-1.22	<b>-6.13</b>
<b>Tbk1</b>	TANK-binding kinase 1	2.08	-1.57
<b>Ticam1 (TRIF)</b>	Toll-like receptor adaptor molecule 1	-1.10	<b>-5.71</b>
<b>Ticam2 (TRAM)</b>	Toll-like receptor adaptor molecule 2	1.28	<b>-5.48</b>
<b>Tirap (Mal)</b>	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein	2.07	1.16
<b>Ube2n</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	-1.38	-2.20
<b>Ube2v1</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	-1.02	-1.93
<b>CLRs</b>			
<b>Bcl10</b>	B-cell leukemia/lymphoma 10	2.13	1.74
<b>Card9</b>	Caspase recruitment domain family, member 9	<b>4.76</b>	1.05
<b>Malt1</b>	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	<b>4.69</b>	3.60
<b>Raf1</b>	V-raf-leukemia viral oncogene 1	1.37	<b>-5.30</b>
<b>Sykb</b>	Spleen tyrosine kinase	<b>6.01</b>	<b>5.43</b>
<b>NLRs</b>			
<b>Casp1</b>	Caspase 1	<b>7.50</b>	<b>4.92</b>

Apenas genes em negrito tiveram seus níveis de transcrito modulado positivamente considerando os critérios  $FC > 3$  ou  $< -3$  e  $p\text{-value} < 0,05$ . \*Representa genes de DCs modulados por ambos isolados de *P. brasiliensis*, porém sendo significativamente ( $FC > 3$  e  $p < 0,05$ ) mais induzido pelo Pb265 quando comparado com o Pb18.

**Tabela 3** – Genes relacionados a fatores de transcrição suprimidos ou ativados de Células Dendríticas infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) infectadas por 6 horas e analisados por PCR Array.

Símbolo oficial do gene (Símbolo/nome alternativo)	Nome	DC+Pb265 vs. DC	DC+Pb18 vs. DC
<b>Fatores de transcrição e proteínas relacionadas</b>			
<b>Elk1</b>	ELK1, member of ETS oncogene family	1.31	-2.23
<b>Fos</b>	FBJ osteosarcoma oncogene	<b>3.49</b>	2.26
<b>Irf1</b>	Interferon regulatory factor 1	2.77	-1.19
<b>Irf3</b>	Interferon regulatory factor 3	-2.13	-4.63
<b>Jun</b>	Jun oncogene	-2.59	-5.39
<b>Map2k3 (MKK3)</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	1.43	-1.20
<b>Map2k4 (MKK4)</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	1.89	-1.61
<b>Map3k1 (MEKK1)</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	-2.34	-7.69
<b>Mapk8</b>	Mitogen-activated protein kinase 8	1.32	-1.81
<b>Mapk9</b>	Mitogen-activated protein kinase 9	1.04	-2.66
<b>Nfkb1 (p50/p105)</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105	<b>7.26</b>	<b>3.53</b>
<b>Nfkb2</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100	1.30	-1.64
<b>Nfkbia</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1.83	1.14
<b>Nfkbig</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	1.64	2.12
<b>Nfkbi1</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1	<b>5.14</b>	1.57
<b>Nfrkb</b>	Nuclear factor related to kappa B binding protein	1.11	-2.13
<b>Rel c-Rel</b>	Reticuloendotheliosis oncogene	<b>15.16</b>	<b>8.10</b>
<b>Rela p65</b>	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian	<b>6.68</b>	1.47

**Tabela 4** – Genes relacionados a citocinas, quimiocinas e fatores de maturação, suprimidos ou ativados de Células Dendríticas infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) infectadas por 6 horas e analisados por PCR Array.

<b>Citocinas</b>			
<b>Csf2 (Gm-CSf)</b>	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	<b>197.10</b>	<b>359.01</b>
<b>Csf3 (G-CSF)</b>	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	<b>760.95*</b>	<b>72.94</b>
<b>Ifng</b>	Interferon gamma	2.94	1.72
<b>Il1a</b>	Interleukin 1 alpha	<b>182.98</b>	<b>82.06</b>
<b>Il1b</b>	Interleukin 1 beta	<b>128.44*</b>	<b>24.21</b>
<b>Il2</b>	Interleukin 2	<b>105.81</b>	<b>504.61</b>
<b>Il6</b>	Interleukin 6	<b>1124.05*</b>	<b>136.09</b>
<b>Il10</b>	Interleukin 10	<b>86.79</b>	<b>80.07</b>
<b>Il12a</b>	Interleukin 12A	<b>103.64*</b>	<b>9.84</b>
<b>Il12b</b>	Interleukin 12B	<b>85.71*</b>	<b>6.94</b>
<b>Il18</b>	Interleukin 18	<b>5.58</b>	<b>-1.57</b>
<b>Il23a</b>	Interleukin 23, alpha subunit p19	<b>28.84</b>	<b>10.09</b>
<b>Lta (Tnf-beta)</b>	Lymphotoxin A	<b>15.77</b>	<b>5.16</b>
<b>Tnf</b>	Tumor necrosis factor alpha	<b>16.18</b>	<b>11.30</b>
<b>Quimiocinas</b>			
<b>Ccl2 (MCP-1)</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	<b>93.32*</b>	<b>3.56</b>
<b>Ccl5</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	<b>31.76*</b>	<b>3.80</b>
<b>Ccl12</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 12	<b>66.77*</b>	<b>10.90</b>
<b>Ccl20</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 20	<b>26.16</b>	<b>76.18</b>
<b>Cxcl1 (KC)</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	<b>116.34</b>	<b>387.35*</b>
<b>Cxcl3</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	<b>12.22</b>	<b>15.04</b>
<b>Cxcl9</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	<b>42.24</b>	2.54
<b>Cxcl10 (IP-10)</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	<b>106.18*</b>	<b>21.30</b>
<b>Cxcl11</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	<b>127.27</b>	<b>71.29</b>

---

**Marcadores de Maturação de  
células dendríticas**

<b>Cd40</b>	CD40 antigen	<b>60.34</b>	<b>23.98</b>
<b>CD80 (B7.1)</b>	CD80 antigen	<b>5.86</b>	1.89
<b>Cd83</b>	CD83 antigen	1.40	2.08
<b>CD86 (B7.2)</b>	CD86 antigen	<b>8.51</b>	1.56
<b>Outras proteínas</b>			
<b>Ptgs2 (Cox-2)</b>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	<b>776.27*</b>	<b>140.36</b>
<b>Stat1</b>	Signal transducer and activator of transcription 1	<b>6.88</b>	-1.40

---

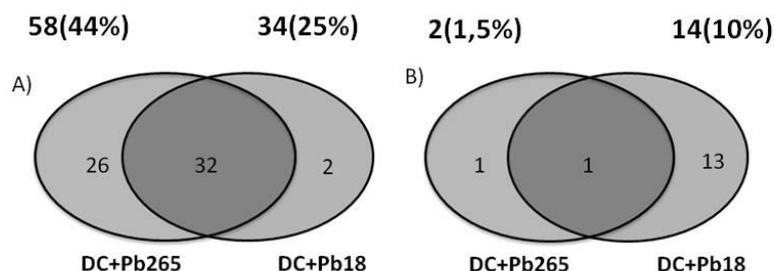


Figura 2 – Diagrama de Venn representando expressão de genes relacionados à resposta imunológica de DCs desafiadas 6 horas com Pb265 ou Pb18. Em A) Genes induzidos exclusivamente quando a célula foi infectada com Pb265, exclusivamente com Pb18 ou foram igualmente modulados com os dois isolados. Em B) Genes reprimidos exclusivamente quando a célula foi infectada com Pb265, exclusivamente com Pb18 ou foram igualmente modulados com os dois isolados.

Quando analisamos detalhadamente esses genes relacionados ao PRRs (Tabela 1) observamos que os transcritos relacionados aos PRRs indicaram que os receptores TLRs, principalmente aqueles associados à resposta antifúngica (TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9) não apresentaram níveis de transcritos induzidos ou reprimidos em DCs infectadas pelos dois isolados de *P. brasiliensis*. Quando analisamos os genes do tipo C-lectina, observamos que o gene para Dectina-1 (Clec7a) apareceu modulado positivamente para as DCs infectadas com o Pb265 enquanto que o gene para o receptor Mincle (Clec4e) modulado positivamente para ambos isolados. O DC-SIGN (CD209a) teve seus níveis de transcritos induzidos apenas quando as DCs foram infectadas com o Pb18. Os genes para a proteína Nlrp3 e Ptx3 apresentaram níveis de expressão modulados positivamente quando as DCs foram infectadas com o Pb265 ou o Pb18.

Os genes relacionados às proteínas adaptadoras e efetoras dos PRRs estão demonstrados na tabela 2. Os genes relacionados aos TLRs não foram modulados quando as células dendríticas foram infectadas com o Pb265. No entanto, quando as DCs foram infectadas com o Pb18, 6 genes apresentaram seus níveis de transcrito modulados negativamente (Btk, Irak4, Map3k1, Myd88, Trif e Tram). Os demais genes analisados não apresentaram diferença significativa de modulação. Os genes

relacionados à moléculas adaptadoras relacionadas aos CLR's apresentaram modulação na sua expressão. As DCs infectadas com o Pb265 apresentou níveis de transcritos positivamente modulados para os genes Card9, Malt1 e Syk. O gene Syk também apresentou níveis de transcritos aumentados quando as DCs foram infectadas com o Pb18 e níveis modulados negativamente para o gene Raf1. O gene para a caspase 1 foi modulado positivamente nas duas condições experimentais (Tabela 2).

Os genes associados a Fatores de transcrição e proteínas relacionadas foram fracamente modulados quando as células dendríticas foram infectadas com o Pb18. Apenas o Nfkb1 (p50/p105) e Rel c-Rel apresentaram expressão diferencial. Estes genes também foram diferencialmente expressos quando as DCs foram infectadas com o Pb265. Foram modulados positivamente também os genes Fos, Nfkb1 e Rel p65 (tabela 3).

A infecção das DCs pelos isolados Pb18 ou Pb265 foram capazes de modular positivamente os genes para citocinas e quimiocinas, na grande maioria dos casos (tabela 4). Comparando os níveis dos transcritos que apresentaram diferença significativa entre os isolados 18 e 265, os genes Csf3 (G-CSF), Il-1 $\beta$ , Il-6, Il-12a e Il-12b apresentaram níveis dos transcritos mais elevados quando a infecção foi realizada pelo Pb265. Para as demais citocinas Csf2 (GM-CSF), Il-1a, Il-2, Il-10, Il-23a, Lta (Tnf-beta) e Tnf- $\alpha$ , observamos aumento na expressão dos transcritos, mas sem diferença significativa entre os dois isolados. O gene para Ifn-g não foi modulado pela infecção com nenhum dos isolados testados.

Os genes de quimiocinas modulados positivamente e com diferença significativa entre os dois isolados foram Ccl2 (MCP-1), Ccl5, Ccl12 e Cxcl10 (IP-10) quando as células dendríticas foram infectadas com o Pb265. A infecção com o Pb18 modulou positivamente apenas o gene Cxcl1 (KC). Os demais genes analisados Ccl20, Cxcl3 e

Cxcl11 foram modulados positivamente, mas sem diferença significativa entre os dois isolados. O gene Cxcl9 foi modulado positivamente quando as DCs foram infectadas com o Pb265 e não modulado quando a infecção ocorreu com o Pb18 (tabela 4).

A infecção das DCs pelo Pb265 elevou os níveis dos transcritos de quase todos os genes de maturação de DCs (CD80 (B7. 1), CD86 (B7.2) e CD40). Somente o gene Cd83 não apresentou modulação diferencial (tabela 4). Quando a infecção ocorreu com o Pb18, apenas o gene Cd40 apresentou modulação positiva.

Outro gene de proteína importante para o processo inflamatório, que teve modulação positiva para os isolados com diferença significativa foi o da Ptgs2 (COX-2), sendo que o Pb265 induziu uma expressão diferencial maior. O gene do Stat1 foi modulado positivamente apenas para Pb265 (tabela 4).

#### 4.2. Produção de citocinas pelas DCs infectadas com os dois isolados do *P. brasiliensis*

As citocinas secretadas pelas DCs quando elas foram infectadas *in vitro* com os isolados Pb265 ou Pb18 foram analisadas e observamos que as citocinas IL-6, IL-12 e a quimiocina CCL2 foram mais produzidas quando o Pb265 infectou as DCs. A IL-10 foi mais produzida quando o Pb18 infectou as DCs. Não foi observada diferença significativa na produção de TNF- $\alpha$  e IL-23 entre os isolados do fungo (Figura 4).

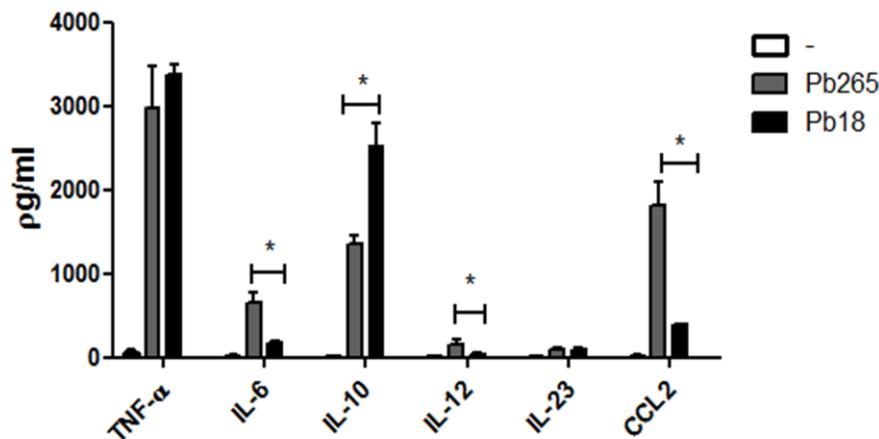


Figura 3 – Perfil de citocinas produzidas pelas DCs desafiadas com Pb265 ou Pb18. O sobrenadante foi coletado e as citocinas secretadas foram quantificadas por ELISA após 6 horas de infecção,  $p < 0,05$ .

Para verificar quais moléculas adaptadoras estavam associadas à ativação celular, DCs foram tratadas com inibidores destas moléculas e a secreção do TNF- $\alpha$  foi avaliada. As DCs foram tratadas com Pepinh-MYD (inibidor da sinalização mediada por MyD88), Anti-TLR2 (anticorpo neutralizante de TLR2), Cloroquina (inibidor de acidificação de endossomo e sinalização TLRs intracelulares), Anti-Dectina-1, Anti-micle, Picetanol (inibidor de SYK), GW5074 (inibidor de RAF1) e Celastrol (inibidor de NF- $\kappa$ B) e após 1h foram infectadas com o Pb265 ou Pb18. Observamos que o inibidor de MyD88, anti-TLR-2 e cloroquina alterou o padrão de TNF-a, quando comparado com as células não ou mesmo entre os isolados do fungo (Figuras 5A e 5B). O tratamento com anti-dectina reduziu drasticamente a produção de TNF- $\alpha$  quando as células foram infectadas com o Pb265. O mesmo observamos quando inibimos a Syk com o picetanol (Figura 5C). Já quando a infecção foi realizada com o isolado Pb18, a produção de TNF- $\alpha$  foi reduzida apenas com o tratamento do picetanol (Figura 5D). O bloqueio do receptor Mincle não alterou o padrão de produção de TNF- $\alpha$  quando a infecção ocorreu com qualquer um dos isolados. No entanto, quando inibimos o NF- $\kappa$ B com

celastrol houve redução significativa na produção de TNF- $\alpha$  quando as DCs foram infectadas com qualquer um dos isolados (Figura 5E e 5F).

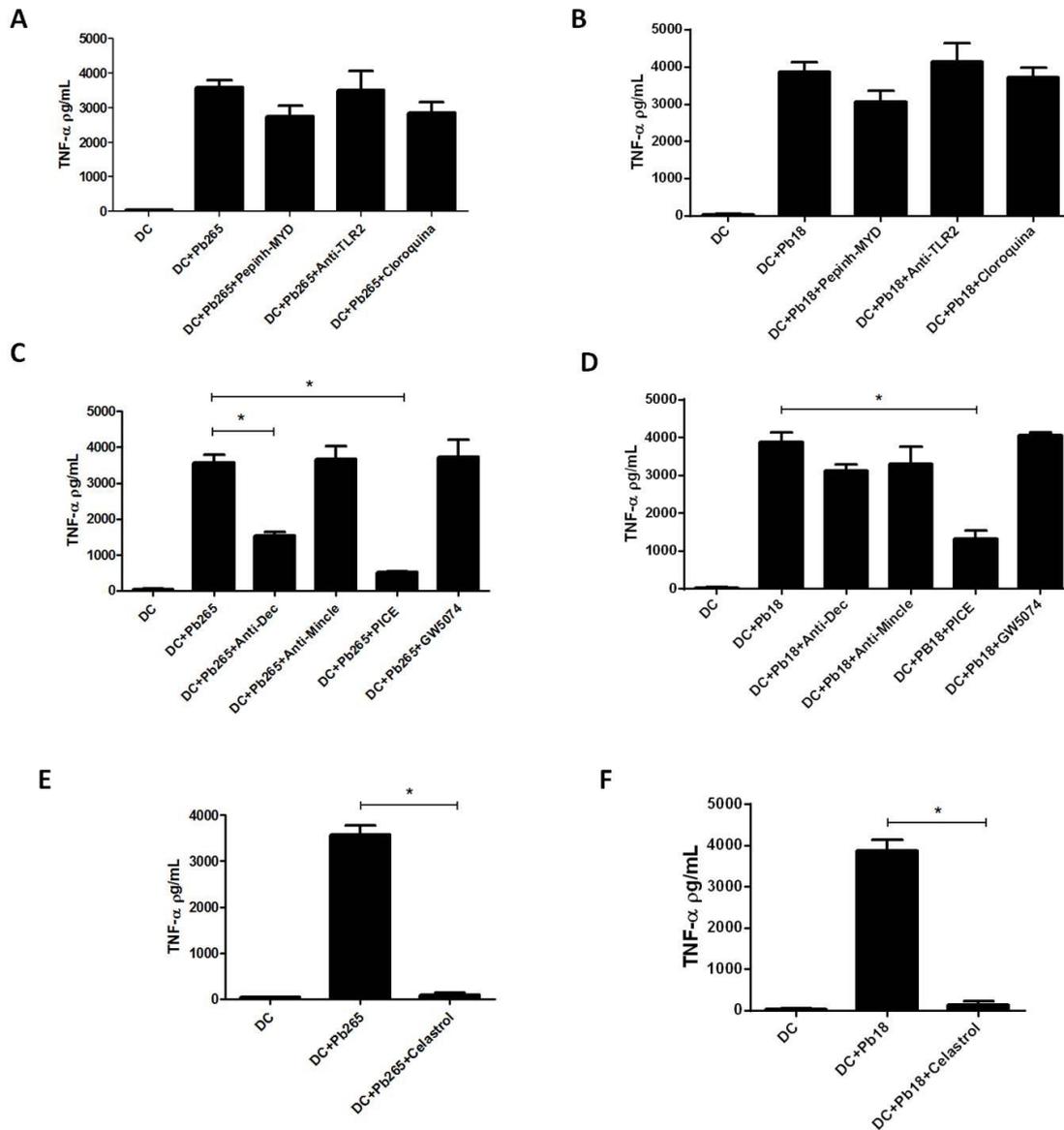


Figura 4 – Efeito do tratamento de inibidores relacionados ao TLR, CLR ou NF- $\kappa$ B em DCs desafiadas com isolados de *P. brasiliensis*. As células foram tratadas com inibido da molécula adaptadora Myd88 (pepinh-MYD), Anti-TLR2 e cloroquina e infectadas com A)Pb265 ou B)Pb18. As DCs foram tratadas com Anti-Dec, Anti-Mincle, Picetanol, e GW5074 e infectadas com C)Pb265 ou D)Pb18. As DCs foram tratadas com celastrol e infectadas com E) Pb265 ou F)Pb18. Após 6 horas o sobrenadante foi coletado e a citocina TNF- $\alpha$  foi dosada por ELISA,  $p < 0,05$ .

Para confirmar os resultados obtidos com os inibidores, realizamos a diferenciação de DCs a partir de células de medula óssea obtidas de animais *Dectina-1<sup>-/-</sup>*, *TLR2<sup>-/-</sup>* e *TLR4<sup>-/-</sup>*. Essas células foram infectadas com Pb265, Pb18 ou estimuladas com o zymosan depletado (agonista de *Dectina-1*), utilizado com controle, durante 6 horas (Figura 6). Observamos uma redução expressiva na produção do TNF- $\alpha$  pelas DCs dos animais KO para *Dectina-1* quando estas células forma tratadas com zymosan depletado ou infectadas com Pb265 ou Pb18. Esta diminuição de produção de TNF- $\alpha$  foi mais significativa quando a infecção ocorreu com o Pb265.

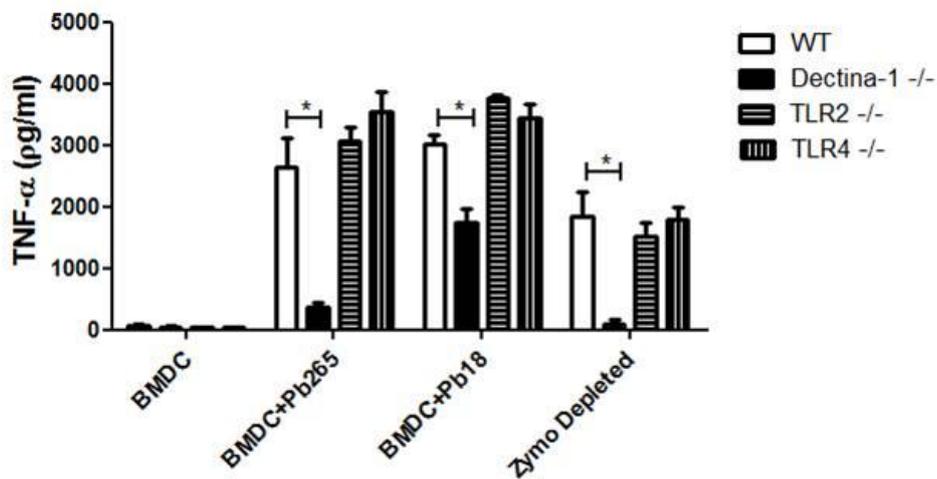


Figura 5 – Avaliação de DCs de animais *TLR2<sup>-/-</sup>*, *TLR4<sup>-/-</sup>*, *Dectina-1<sup>-/-</sup>* desafiadas com Pb265 ou Pb18. Após 6 horas de infecção o sobrenadante das DCs dos animais KO e WT foram coletadas e a citocina TNF- $\alpha$  foi analisada por ELISA,  $p < 0,05$ .

### 4.3. Perfil de citocinas produzidas pelos esplenócitos

Para avaliar a capacidade das DCs de estimularem linfócitos totais, estas células foram cultivadas com as DCs infectadas com o Pb265 ou Pb18 durante 5 dias. Após este período, coletamos o sobrenadante para dosagem de citocinas representativas da resposta Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-13) e Th17 (IL-17). Observamos que DCs infectadas com o Pb265 propiciou uma produção significativamente maior de IFN- $\gamma$  (Figura 7A) que com o Pb18. As DCs infectadas com o Pb18, propiciou uma produção significativamente maior de IL-13 (Figura 7B) e IL-17 (Figura 7C) que com o Pb265.

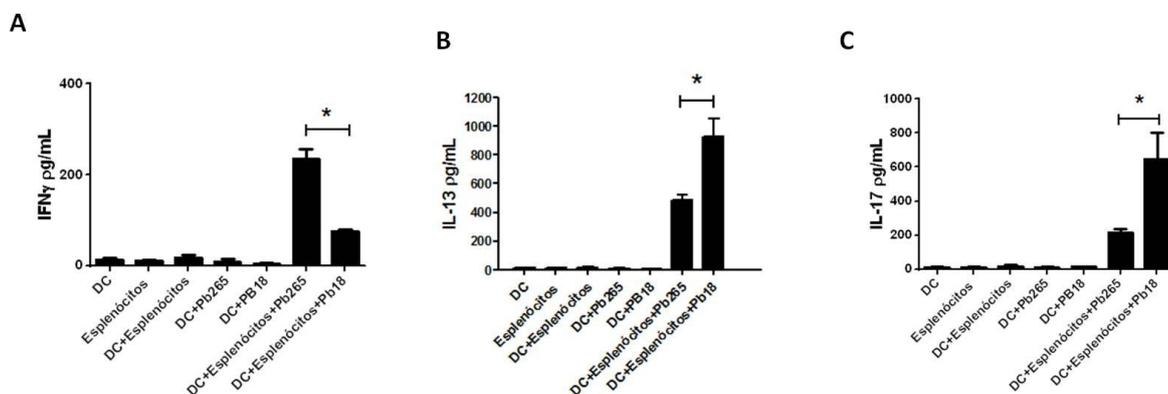


Figura 6 – Perfil de resposta imunológica *in vitro* contra o *P. brasiliensis*. DCs foram cultivadas com esplenócitos totais e Pb265 ou Pb18 (1:5:1) durante 5 dias, após esse período foi coletado o sobrenadante e analisado A) IFN- $\gamma$ , B) IL-13 e C) IL-17,  $p < 0,05$ .

### 4.4. Análise *in vivo*

Camundongos C57bl/6 e Dectina<sup>-/-</sup> foram infectados por via intratraqueal com Pb265 ou Pb18. Após 45 dias os animais foram sacrificados e tiveram seus pulmões retirados para análise histopatológica, produção de citocinas e infiltrado inflamatório. Parte do pulmão foi macerado para a dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  (Figura 8A), IL-10 (Figura 8B) e a IL-17 (Figura 8C). A infecção dos animais WT com o Pb18 induziu uma maior produção de TNF- $\alpha$ , quando comparado com a infecção com o Pb265 ou comparado com os animais KO infectados com

qualquer um dos isolados (Figura 8E). Animais KO para dectina-1 infectados com o Pb265 apresentaram uma redução na produção de TNF- $\alpha$  quando comparados aos animais WT.

A dosagem de IL-10 não apresentou diferença significativa entre os isolados Pb18 ou Pb265 nos animais WT, mas apresentou diferença quando comparamos animal WT infectado com Pb265 e KO com Pb265 e entre WT infectado com Pb18 e KO infectado com Pb265 e entre os animais infectados com os distintos isolados.

A dosagem da citocina IL-17 apresentou diferença significativa quando comparamos os animais WT infectados com Pb265 e WT com Pb18, entre os animais KO infectados com Pb265 ou Pb18 e entre os animais WT infectados com Pb18 e KO infectado com o mesmo isolado, mas não foi observada diferença entre os animais KO infectados com o isolado 265.

Uma terceira parte dos pulmões dos camundongos C57bl/6 e Dectina-1<sup>-/-</sup> foi digerida enzimaticamente e suas células marcadas com anticorpos anti-CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Figura 9A), anti-CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Figura 9B) e F4/80<sup>+</sup> (Figura 9C). Quando comparamos a quantidade de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> entre os animais WT e KO infectados com Pb18 observamos uma redução no percentual destas células, não observamos diferença entre os animais KO e WT infectados com Pb265 (Figura 9A). O percentual de células marcadas para CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> apresentou diferença significativa entre os animais WT e KO infectados com Pb18. Não observamos diferença entre os animais KO e WT infectados com Pb265 (Figura 9B). Com relação à marcação para F4/80<sup>+</sup> observamos uma diferença significativa entre os animais WT e KO infectados com Pb18. Novamente não observamos diferença também neste marcador quando os animais foram infectados com o Pb265, independentemente de ser WT ou KO.

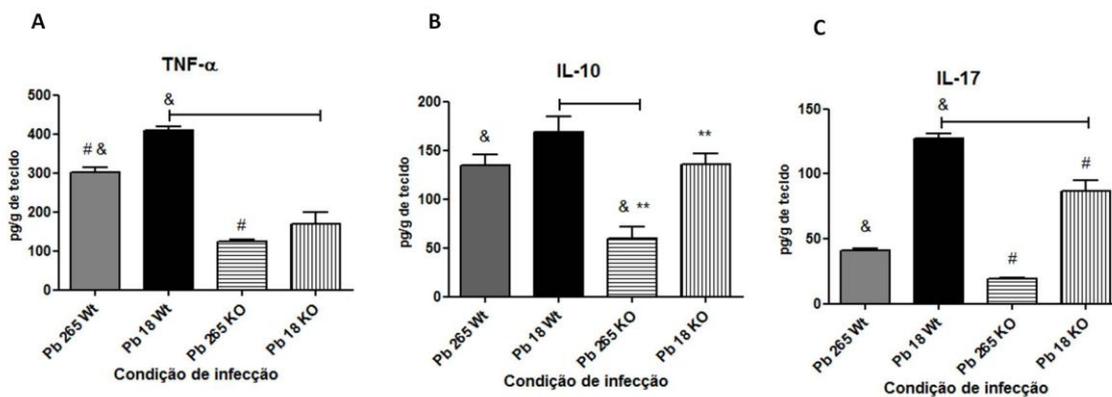


Figura 8 - Citocinas produzidas nos pulmões de camundongos WT ou Dectin-1<sup>-/-</sup> infectados com Pb265 ou Pb18 40 dias. # indica diferença significativa entre Pb265 WT e Pb18WT, \*\*\* indica diferença significativa entre Pb265WT e Pb18KO, & indica diferença significativa entre Pb18WT e Pb18KO, as barras indicam diferença significativa entre Pb18WT e Pb18KO ou Pb18WT e Pb265KO ou Pb265WT e Pb18KO. p<0,05

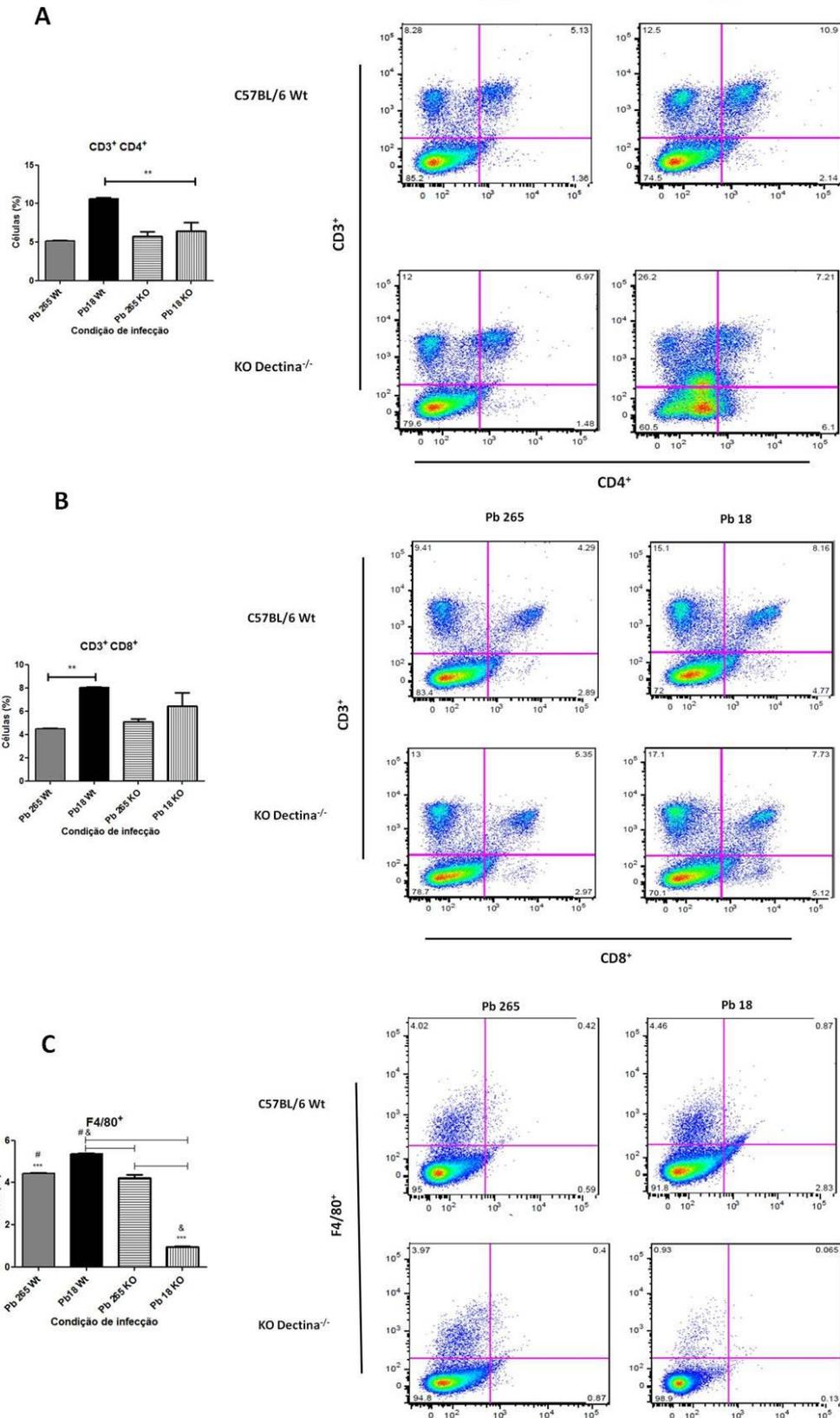


Figura 9 – Perfil de células imunológicas no pulmão de camundongos infectados com Pb265 ou Pb18. A) Média da porcentagem das células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> em pulmão de camundongos WT ou Dectina<sup>-/-</sup> infectados com Pb265 ou Pb18, a barra indica diferença significativa entre Pb18WT e Pb18KO. B) Média da porcentagem das células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> em pulmão de camundongos WT ou Dectina<sup>-/-</sup> infectados com Pb265 ou Pb18, a barra indica diferença significativa entre Pb265WT e Pb18WT. C) Média da porcentagem das células F4/80<sup>+</sup> em pulmão de camundongos WT ou Dectina<sup>-/-</sup> infectados com Pb265 ou Pb18, # indica diferença significativa entre Pb265 WT e Pb18WT, \*\*\* indica diferença significativa entre Pb265WT e Pb18KO, & indica diferença significativa entre Pb18WT e Pb18KO, as barras indicam diferença significativa entre Pb18WT e Pb18KO ou Pb18WT e Pb265KO ou Pb265WT e Pb18KO. p<0,05.

## *Discussão*

## 5. Discussão

A ideia de que componentes polissacarídicos da parede em quantidades distintas nos isolados que variam em virulência de *P. brasiliensis* poderiam desencadear atração leucocitária e formação granulomatosa proporcional ao grau de virulência do agente patogênico não é recente (Silva *et al*, 1994). Dessa forma poderíamos já apontar a razão de diferentes receptores identificarem e promoverem respostas para cada um dos tipos de isolados, mas não conseguiríamos distinguir a importância de cada um deles, tão pouco como cada receptor desencadearia uma via de transdução de sinal que levaria a resistência ou susceptibilidade à doença.

CLRs são fundamentais para o reconhecimento dos fungos e início da resposta imune inata e adaptativa. Indivíduos geneticamente deficientes para esses receptores são altamente susceptíveis a infecções fúngicas (Romani, 2011). Lectinas do tipo C disparam distintas vias de sinalização induzindo distintas citocinas que ditam a polarização das células T. Essa sinalização é integrada com a modulação do NF- $\kappa$ B aumentando ou suprimindo a atividade transcricional de subunidades específicas desse receptor (Dunnen *et al*, 2010).

A Dectina-1 é o principal PRR que reconhece  $\beta$ -glicana e induz a síntese de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias (Brown, 2011). A modulação positiva para o gene da Dectina-1 (Clec7a) nas DCs infectadas com Pb265, associado a outros genes de moléculas adaptadoras dessa via (Card9, Malt1 e SyK) sugerem uma ativação clássica de reconhecimento e resposta a esse isolado do *P. brasiliensis*. Foi observado que esse receptor também está envolvido da resposta Th-1 de uma ampla variedade de fungos patogênicos (Dennehy & Brown, 2007). Nesse sentido outros transcritos desse

padrão de resposta imunológica confirmam essa tendência. Genes de citocinas das DCs que tiveram modulação positiva com diferença significativa entre Pb265 e Pb18 quando elas foram infectadas com o isolado menos virulento apontam para uma característica pró-inflamatória (G-CSF, Il-1 $\beta$ , Il-6, Il-12a e I-12b), essas citocinas todas pertencem à resposta padrão Th-1.

Estudos de Gross *et. al.* (2006) apontaram que em DCs a sinalização por Dectina-1 pode ativar diretamente NF- $\kappa$ B via Card9. Essa descoberta corrobora nossos dados de PCR Array que não mostraram ativação de genes TLRs quando as DCs foram infectadas com Pb265 ou Pb18. Por causa da sua capacidade de atuar independentemente dos TLRs, os CLRs vêm tendo sua regulação molecular estudada com mais afinco. Apesar de ter apontado a importância do TLR2 em outros modelos experimentais para PCM (Ferreira *et. al.*, 2007; Loures *et. al.*, 2009) em nosso estudo os dados, provavelmente por similaridade metodológica, refletem os achados de Tavares *et al.* (2012), que sugerem que um mecanismo independente de TLR2-4/Myd88 explique a produção de citocinas pró-inflamatórias em DCs infectadas com Pb18.

Borim *et al.* (2009) apresentaram um estudo que não demonstrou diferença na expressão de TLR1-2-4 quando monócitos humanos eram infectados com Pb18 ou Pb265, porém o Pb265 foi capaz de promover uma regulação positiva de Dectina-1 dessas células e padrões de produção de citocinas distintas. Recentemente, quando neutrófilos humanos também foram infectados com o isolado menos virulento percebeu-se que o TLR-2 e a Dectina-1 eram mais necessários e que ocorria maior produção de Il-12. Já quando os neutrófilos eram infectados com o isolado mais virulento o receptor mais envolvido foi o RM com produção de IL-10; o reconhecimento de distintos isolados do fungo por receptores diferentes pode direcionar a respostas também diferentes (Balderramas *et. al.*, 2014).

A interação do fungo com TLR2 e TLR4 pode ser considerada como um mecanismo patogênico, uma vez que este fungo usa estes dois tipos de receptores para a sua entrada nas células e escapar das suas funções efetoras através da produção de IL-8 e IL-10. Comparando estes resultados com os obtidos no presente estudo, pode-se sugerir que a ligação para o mesmo PRR em polimorfonucleares fungo pode desencadear tanto respostas pró e anti-inflamatórias (Rodrigues *et al.*, 2014).

Estudos experimentais de PCM com camundongos resistentes e susceptíveis infectados intraperitonealmente com *P. brasiliensis* que a produção de citocinas varia durante o curso da doença. Na fase precoce há uma alta produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  seguida de uma produção sustentada de IL-2 e IFN- $\gamma$  caracterizando um padrão de resposta Th-1 em animais resistentes. Ao contrário em camundongos susceptíveis na fase inicial há uma secreção efêmera das citocinas pró-inflamatórias e uma secreção mais acentuada de IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$ , seguida por uma produção tardia de IL-4. IL-10 também foi produzida por animais de linhagens mais resistentes, embora mais num tempo mais tardio quando comparado com os camundongos mais sensíveis ao Pb (Calich & Kashino, 1998).

Entre as múltiplas atividades, IL-12 é um potente indutor de IFN- $\gamma$  de células T e NK, Bem como é fundamental para indução da resposta Th-1 levando a ativação do macrófago, o eixo formado entre IL-12 e IFN- $\gamma$  o eixo formado por essas citocinas é essencial para o desenvolvimento do granuloma e imunidade protetora contra vários microrganismo intra-celulares em camundongos e humanos (Romani *et. al.*, 1997; Gately *et. al.*, 1998). Monócitos humanos infectados com Pb265 ou Pb18 respondem de formas distintas no que diz respeito à atividade fungicida, mesmo quando previamente estimulados com IFN- $\gamma$  (Calvi *et. al.*, 2003). A pré-ativação dessas células por essa citocina é fundamental para o início e manutenção de uma resposta eficaz contra o Pb.

Nossos resultados de citocinas de linfócitos totais co-cultivados com DCs infectadas com Pb265 ou Pb18 apresentaram similaridade com esse dado. O isolado menos virulento do fungo promoveu maior secreção de citocinas da resposta Th-1, por sua vez o isolado mais virulento produziu mais citocinas da resposta Th-2 e Th-17.

A reação inflamatória crônica tecidual envolve a participação do IFN- $\gamma$ . *In situ*, a expressão dessa citocina é preferencialmente correlacionada com a resposta Th-1 contra fungos (Koga *et al.*, 2002). O IFN- $\gamma$  controla a expressão de colágeno diretamente através da síntese e degradação do colágeno I (Gosh, 2002; Wynn, 2004). E indiretamente por afetar a modulação da produção de citocinas pró-fibróticas como Il-4 e TGF- $\beta$  (Wynn, 2004). Imunocitocalização de IFN- $\gamma$  em histopatológicos de camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/J) a PCM experimental infectados com Pb265 ou Pb18 mostraram que a intensa expressão dessa citocina em células linfomononucleares de animais susceptíveis ou resistentes infectados com o isolado altamente virulento apontam para uma ativação semelhante da resposta imune celular na fase inicial da infecção (15 dias) nestes camundongos e uma ausência de correlação entre a resistência e o fundo genético do hospedeiro, neste ponto do tempo, no entanto, o aumento da expressão de células positivas para IFN- $\gamma$  em camundongos resistente no ponto de tempo mais tardio (120 dias), sugere que, nesta fase, essa linhagem de camundongos tem uma capacidade mais eficiente para ativar os fagócitos, macrófagos, principalmente para controlar a difusão de fungos (Nishikaku *et al.*, 2011).

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B é um regulador crítico de muitos processos celulares, incluindo sobrevivência celular e inflamação, ele funciona como um hetero- ou homo-dímero que podem ser formados a partir de cinco, subunidades NF-B $\kappa$ 1 (p50 e p105 seu precursor), NF-B2 (p52 e p100 seu precursor), RelA (p65), e RelB c-Rel (Pereira & Oacley, 2007). O Fator de transcrição Nfkbil1 regula negativamente DCs

promovendo uma menor ativação de CD80 e CD86 sem interferir no MCHII, além de induzir a uma menor produção de Il-6 e TNF- $\alpha$ , mas sem afetar Il-1 $\beta$  e Il-12 (Chiba *et al.*, 2011). Sua influência na transcrição dos genes das citocinas TNF- $\alpha$ , Il-6, Il-1 $\beta$  e Il-12 foi parcialmente confirmada, pois TNF- $\alpha$  apesar de estar modulado positivamente não apresentou diferença significativa na sua expressão quando as DCs foram infectadas com os diferentes isolados, fato confirmado com a dosagem de citocinas do sobrenadante da cultura das células com os fungos, todavia, Il-6 apresentou diferença significativa entre os dois isolados tanto na expressão gênica quanto na dosagem dela por ELISA. Já os transcrito dos genes das citocinas Il-1 $\beta$  e Il-12 foram modulados positivamente, ambas mostraram diferença significativa nas células infectadas com os distintos isolados tanto na modulação da transcrição gênica quanto na produção de citocina medida do sobrenadante por ELISA. Esse conjunto de resultados indica uma maior capacidade de resposta das DCs quando infectadas pelo Pb265 em comparação com o Pb18.

Análises *in vitro* revelaram que a subunidade rel-c é requerido na produção de Il-12 e Il-23 (Sanjabi *et al.*, 2000) essas citocinas são cruciais na diferenciação de linfócitos T e no combate a patógenos. Interessantemente a maturação de DCs não é afetada na ausência dessa subunidade, mas afeta a ativação de CD4<sup>+</sup> (Boffa *et al.*, 2003), assim a subunidade c-rel parece ser um link crucial na diferenciação da resposta Th-1 e Th-17, nossos dados de PCR *Array* indicaram modulação positiva dessa subunidade quando as DCs foram infectadas com Pb265 ou Pb18. Do mesmo modo, mas com diferença significativa para o isolado mais virulento houve modulação dos genes das citocinas Il-12a e Il-12b e o sobrenadante da cultura das células infectadas com os dois isolados distintos mostrou diferença significativa na produção de citocinas dessas

respostas. A maior produção de Il-12 para o Pb265 e Il-17 para o Pb18 indica que há diferença na resposta imune entre os dois isolados do fungo.

O Pb265 mostrou uma produção de TNF- $\alpha$  menor que o Pb18, porém esse segundo teve uma produção de Il-10 e Il-17 maiores que o primeiro. Essas citocinas foram reduzidas para ambos os fungos quando a infecção foi no animal Dectina-1<sup>-/-</sup>. Tanto *in vitro* quanto *in vivo* o receptor Dectina-1 mostrou-se importante na resposta contra o Pb.

## *Conclusões*

## Conclusões

Baseado nos dados obtidos se concluir que o reconhecimento distinto entre os isolados de *P. brasilienses* de alta virulento (Pb18) e com baixa virulência (Pb265) devido a diferença constitutiva da sua parede celular no que concerne as  $\beta$ -glicanas promovem reconhecimentos distintos entre os fagócitos participantes da resposta inata contra fungos, aqui destacada a célula dendrítica.

Os CLR desempenha papel fundamental nesse reconhecimento, porém de modo distinto entre os isolados. No Pb265 ele ativa uma via clássica de transdução de sinal do receptor Dectina-1 promovendo por fim uma resposta Th-1 bastante eficiente em combater o fungo. Já o isolado Pb18 induz uma resposta Th-17 e com produção de IL-10. Esses padrões são altamente dependentes do reconhecimento do fungo pela Dectina-1.

Como esses achados foram encontrados na infecção *in vivo* também, acreditamos fortemente que esse conjunto de resultados aponte para uma clara distinção entre a resposta imunológicas entre o Pb265 e o Pb18. Dessa forma acreditamos contribuir para um melhor entendimento dessa patologia que acomete tantas pessoas na América Latina.

## Referência bibliográfica

Alves LM, Figueiredo F, Brandão Filho SL, Tincani I, Silva CL. The role of fractions from *Paracoccidioides brasiliensis* in the genesis of inflammatory response. Mycopathologia. 1987 Jan;97(1):3-7.

Andreotti, P. F.; Monteiro da Silva, J. L.; Bailão, A. M.; Soares, C. M.; Benard, G.; Soares, C. P.; Mendes-Giannini, M. J. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect. 2005 May;7(5-6):875-81.

Arruda, C.; Franco, M. F.; Kashino, S. S.; Nascimento, F. R.; Fazioli, R dos A.; Vaz, C. A.; Russo, M.; Calich, V. L. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. Clin Immunol. 2002 May;103(2):185-95.

Balderramas, H. A.; Penitenti, M.; Rodrigues, D. R.; Bachiera, T. F.; Frnades, R. K.; Ikoma, M. R. Dias-Melicio, L. A. Oliveira, S. L.; Soares, A. M. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1 cytokine. 2014 May;67(1):36:43.

Banchereau J & Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.

Blotta, M. H.; Mamoni, R.L.; Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. Cytokine. 2005 Oct 7;32(1):20-9.

Bocca, A. L.; Silva, M. F.; Silva, C. L.; Cunha, F. Q.; Figueiredo, F. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products I *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. Am J Trop Med Hyg. 1999 Aug;61(2):280-7.

Bocca, A. L.; Hayashi, E. E.; Pinheiro, A. G.; Furlanetto, A. B.; Campanelli, A. P.; Cunha, F. Q.; Figueiredo, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. J Immunol. 1998 Sep 15;161(6):3056-63.

Boffa, D. J.; Feng, B.; Sharma, V.; Dematteo, R.; Miller, G.; Suthanthiran, M.; Nunez, R.; Liou,HC. Selective loss of c-rel comprises dendritic cell activation of lymphocytes. Cell Immunol. 2003 Apr;222(2):105-15.

Bonfim, C. V.; Mamoni, R. L.; Blotta M. H. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulates by *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 2009 Nov; 47(7):722-33.

Bordon-Graciani, A. P.; Dias-Melicio, L. A.; Acorci-Valério, M. J.; Araujo, J. P Jr.; Soares, A. M.; High expression of human monocyte iNOS mRNA induced by Paracoccidioides brasiliensis is not associated with increase in NO production. Microbes Infect. 2012 Oct;14(12):1049-53.

Bourgeois C, Majer O, Frohner IE, Tierney L, Kuchler K. Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting. Curr Opin Microbiol. 2010 Aug;13(4):401-8.

Brock M. Fungal metabolism in host niches. Curr Opin Microbiol. 2009 Aug;12(4):371-6.

Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, Wong SY, Gordon S. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. J Exp Med. 2002 Aug 5;196(3):407-12.

Brown, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes.

Brown, A. J.; Odds, F. C.; Gow, N. A. Infection-related gene expression in Candida albicans. Curr Opin Microbiol. 2007 Aug;10(4):307-13.

Calich, V. L.; Vaz, C.A.; Burger, E. Immunity to Paracoccidioides brasiliensis infection. Res Immunol. 1998 May-Jun;149(4-5):407-17.

Calich, V. L.; Kashino, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of Paracoccidioides brasiliensis infection. Braz J Med Biol Res. 1998 May;31(5):615-23.

Calich. V. L.; Pina, A.; Felonato, M.; Bernardino, S.; Costa, T. A, Loures FV. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Jun;53(1):1-7.

Calvi, S. A.; Peraçoli, M. T.; Mendes, R. P.; Marcondes-Machado, J.; Fecchio, D.; Marques, S. A.; Soares, A. M. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect. 2003 Feb;5(2):107-13.

Castro, L.F.; Ferreira, M.C.; da Silva, R.M.; Blotta, M.H.; Longhi, L.N.; Mamoni, R.L. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. J Infect. 2013 Nov;67(5):470-85.

Chao, T. C.; Van Alten, P.J.; Greager, J. A.; Walter, R. J. Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. Cell Immunol. 1995 Jan;160(1):43-9.

Chiba, T.; Matsuzaka, Y.; Warita, T.; Sugoh, T.; Miyashita, K.; Tajima, A.; Nakamura, M.; Inoko, H.; Sato, T.; Kimura, M. NFKBIL1 confers resistance to experimental autoimmune arthritis through the regulation of dendritic cell functions. Scand J Immunol. 2011 May;73(5):478-85.

Clemons, K. V.; Feldman, D.; Stevens, D. A. Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Gen Microbiol. 1989 Jun;135(6):1607-17.

Coutinho, Z.F.; Silva, D.; Lazera, M.; Petri, V.; Oliveira, R. M.; Sabroza, P. C.; Wanke, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cad Saude Publica. 2002 Sep-Oct;18(5):1441-54.

da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. Microbes Infect. 2006 Jan;8(1):197-205.

Decken, K.; Köhler, G.; Palmer-Lehmann, K.; Wunderlin, A.; Mattner, F.; Magram, J.; Gately, M. K.; Alber, G. Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*.

Dunnen. J.; Gringhuis, S. I.; Geijtenbeek, T. B. Dusting the sugar fingerprint: C-type lectin signaling in adaptive immunity. Immunol Lett. 2010 Jan 18;128(1):12-6.

Dennehy, K. M. & Brown, G. D. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. J Leukoc Biol. 2007 Aug;82(2):253-8.

Ene, IV.; Adya, A.K.; Wehmeier, S.; Brand, A. C.; MacCallum, D.M.; Gow, N. A.; Brown, A.J. Post carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. Cell Microbiol. 2012 Sep;14(9):1319-35.

Figueiredo, F. Alves, L. M.; Silva, C. L. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. Clin Exp Immunol. 1993 Aug;93(2):189-94.

Fleck, C. B.; Schöbel, F.; Brock, M. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. Int J Med Microbiol. 2011 Jun;301(5):400-7

Fox, H. S.; Bond, B.L.; Parslow, T.G. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. J Immunol. 1991 Jun 15;146(12):4362-7.

Franco, M.; Peracoli, M.T.; Soares, A.; Montenegro, R.; Mendes, R. P.; Meira, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr Top Med Mycol. 1993;5:115-49.

Ghosh, A.K. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. Exp Biol Med (Maywood). 2002 May;227(5):301-14.

Gómez BL, Nosanchuk JD, Díez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, Restrepo A, Casadevall A, Hamilton AJ. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. Infect Immun. 2001 Sep;69(9):5760-7.

Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev.* 2009 Jul;230(1):38-50.

Goodridge HS<sup>1</sup>, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):3107-15.

Gringhuis, S. I.; den Dunnen, J, Litjens, M.; van der Vlist, M.; Wevers, B.; Bruijns, S. C.; Geijtenbeek, T. B. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol.* 2009 Feb;10(2):203-13.

Gross, O.; Poeck, H.; Bscheider, M.; Dostert, C.; Hanneschläger, N.; Endres, S.; Hartmann, G.; Tardivel, A.; Schweighoffer, E.; Tybulewicz, V.; Mocsai, A.; Tschopp, J.; Ruland, J. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature.* 2009 May 21;459(7245):433-6.

Hanna, S. A.; Monteiro da Silva, J. L.; Giannini, M. J. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* 2000 Jul;2(8):877-84.

Kanetsuna F, Carbonell LM. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 1970 Mar;101(3):675-80.

Karpuzoglu, E.; Phillips, R. A.; Dai, R.; Graniello, C.; Gogal, R.M.; Jr, Ahmed S. A. Signal transducer and activation of transcription (STAT) 4beta, a shorter isoform of interleukin-12-induced STAT4, is preferentially activated by estrogen. *Endocrinology.* 2009 Mar;150(3):1310-20.

Kashino, S. S.; Calich, V. L.; Burger, E.; Singer-Vermes, L. M.; In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia.* 1985 Dec;92(3):173-8.

Kashino, S. S.; Calich, V. L.; Singer-Vermes, L. M.; Abrahamsohn, P. A.; Burger, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia.* 1987 Aug;99(2):119-28.

Koga, T.; Duan, H.; Furue, M. Immunohistochemical detection of interferon-gamma-producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. *Med Mycol.* 2002 Apr;40(2):111-4.

Kumamoto, C. A. Niche-specific gene expression during *C. albicans* infection. *Curr Opin Microbiol.* 2008 Aug;11(4):325-30.

Livonesi, M. C.; Rossi, M. A.; de Souto, J. T.; Campanelli, A. P.; de Sousa, R. L.; Maffei, C. M.; Ferreira, B. R.; Martinez, R.; da Silva, J. S. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2009 Jan;11(1):123-32.

Loures, F.V.; Pina, A.; Felonato, M.; Feriotti, C.; de Araújo, E. F.; Calich, V. L. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Infect Immun.* 2011 Jun;79(6):2470-80.

Loures, F.V.; Pina, A.; Felonato, M.; Calich, V. L. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):1279-90.

Loures, F.V.; Araújo, E. F.; Feriotti, C.; Bazan, S. B.; Costa, T.A.; Brown, G.D.; Calich, V. L. Dectin-1 Induces M1 Macrophages and Prominent Expansion of CD8+IL-17+ Cells in Pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. *J Infect Dis.* 2014 Sep 1;210(5):762-73.

Lutz, A. Uma micose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil. *Brasil Médico.* 1908.

Matute, D.R., McEwen J. G., Montes B. A., San-Blas, G., Bagagli E., Rauscher, T. J., Restrepo, A. Morais, F., Nino-Vega, G., Taylor, J.W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogy. *Mol Biol. Evol.* 2006; 23, 65-73.

Mendes-Giannini, M. J; Andreotti, P. F.; Vincenzi, L. R.; da Silva, J. L.; Lenzi, H. L.; Benard, G.; Zancopé-Oliveira, R.; de Matos Guedes, H.L., Soares, C. P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 2006 May;8(6):1550-9.

Moreira, A.P.; Dias-Melicio, L.A.; Soares, A. M. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO production. *Cell Immunol.* 2010;263(2):196-203.

Netea, M. G.; Gow, N. A.; Munro, C. A.; Bates, S.; Collins, C.; Ferwerda, G.; Hobson, R. P.; Bertram, G.; Hughes, H. B.; Jansen, T.; Jacobs, L.; Buurman, E. T.; Gijzen, K.; Williams, D. L.; Torensma, R.; McKinnon, A.; MacCallum, D. M.; Odds, F. C.; Van der Meer, J. W.; Brown, A. J.; Kullberg, B. J. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest.* 2006 Jun;116(6):1642-50.

Nishikaku, A. S.; Molina, R. F.; Albe, B. P.; Cunha, C da S.; Scavone, R.; Pizzo, C. R.; de Camargo, Z. P.; Burger, E. Immunolocalization of IFN-gamma in the lesions of resistant and susceptible mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection.

FEMS Immunol Med Microbiol. 2011 Nov;63(2):281-8.

Oliveira, S. J.; Mamoni, R. L.; Musatti, C.C.; Papaiordanou, P. M.; Blotta, M.H.; Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* 2002 Feb;4(2):139-44.

Palmeiro, M.; Cherubini, K.; Yurgel, L. S. Paracoccidioidomycose: revisão da literatura. *Sciencia Medica.* 2005, 15(4):274-278.

Pereira, S. G.; Oakley, F. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(8):1425-30.

Pigosso, L. L.; Parente, A. F.; Coelho, A. S.; Silva, L. P.; Borges, C. L.; Bailão, A. M.; Soares, C. M. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol.* 2013 Nov;60:87-100.

Pinzan, C. F.; Ruas, L. P.; Casabona-Fortunato, A. S.; Carvalho, F. C.; Roque-Barreira, M. C. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS One.* 2010 May 21;5(5):e10757. doi: 10.1371/journal.pone.0010757.

Puccia R, Vallejo MC, Matsuo AL, Longo LV. The paracoccidioides cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. *Front Microbiol.* 2011 Dec 20;2:257.

Puccia, R.; Valejo M. C.; Matsui, A. L.; Long, L. V. The paracoccidioides cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. *Front Microbiol.* 2011 Dec 20;2:257.

Restrepo, A.; Calle, D., Rosero D.S.; Orozco L.C.; Camargo, D.; Castañeda, E.; . Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. *Epidemiol Infect.* 2001 Apr;126(2):309-15.

Restrepo, A.; McEwen, J.G.; Castañeda, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* 2001 Jun;39(3):233-41.

Rodrigues, D. R.; Dias-Melicio, L. A.; Calvi, C. A.; Peracoli, M. T.; Soares, A. M. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol.* 2007 Feb;45(1):27-33.

Rodrigues, D. R.; Fernandes, R. K.; Balderramas, H de A.; Penitent, i M.; Bachiega, T. F.; Calvi, S. A.; Dias-Melicio, L. A.; Ikoma, M. R.; Soares, Â. M. Interferon-gamma production by human neutrophils upon stimulation by IL-12, IL-15 and IL-18 and challenge with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Cytokine.* 2014 Sep;69(1):102-9.

Rogers NC<sup>1</sup>, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis e Sousa C. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. Immunity. 2005 Apr;22(4):507-17.

Romani L. Immunity to fungal infections. Nat Rev Immunol. 2011 Apr;11(4):275-88.

Romani, L.; Puccetti, P.; Bistoni, F. Interleukin-12 in infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1997 Oct;10(4):611-36.

Salazar, M.E.; Restrepo, A.; Stevens, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect Immun. 1988 Mar;56(3):711-3.

San-Blas G, San-Blas F, Ordaz D, Centeno S, Albornoz MC. Chemical changes in cell wall structure of five strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Sabouraudia. 1984;22(3):255-7.

San-Blas, G.; Travassos, L. R.; Fries, B .C.; Goldman, D. L.; Casadevall, A.; Carmona, A. K.; Barros, T. F.; Puccia, R.; Hostetter, M. K.; Shanks, S. G.; Copping, V. M.; Knox, Y.; Gow, N. A. Fungal morphogenesis and virulence. Med Mycol. 2000;38 Suppl 1:79-86.

Sanjabi, S.; Hoffmann, A.; Liou, H. C.; Baltimore, D.; Smale, S. T. Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 7;97(23):12705-10.

Saraiva, M & O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immunol. 2010 Mar;10(3):170-81

Segura, E.; Villadangos, J. A. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. Curr Opin Immunol. 2009 Feb;21(1):105-10.

Shankar, J.; Restrepo, A.; Clemons, K. V.; Stevens, D. A. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. Clin Microbiol Rev. 2011 Apr;24(2):296-313.

Silva CL, Alves LM, Figueiredo F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiology. 1994 May;140 ( Pt 5):1189-94.

Silva CL, Alves LM, Figueiredo F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiology. 1994 May;140 ( Pt 5):1189-94.

Silvana dos Santos, S.; Ferreira, K. S.; Almeida, S. R. Paracoccidioides brasiliensis-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. PLoS One. 2011;6(5):e19690.

Singer-Vermes, L. M.; Vaz, C. A.; Calich, V. L. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and non virulent Paracoccidioides brasiliensis isolates. Am J Trop Med Hyg. 1998 Dec;59(6):971-7.

Singer-Vermes, L.M.; Burger, E.; Franco, M. F.; Di-Bacchi M.M.; Mendes-Giannini, J.M.; Calish, V. L. Evaluation of pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. J.Med.Vet.Micol.;1989.27(2)71-82.

Tavares AH, Magalhães KG, Almeida RD, Correa R, Burgel PH, Bocca AL. NLRP3 inflammasome activation by Paracoccidioides brasiliensis. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Dec 5;7(12):e2595.

Tavares, A. H.; Fernandes, L.; Bocca, A. L.; Silva-Pereira, I.; Felipe, M. S. Transcriptomic reprogramming of genus Paracoccidioides in dimorphism and host niches. Fungal Genet Biol. 2014 Feb 18. S1087-1845(14)00017-6.

Tavares, A. H.; Silva, S. S.; Bernardes, V. V.; Maranhão, A. Q.; Kyaw, C. M.; Poças-Fonseca, M.; Silva-Pereira, I. Virulence insights from the Paracoccidioides brasiliensis transcriptome. Genet Mol Res. 2005 Jun 30;4(2):372-89.

Teixeira, M. M.; Theodoro, R. C.; Carvalho, M. J. A., Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R.C., Mendonza, L., Bagagli, E., San-Blas, G., Sueli, M. S. S. GCPSR analysis demonstrates a high level of speciation in *Paracoccidioides brasiliensis* genus (in revision). Molecular Phylogenetics and evolution. 2009 Aug;52(2):273-83.

Toledo, R.G.; Da Silva, W. D.; Calich, V. L.; Kipnis, T. L. Mannose-binding lectin complement pathway plays a key role in complement activation by Paracoccidioides brasiliensis. Mol. Immunol. 2010 Nov-Dec;48(1-3):26-36.

Underhill, D. M.; Ozinsky, A.; Hajjar, A. M.; Stevens, A.; Wilson, C. B.; Bassetti, M.; Aderem, A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. Nature. 1999 Oct 21;401(6755):811-5.

Wynn, T. A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. Nat Rev Immunol. 2004 Aug;4(8):583-94.

















